



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การผลิตแผ่นมาร์สหน้าเพื่อใช้เป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลและดูดผิวหนังจากเซริซิน
โดยใช้น้ำยางธรรมชาติเป็นวัตถุดิบ และเพิ่มประสิทธิภาพในการสมานแผล
โดยการเติมเส้นใยนาโนของไคติน

โดย

รศ. ดร. รัตนา รุจิรวนิช และคณะ

พฤษภาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การผลิตแผ่นมาร์สหน้าเพื่อใช้เป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลและดูแลผิวหนังจากเซริซิน
โดยใช้น้ำยางธรรมชาติเป็นวัตถุดิบ และเพิ่มประสิทธิภาพในการสมานแผล
โดยการเติมเส้นใยนาโนของไคติน

คณะผู้วิจัย

1. รศ.ดร. รัตนา รุจิรวนิช
2. ดร. อัญรัตน์ วัฒนพานิช

สังกัด

วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัยขนาดกลางเรื่องยางพารา (Medium-Size Projects on Rubber; MPR) ปี 2553

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

แบบสรุปย่อรายงานสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย)	การผลิตแผ่นมาร์สหน้าเพื่อใช้เป็นเวชภัณฑ์บำบัดและดูแลผิวหน้าจากเซรีซิน โดยใช้น้ำยางธรรมชาติเป็นวัสดุประสาน และเพิ่มประสิทธิภาพในการสมานแผลโดยการเติมเส้นใยนาโนของไคติน
(ภาษาอังกฤษ)	Innovative sericin film as skin care facial paper mask: Utilization of natural rubber as a film binder and chitin whiskers as nanoscopic fillers

ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

ชื่อ-สกุล	รศ. ดร. รัตนา รุจิรวนิช
หน่วยงาน	วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่	ซอยจุฬา 12 ถนนพญาไท ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์/โทรสาร	0-2218-4132 / 0-2215-4459
E-mail address	ratana.r@chula.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย

ดร. อัญรัตน์ วัฒนพานิช

ระยะเวลาดำเนินการ

18 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2553 ถึงวันที่ 29 กุมภาพันธ์ 2555

ปัญหาที่ท้าวิจัยและความสำคัญ

โดยส่วนใหญ่เวชภัณฑ์ที่ใช้ในการบำบัดและดูแลบาดแผลโดยเฉพาะที่บริเวณใบหน้าที่ใช้ในประเทศไทย มีราคาแพง เนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ผู้ที่มียาได้น้อยหรือแม้กระทั่งผู้มีรายได้ปานกลาง ซึ่งเป็นประชากรส่วนใหญ่ของประเทศไม่สามารถซื้อได้ ทำให้เพียงการรักษาแผลให้หายเท่านั้น ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิตแผ่นมาร์สหน้า (facial paper mask) เพื่อช่วยในการบำบัดแผลและรอยแผลเป็นสำหรับผู้ป่วยขึ้นใช้เองภายในประเทศ โดยใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติที่มีศักยภาพสูงและมีมากในประเทศไทย ได้แก่ ยางพารา เซรีซินจากรังไหม และไคตินจากเปลือกกุ้ง

วัตถุประสงค์

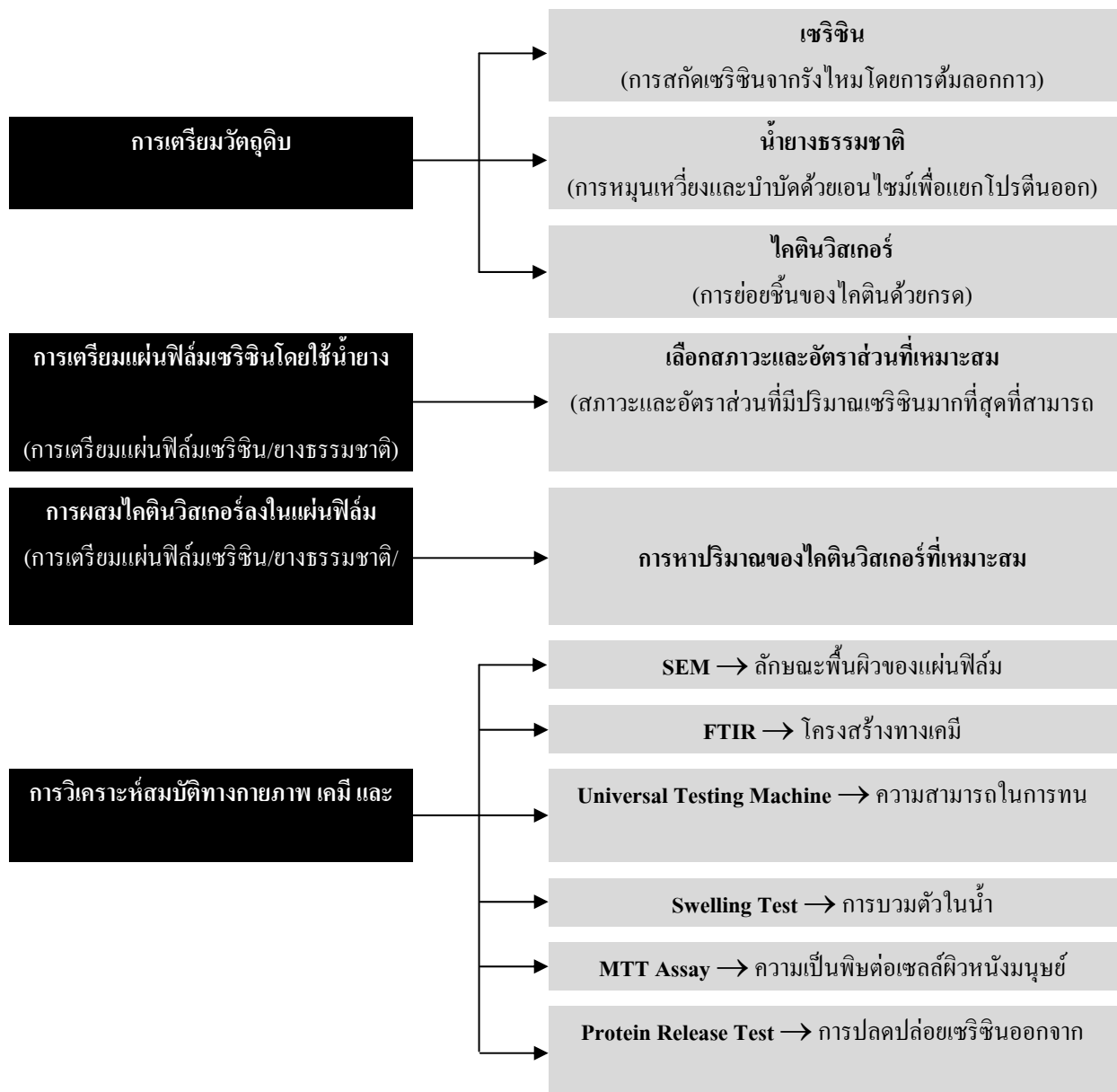
- เพื่อสกัดเซรีซินจากรังไหม และหาอัตราส่วนและสภาวะที่เหมาะสมในการผสมและขึ้นรูปสารละลายผสมระหว่างเซรีซินและน้ำยางธรรมชาติ เพื่อให้สามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้

- (2) เพื่อสกัดเส้นใยนาโนของไคตินและทำการเพิ่มประสิทธิภาพของแผ่นฟิล์มเซรีซิน/ยางธรรมชาติ ในการสมานแผลและดูแลผิว โดยการผสมเส้นใยนาโนของไคตินในอัตราส่วนต่างๆ และหาอัตราส่วนที่เหมาะสม
- (3) เพื่อวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของแผ่นฟิล์มที่ได้ ที่สอดคล้องกับการนำไปใช้งานเป็นแผ่นมาร์สหน้า

ผลการดำเนินงาน

วิธีการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุปดังแสดงใน **รูปที่ 1**



รูปที่ 1 สรุปวิธีการดำเนินการวิจัย

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ผลการทดลองในโครงการวิจัยพบว่าหลังการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยวิธีหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง และการบำบัดด้วยเอนไซม์โปรติเอสเป็นเวลา 2 วัน ทำให้สามารถลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางได้ถึง 95% น้ำยางธรรมชาติที่ได้สามารถช่วยในการขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มของเซรีซินได้ โดยปริมาณเซรีซินที่มากที่สุดที่สามารถผสมเพื่อขึ้นรูปฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติได้คือ 30% (%w/w, เทียบกับน้ำหนักของยางธรรมชาติ) แผ่นฟิล์มที่ได้มีลักษณะใสสีเหลือง ซึ่งเมื่อเปียกน้ำจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองขุ่น มีความอ่อนนุ่ม และสามารถแนบติดกับผิวหนังได้ดี นอกจากนี้แผ่นฟิล์มยังสามารถกลับคืนสู่รูปร่างดั้งเดิมได้หลังผ่านการดึงยืด และเพื่อศึกษาผลของปริมาณเซรีซินในแผ่นฟิล์มต่อสมบัติของแผ่นฟิล์มผสมด้วย จึงเลือก 2 อัตราส่วน ได้แก่ ที่ความเข้มข้นของเซรีซิน 20% และ 30% มาทำการทดลองต่อ โดยผสมไคตินวิสเกอร์ ปริมาณต่างๆ ลงในสารละลาย 20% หรือ 30% เซรีซิน/ยางธรรมชาติ และพบว่าสามารถผสมไคตินวิสเกอร์ลงในแผ่นฟิล์มได้มากที่สุด 15% จึงจะสามารถขึ้นรูปฟิล์มได้ ทั้งนี้ ปริมาณไคตินวิสเกอร์ที่ผสมลงในแผ่นฟิล์มเซรีซิน/ยางธรรมชาติ คือ 1%, 2%, 5%, 10%, และ 15% (%w/w, เทียบกับน้ำหนักของยางธรรมชาติ)

ผลการวิเคราะห์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีของแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ โดยเทคนิค FTIR แสดงให้เห็นแถบค่าการดูดกลืนที่แสดงถึงเอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีของสารทั้งสามชนิด ซึ่งเป็นการยืนยันการมีอยู่ของสารดังกล่าวในแผ่นฟิล์ม นอกจากนี้ ความสูงของแถบค่าการดูดกลืนที่แสดงถึงเอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีของไคตินเพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณไคตินวิสเกอร์ในแผ่นฟิล์มเพิ่มขึ้น ยืนยันการเพิ่มขึ้นของปริมาณไคตินวิสเกอร์ในแผ่นฟิล์ม อย่างไรก็ตามผล FTIR ไม่สามารถอธิบายการเกิดอันตรกิริยาระหว่างองค์ประกอบทั้งสามชนิดได้ เนื่องจากไม่ปรากฏการเลื่อนตำแหน่งของแถบค่าการดูดกลืนในแผ่นฟิล์มผสมและแผ่นฟิล์มคอมโพสิต

เมื่อพิจารณาลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์ม พบว่าในขณะที่แผ่นฟิล์มยางธรรมชาติบริสุทธิ์มีผิวเรียบ แผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติมีลักษณะพื้นผิวขรุขระ ทั้งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างระหว่างผิวของอนุภาคยาง (หุ้มฟังก์ชันไม่มีขั้วไม่ชอบน้ำ, hydrophobic) และเซรีซิน (หุ้มฟังก์ชันมีขั้วชอบน้ำ, hydrophilic) ซึ่งทำให้เกิดพฤติกรรมรวมตัวของสารชนิดเดียวกัน (self-assembly) เมื่อตัวกลางคือน้ำ ระบายออกไปในระหว่างการขึ้นรูปฟิล์ม สำหรับพื้นผิวของแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ พบว่าปริมาณไคตินวิสเกอร์ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ไคตินวิสเกอร์เกิดการรวมกลุ่มเป็นกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ขึ้นในแผ่นฟิล์ม ทำให้สมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยเมื่อพิจารณาถึงผลของปริมาณเซรีซินในแผ่นฟิล์ม พบว่า ความสามารถในการทนแรงดึงยืด (stress at break) ของแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 30% สูงกว่าของ 20% ในขณะที่ค่าดังกล่าวของฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ลดลงเมื่ออัตราส่วนของไคตินวิสเกอร์เพิ่มขึ้น เนื่องจากการจับกันเป็นก้อนของไคตินวิสเกอร์ที่มากขึ้น เกิดพื้นผิวแผ่นฟิล์มที่ไม่สม่ำเสมอ ทำให้ความสามารถในการดูดซับพลังงานของแผ่นฟิล์มลดลง สำหรับแนวโน้มของค่าความยืดหยุ่นของชิ้นงานซึ่งพิจารณาจากค่าการยืดตัวจนขาด (elongation at break) พบว่าแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 20% ให้ค่าการยืดตัวจนขาดสูงกว่าแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 30% เนื่องจากมีสัดส่วนของยางธรรมชาติซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ให้สมบัติความยืดหยุ่นต่อแผ่นฟิล์มมากกว่า นอกจากนี้ ค่าการยืดตัวจนขาดของฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ มีแนวโน้มลดลงเมื่ออัตราส่วนของไคตินวิสเกอร์เพิ่มขึ้น เนื่องจากสัดส่วนของยางธรรมชาติลดลง และการจับกันเป็นก้อนของไคตินวิสเกอร์ที่ใหญ่ขึ้น ทำให้มีรอยต่อระหว่างก้อนของวิสเกอร์ซึ่งเป็นบริเวณที่แผ่นฟิล์มเกิดการขาดได้ง่ายเพิ่มมากขึ้น

จากผลการศึกษาการบวมตัวในน้ำของแผ่นฟิล์มซึ่งแสดงถึงความสามารถในการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์ม เมื่อพิจารณาถึงผลของปริมาณเซรีซิน (20% และ 30%) พบว่า แผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 30% มีค่าการบวมตัวในน้ำสูงกว่าแผ่นฟิล์มที่มีปริมาณเซรีซิน 20% อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งยืนยันว่าเซรีซินเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ช่วยเพิ่ม

ผลการประเมินความเป็นไปได้ในการนำแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้จริงทางคลินิก โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (human dermal fibroblast) ด้วยวิธี MTT assay พบว่า ร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ทดสอบหลังสัมผัสกับชิ้นงานทั้งแผ่นฟิล์มยางธรรมชาติที่ผ่านการลดปริมาณโปรตีนแล้ว แผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า $>70\%$ และสูงถึง $>90\%$ ในบางกลุ่มตัวอย่างชิ้นงาน ซึ่งสูงกว่าค่าที่ยอมรับได้คือ $\geq 50\%$ อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางโดยวิธีหมวนเหวี่ยงความเร็วสูงตามด้วยการบำบัดด้วยเอนไซม์ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง และการนำผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นไปใช้จริงทางคลินิกมีความปลอดภัยสูง เนื่องจากไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์

การทดลองเพื่อศึกษาสมบัติในการปลดปล่อยสารเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ มีจุดมุ่งหมายเพื่อยืนยันว่าสารเซรีซินสามารถถูกปลดปล่อยออกมาจากแผ่นฟิล์มเพื่อแสดงสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อการรักษาแผลหรือการดูแลผิวหนังที่ดั่งเป้าหมายไว้ในโครงการวิจัย โดยแบ่งการพิจารณาออกเป็น 2 ส่วน คือ (1) ผลของปริมาณเซรีซิน และ (2) ผลของปริมาณไคตินวิสเกอร์ ต่อการถูกปลดปล่อยของเซรีซิน จากผลการทดลอง เมื่อพิจารณาถึงผลของปริมาณเซรีซิน พบว่า ไม่มีโปรตีนถูกปลดปล่อยออกมาจากแผ่นฟิล์มยางธรรมชาติที่ผ่านการบำบัดเพื่อลดปริมาณโปรตีนแล้ว ในขณะที่โปรตีนถูกปลดปล่อยออกมาจากแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติอย่างช้าๆ และต่อเนื่อง แสดงว่าโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาเป็นโปรตีนจากเซรีซิน ทั้งนี้ ปริมาณโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน 20% และ 30% ในระยะเวลาทำการทดลอง 2 วัน มีปริมาณ 170 $\mu\text{g/mL}$ และ 240 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นร้อยละของเซรีซินเท่ากับ 15% และ 13.5% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลของปริมาณไคตินวิสเกอร์ที่มีต่อการปลดปล่อยเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์ม พบว่า แผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ที่มีอัตราส่วนของไคตินวิสเกอร์น้อย (ได้แก่ 2%) แสดงปริมาณเซรีซินที่ถูกปลดปล่อยจากแผ่นฟิล์มสูงสุด (สูงกว่าแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติที่ไม่มีไคตินวิสเกอร์) แต่เมื่อปริมาณไคตินวิสเกอร์เพิ่มขึ้น (5% และ 10%) กลับทำให้ปริมาณเซรีซินที่ถูกปลดปล่อยจากแผ่นฟิล์มลดลง ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าการกระจายตัวของเส้นใยไคตินวิสเกอร์อย่างสม่ำเสมอในแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ที่มีอัตราส่วนของไคตินวิสเกอร์ 2% ช่วยเพิ่มความสามารถในการปลดปล่อยเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์ม เนื่องจากไคตินวิสเกอร์ไปขัดขวางการเกิดอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างเซรีซินในส่วนของเมทริกซ์ ทำให้เซรีซินถูกปลดปล่อยออกมาได้ง่ายขึ้น ในขณะที่เมื่อปริมาณไคตินวิสเกอร์เพิ่มขึ้น ไคตินวิสเกอร์มีแนวโน้มจะจับตัวกันเป็นก้อนมากขึ้น และเซรีซินเองก็มีแนวโน้มจะรวมตัวกันมากขึ้นเช่นกัน ทำให้ปริมาณเซรีซินที่ถูกปลดปล่อยออกมาลดลง จากผลการทดลองทั้งหมดจึงอาจสรุปได้ว่า การผสมไคตินวิสเกอร์ลงในปริมาณน้อยมีผลดีต่อการผลิตแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์หลายประการ ได้แก่ (1) ทำให้การกระจายตัวของเส้นใยไคตินวิสเกอร์ในแผ่นฟิล์มสม่ำเสมอ ซึ่งส่งผลให้ (2) มีความสามารถในการทนแรงดึงยืดสูง และ (3) เพิ่มความสามารถในการปลดปล่อยเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์ม ซึ่งหมายความว่า จะมีปริมาณเซรีซินที่ถูกปลดปล่อยออกมาเพื่อแสดงสมบัติให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว ด้านสารอนุมูลอิสระ และเพิ่มการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังมนุษย์มากขึ้น

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาแผ่นมาร์สหน้าสำหรับใช้เป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลและดูแลผิวหนัง ซึ่งประกอบขึ้นจาก เซรีซิน ขางธรรมชาติ และเส้นใยนาโนของไคติน โดยทำการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มด้วยวิธี solution casting ทั้งนี้ น้ำยางธรรมชาติทำหน้าที่เป็นวัตถุประสานเพื่อช่วยในการขึ้นรูปของเซรีซิน ในขณะที่เซรีซินแสดงสมบัติในการช่วยเพิ่มความสามารถในการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ขางธรรมชาติ ผลการศึกษาพบว่า แผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ขางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ขางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ที่พัฒนาขึ้น มีความแข็งแรงและความยืดหยุ่นสูง ทั้งยังสามารถแนบติดกับผิวหนังได้ดีในสภาวะชุ่มน้ำ จึงเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการนำไปผลิตเป็นแผ่นมาร์สหน้า ส่วนการเติมไคตินวิสเกอร์มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสมานแผลให้แก่ผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้พบว่า การผสมไคตินวิสเกอร์ลงในปริมาณน้อย ($\leq 2\%$) มีผลดีต่อการผลิตแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ขางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์หลายประการ ได้แก่ (1) ทำให้การกระจายตัวของเส้นใยไคตินวิสเกอร์ในแผ่นฟิล์มสม่ำเสมอ ซึ่งส่งผลให้ (2) มีความสามารถในการทนแรงดึงยืดสูง และ (3) เพิ่มความสามารถในการปลดปล่อยเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์ม ซึ่งหมายความว่า จะมีปริมาณเซรีซินที่ถูกปลดปล่อยออกมาเพื่อแสดงสมบัติสำคัญ อันได้แก่ ให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว ด้านสารอนุมูลอิสระ และเพิ่มการยืดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังมากขึ้น ทั้งนี้ เซรีซินไม่ได้ถูกปลดปล่อยออกจากแผ่นฟิล์มจนหมด ซึ่งมีข้อดีคือ เซรีซินที่ยังคงเหลืออยู่ในแผ่นฟิล์มจะช่วยทำหน้าที่คงความชุ่มชื้นให้แก่แผ่นฟิล์ม ซึ่งทำให้แผ่นฟิล์มยังคงความอ่อนนุ่มระหว่างใช้งาน นอกจากนี้ ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (human dermal fibroblast) แสดงให้เห็นว่าการนำผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้จริงทางคลินิกมีความปลอดภัยสูง

ข้อเสนอแนะที่คาดว่าจะควรวิจัยเพิ่มเติมและวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยใช้วิธีตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ทั้งหมด (total extractable protein) ซึ่งแปรผันตรงกับโอกาสที่จะทำให้เกิดการแพ้ (Yip et al., 1997) และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ ในการยืนยันความปลอดภัยของการใช้ผลิตภัณฑ์ต่ออาการแพ้ที่อาจเกิดในผู้บริโภค อย่างไรก็ตาม การรายงานผลการทดลองดังกล่าวต่อผู้บริโภคในการต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง อาจทำให้ผู้บริโภคเข้าใจได้ยากเนื่องจากต้องอาศัยทฤษฎีทางวิทยาศาสตร์เข้ามาอธิบาย ผู้วิจัยจึงเสนอแนะว่าควรศึกษาการประเมินความสามารถในการก่อให้เกิดอาการแพ้โดยวิธีการทดสอบทางคลินิก (skin prick test) กับกลุ่มตัวอย่างเพิ่มเติม ซึ่งวิธีที่ง่ายและเหมาะสมกับวัตถุประสงค์ในการนำผลิตภัณฑ์จากงานวิจัยนี้ไปใช้จริงมากที่สุดคือการแปะแผ่นผลิตภัณฑ์ที่ผิวหนัง (patch test) ซึ่งนอกจากจะสามารถชี้แจงข้อมูลความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ให้แก่ผู้บริโภคได้อย่างเห็นภาพชัดเจนแล้ว ยังเป็นวิธีที่ให้ผลที่เฉพาะเจาะจงมากกว่าด้วย โดยมีวิธีทดสอบโดยสังเขป คือ

- แปะแผ่นผลิตภัณฑ์ไว้ที่แผ่นหลังหรือต้นแขนของผู้ทำการทดสอบ แล้วจึงนัดผู้ทำการทดสอบมาแกะแผ่นผลิตภัณฑ์ออก และอ่านผลการทดสอบใน 48–72 ชั่วโมง ต่อมา
- นัดผู้ทำการทดสอบมาอ่านผลทดสอบซ้ำอีกครั้งในวันที่ 7 หลังเริ่มแปะแผ่นผลิตภัณฑ์

ผลงานทางวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

- วารสารวิชาการระดับนานาชาติเรื่อง “Innovative Sericin Film as Skin Care Facial Paper Mask: Utilization of Natural Rubber as a Film Binder and Chitin Whiskers as Nanoscopic Fillers”

สัญญาเลขที่ RDG5350062

โครงการ “การผลิตแผ่นมาร์สหน้าเพื่อใช้เป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลและดูแลผิวหนังจากเซริซินโดยใช้น้ำยางธรรมชาติเป็นวัตถุดิบ และเพิ่มประสิทธิภาพในการสมานแผลโดยการเติมเส้นใยนาโนของไคติน”

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อผลิตแผ่นมาร์สหน้าสำหรับใช้เป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลและดูแลผิวหนัง โดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวประกอบขึ้นจาก เซริซิน ยางธรรมชาติ และเส้นใยนาโนของไคติน (หรือเรียกว่าไคตินวิสเกอร์) เซริซินเป็นโปรตีนธรรมชาติที่มีศักยภาพสูง ทำหน้าที่เป็นกาวผสานเส้นใยในรังไหม โดยคุณสมบัติสำคัญของเซริซินที่เหมาะสมสำหรับการดูแลผิวและบำบัดแผล ได้แก่ ความสามารถในการให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว สมบัติการต้านสารอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย อย่างไรก็ตาม การขึ้นรูปเซริซินบริสุทธิ์ทำได้ยากเนื่องจากเซริซินมีสมบัติทางโครงสร้างที่ไม่แข็งแรง ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงแก้ปัญหาคือการดัดแปลงของเซริซิน โดยการใช้ยางธรรมชาติเป็นวัตถุดิบ เนื่องจาก การขึ้นรูปเป็นฟิล์มของน้ำยางธรรมชาติสามารถทำได้ง่าย อีกทั้งฟิล์มที่ได้ยังมีสมบัติการเหนียวติดกันที่ดี และมีความยืดหยุ่นสูง จึงเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการนำไปผลิตเป็นแผ่นมาร์สหน้า ส่วนการเติมไคตินวิสเกอร์มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสมานแผลให้แก่ผลิตภัณฑ์ สิ่งสำคัญอย่างหนึ่งในงานวิจัยนี้คือการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดอาการแพ้ในผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ ซึ่งพบว่าการใช้วิธีหมั่นเหวี่ยงความเร็วสูงตามด้วยการบำบัดด้วยเอนไซม์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงและสามารถลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางได้ถึง 95% จากนั้นจึงทำการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มเซริซิน/ยางธรรมชาติโดยวิธี solution casting เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเซริซิน/ยางธรรมชาติ ซึ่งได้แก่ อัตราส่วนที่มีปริมาณเซริซินมากที่สุดที่สามารถขึ้นรูปฟิล์มได้ พบว่าสามารถผสมเซริซินได้มากที่สุด 30% (%w/w, เทียบกับน้ำหนักของยางธรรมชาติ) ทั้งนี้เพื่อศึกษาถึงผลของปริมาณเซริซินที่มีต่อสมบัติของแผ่นฟิล์มด้วย จึงเลือกสองอัตราส่วน ได้แก่ ที่ความเข้มข้นของเซริซิน 20% และ 30% มาทำการทดลองต่อโดยผสมไคตินวิสเกอร์ ปริมาณต่างๆ (1–15 %) ลงในแผ่นฟิล์ม ทำการวิเคราะห์เพื่อศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างองค์ประกอบต่างๆ ในแผ่นฟิล์มต่อลักษณะพื้นผิว เอกลักษณะโครงสร้างทางเคมี ความสามารถในการทนแรงดึงยึด และการบวมตัวในน้ำของแผ่นฟิล์ม ศึกษาศักยภาพของการนำแผ่นฟิล์มไปใช้เป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลและดูแลผิวหนังโดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ ด้วยวิธี MTT assay และศึกษาสมบัติในการปลดปล่อยสารเซริซินออกจากแผ่นฟิล์มเพื่อยืนยันว่าเซริซินสามารถถูกปลดปล่อยออกมาเพื่อแสดงคุณสมบัติสำคัญเมื่อนำไปใช้งานจริงได้

คำสำคัญ: แผ่นมาร์สหน้า; เซริซิน; ยางธรรมชาติ; ไคตินวิสเกอร์

RDG5350062

Innovative sericin film as skin care facial paper mask: Utilization of natural rubber as a film binder and chitin whiskers as nanoscopic fillers

ABSTRACT

An innovative skin care facial paper mask composing of silk sericin (SRC), natural rubber (NR), and chitin whisker (CTW) was developed. SRC — a glue-like protein found in silk cocoons — has several beneficial properties for the treatment of skin as well as wound care, such as good skin moisturizing ability, antioxidant, and antimicrobial properties. However, pure SRC is generally difficult to be fabricated due to its weak structural properties. This limitation of SRC was overcome by using NR as a binder because of its excellent ability to form film, good adhesiveness, and flexibility, which are suitable for using as the facial paper mask. CTW was chosen as other component due to its ability to promote tissue repair of wound, thus, could improve the wound healing ability of the products. Importantly, protein in the natural rubber latex (NRL) was removed by centrifugation and enzymatic treatment before the film formation in order to avoid allergic reactions and cytotoxic problems which can be caused by these proteins. By using these techniques, protein content in the NRL could be reduced up to 95% and the obtained NR was called Enzyme-Treated Natural Rubber (ETNR). Consequently, SRC/ETNR blend films were fabricated by solution casting technique. It was observed that maximum amount of SRC contained in the SRC/ETNR films was 30% (%w/w, based on the weight of ETNR). In order to investigate the effect of the SRC content in the blend and the composite films, two conditions of the SRC/ETNR films, i.e. 20% and 30%, were selected for further experiments. After that, SRC/ETNR/CTW films containing 20% or 30% SRC and different contents of CTW (1–15%) were fabricated. The effect of the blend compositions on the surface morphology, chemical structure, mechanical property, and water sorption capacity of the films were determined. The potential for use of the SRC/ETNR/CTW films as skin care facial paper mask was assessed by investigating the cytotoxicity of these materials against human dermal fibroblast cells using MTT assay. In addition, release profiles of the SRC from the SRC/ETNR films and the SRC/ETNR/CTW films containing different contents of the CTW were investigated in order to confirm that the SRC can be released out from the blend and the composite films during use.

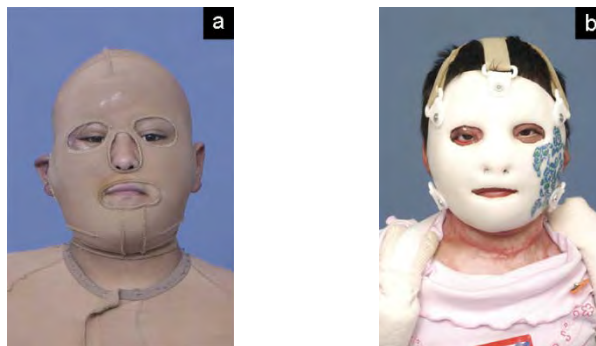
Keywords: Facial paper mask; Sericin; Natural rubber; Chitin whiskers

สัญญาเลขที่ RDG5350062

โครงการ “การผลิตแผ่นมาร์สหน้าเพื่อใช้เป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลและดูแลผิวหนังจากเชริซิน โดยใช้น้ำยางธรรมชาติเป็นวัตถุดิบ และเพิ่มประสิทธิภาพในการสมานแผลโดยการเติมเส้นใยนาโนของไคติน”

คำนำ

ใบหน้า เป็นอวัยวะที่เป็นเอกลักษณ์และเป็นจุดเด่นของร่างกาย มีบทบาทสำคัญในการถ่ายทอดความรู้สึกและอารมณ์ รวมทั้งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างบุคคลได้ การมีผิวหนังที่มีสุขภาพดีจึงมีส่วนให้บุคคลมีความรู้สึกที่ดีต่อตัวเอง รวมทั้งช่วยเสริมสร้างความเชื่อมั่นในการเข้าสังคม ซึ่งนำไปสู่โอกาสและความสำเร็จในด้านอื่นๆ ตามมา การศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีและผลิตภัณฑ์ในการดูแลผิวหนังจึงเป็นเรื่องที่ได้รับความสำคัญมากขึ้นในปัจจุบัน ซึ่งนอกจากจะเป็นการส่งเสริมให้มีสุขภาพผิวที่ดีแล้ว ยังช่วยในการบำบัดดูแลผู้มีปัญหาผิวหนังจากอุบัติเหตุต่างๆ เช่น แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก แผลจากการสัมผัสสารเคมี แผลหลังการผ่าตัด หรือแผลที่เกิดขึ้นหลังการรักษาได้ ทั้งนี้ หลักการสำคัญในการรักษาแผลดังกล่าวคือการทำให้การเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจนซึ่งเป็นส่วนโครงสร้างของผิวหนังมีความสมบูรณ์ ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ที่นำมาใช้ในการรักษาดังกล่าวแล้ว เช่น pressure garment และ facial mask (รูปที่ 2) ซึ่งใช้สวมใส่เพื่อรัดบริเวณแผลที่ได้รับการรักษาใหม่เพื่อป้องกันการเกิดแผลเป็น หรือใช้รัดบริเวณแผลเป็นเพื่อช่วยให้แผลเป็นนั้นลดการขยายตัวและการนูนของแผลเป็นได้ และปัจจัยหลักในการรักษาคือการให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวหนังอย่างเหมาะสม (hydration) ดังนั้นสิ่งสำคัญที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการรักษา คือ สารให้ความชุ่มชื้น (moisturizing agent) แก่ผิว (Villapalos et al., 2008)

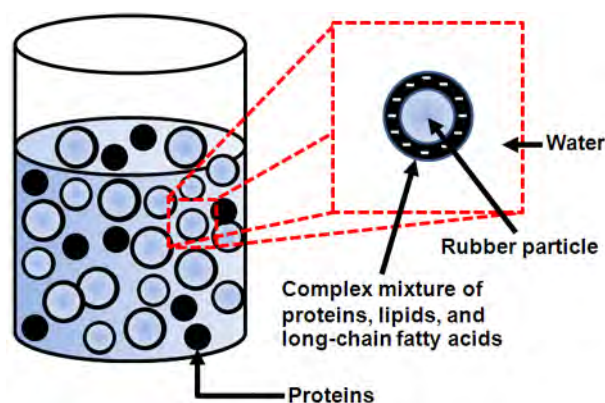


รูปที่ 2 (a) Facial pressure garment และ (b) facial mask ที่ใช้ในผู้ป่วยแผลไฟไหม้

ปัจจุบันเวชภัณฑ์ที่ใช้ในการดูแลผิวหนัง (cosmetic medical treatment) เพื่อบำบัดแผลดังกล่าวข้างต้นส่วนใหญ่ในประเทศไทย นำเข้ามาจากต่างประเทศ ส่งผลให้มีราคาแพง ทำให้ผู้ที่มียารได้น้อยหรือแม้กระทั่งผู้มีรายได้น้อยกลาง ซึ่งเป็นประชากรส่วนใหญ่ของประเทศไม่สามารถซื้อได้ ทำให้เพียงการรักษาแผลให้หายเท่านั้น งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิตแผ่นมาร์สหน้า (facial mask) เพื่อช่วยในการบำบัดแผลและรอยแผลเป็นสำหรับผู้ป่วย โดยการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติที่มีศักยภาพสูงและมีมากในประเทศไทย ได้แก่ ยางพารา เชริซิน (ซึ่งเป็นโปรตีนจากรังไหมธรรมชาติ) และไคติน (สกัดได้จากเปลือกของกุ้งหรือปู ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารทะเล) ดังนั้น การศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์ดังกล่าว นอกจากจะช่วยเพิ่มมูลค่าของทรัพยากรภายในประเทศแล้ว ยังทำให้ได้เวชภัณฑ์บำบัดแผลและดูแลผิวหนังที่มีราคาถูกกว่าผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

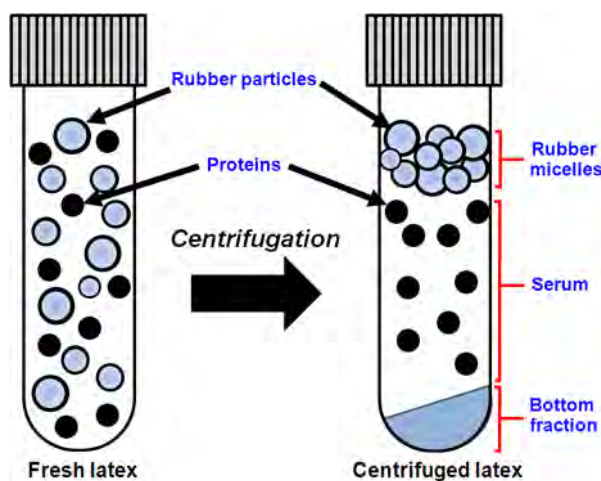
เซรีซิน (sericin) เป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของรังไหม โดยทำหน้าที่เป็นกาวที่ประสานเส้นใยไฟโบรอิน (เส้นใยไหม) ให้รวมตัวกัน ทำให้รังไหมคงรูปและมีลักษณะแข็ง (Dash et al., 2006) ด้วยเหตุนี้การผลิตเส้นไหมสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องนุ่งห่มจึงต้องผ่านกระบวนการต้มลอกกาว (degumming process) เพื่อให้ได้เส้นไหมที่นุ่มและสามารถนำไปเข้ากระบวนการทอต่อไปได้ เซรีซินจึงถูกสกัดออกโดยกระบวนการต้มลอกกาวนี้ ทั้งนี้ มีงานวิจัยที่สามารถสกัดแยกเซรีซินออกจากน้ำที่ปล่อยออกมาจากกระบวนการนี้ได้ (Vaithanomsat and Kitpreechavanich, 2008) เซรีซินเป็นโปรตีนธรรมชาติที่มีศักยภาพสูง ประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด โดย 30% ของกรดอะมิโนเหล่านี้คือซีรีน (serine) ซึ่งจัดเป็นกรดอะมิโนหลักที่เป็นปัจจัยด้านความชื้นทางธรรมชาติ (natural moisture factor-NMF) ของผิวหนังมนุษย์ (Padamwar et al., 2005) เซรีซินจึงเป็นสารให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวที่ดีเยี่ยม นอกจากนี้ยังมีสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Fan et al., 2009) เพิ่มการยึดเกาะและการเจริญเติบโตของเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ (Terada et al., 2005; Tsubouchi et al., 2005) อีกทั้งยังไม่ก่อให้เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรืออาการแพ้ (Zhang et al., 2006) ปัจจุบันจึงมีผลิตภัณฑ์ดูแลผิวหน้าที่มีเซรีซินเป็นส่วนประกอบวางขายบ้างแล้วในท้องตลาด ทั้งในรูปแบบของครีม (เช่น Yuzu Tsuyaya และ Dermaxime) และของเหลว (เช่น Pentapharm) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเซรีซินมีสภาพขี้สูง การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลสูง (ประมาณ 10 ถึง >300 kDa) สามารถละลายน้ำได้ และมีสมบัติทางโครงสร้างที่ไม่แข็งแรง (Marcelino et al., 2007) ทำให้การขึ้นรูปเซรีซินเป็นฟิล์มทำได้ยาก เนื่องจากฟิล์มที่ได้จะมีลักษณะเปราะแตกง่าย การขึ้นรูปเซรีซินจึงต้องอาศัยการผสมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่น เช่น พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (PVA) โคพอลิเมอร์ของพอลิออกซิเอทิลีน-พอลิออกซิโพรพิลีน และกลีเซอริน (Maikrang and Aramwit, 2009) เป็นต้น ซึ่งสามารถผสมเซรีซินได้ในปริมาณที่ไม่มากนัก และต้องใช้สารเชื่อมโยง (crosslinking agent) ซึ่งอาจทำให้เกิดการระคายเคืองหรือเป็นอันตรายต่อเซลล์ผิวหนังได้

น้ำยางธรรมชาติ เป็นทรัพยากรที่สำคัญของประเทศไทย มีรายงานว่าไทยเป็นผู้ผลิตน้ำยางธรรมชาติเป็นอันดับหนึ่งของโลกในปี 2550–2552 (Review of NR market Q3, 2009) แต่อย่างไรก็ตาม น้ำยางธรรมชาติที่ผลิตได้มีราคาไม่สูงนักเมื่อเทียบกับราคาผลิตภัณฑ์อื่นที่ผลิตมาจากน้ำยาง ดังนั้นการสนับสนุนให้มีการเพิ่มมูลค่าของน้ำยางจึงเป็นเรื่องที่ควรให้ความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง จากลักษณะของน้ำยางซึ่งประกอบด้วยอนุภาคยาง (ขนาดประมาณ 5–3000 นาโนเมตร) ที่ถูกล้อมรอบด้วยโปรตีนและไขมัน แขนงลอยอยู่ในน้ำ (Rippel and Galembeck, 2009) (รูปที่ 3) ทำให้สามารถผสมน้ำยางให้เข้ากับสารละลายเซรีซินในน้ำได้ และเนื่องจากลักษณะเด่นของน้ำยางคือการแข็งตัวเมื่อกระทบกับอากาศ และสมบัติที่สำคัญของแผ่นยางที่ได้ คือ มีความยืดหยุ่นสูง ทนต่อแรงดึง ด้านทานต่อการฉีกขาด และสมบัติการเหนียวติดกันที่ดี จึงเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการนำไปผลิตเป็นแผ่นมาร์สหน้าเพื่อใช้เป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลและดูแลผิวหน้า



รูปที่ 3 ลักษณะของน้ำยางซึ่งประกอบด้วยอนุภาคยางที่ถูกล้อมรอบด้วยโปรตีนและไขมัน แขนงลอยอยู่ในน้ำ

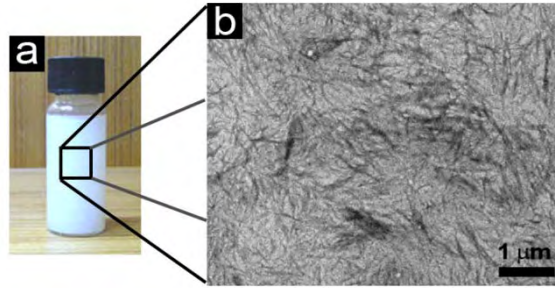
เป็นที่ทราบกันดีว่า น้ำยางสามารถทำให้เกิดอาการแพ้ในคนบางกลุ่มได้ (Turjanmaa, 1997; Woods et al., 1997) อันเป็นเรื่องสำคัญที่ต้องคำนึงถึงในการผลิตเวชภัณฑ์ การแพ้ดังกล่าวเกิดขึ้นได้จาก 2 กรณีคือจากสารเคมี (Type 4 allergy) และจากโปรตีน (Type 1 allergy) ในน้ำยาง (Health and Safety Executive, 2008) โดยการแพ้ซึ่งเกิดจากสารเคมีสามารถหลีกเลี่ยงได้ในขั้นตอนการผลิต ส่วนในกรณีหลัง เนื่องจากโปรตีนส่วนใหญ่ที่อยู่ในน้ำยาง (75%) ละลายอยู่ในส่วนของซีรัม (serum) ในขณะที่ส่วนที่เหลือ (25%) จะล้อมรอบอนุภาคของยางอยู่ (Yip et al., 1995) ดังนั้นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ลดปริมาณโปรตีนได้ คือการหมุนเหวี่ยงเพื่อให้อนุภาคยางเกิดการจับตัวกันแล้วแยกโปรตีนออก (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 วิธีหมุนเหวี่ยง สามารถลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติได้ประมาณ 50% (Perrella and Gaspari, 2002)

อย่างไรก็ตามเพื่อให้การลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางมีประสิทธิภาพสูงขึ้น Perrella และ Gaspari (2002) ได้เสนอวิธีการที่ทำให้โปรตีนทั้งหมดเสื่อมสภาพได้โดยการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โปรติเอส (Protease enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถสลายพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ได้ เนื่องจากวิธีการนี้ทำได้ง่ายและสามารถลดปริมาณโปรตีนลงได้อย่างมีนัยสำคัญ โครงการวิจัยนี้จึงเลือกใช้วิธีการดังกล่าวในการป้องกันการเกิดอาการแพ้ที่อาจเกิดขึ้นจากน้ำยาง

นอกจากนี้ การเพิ่มประสิทธิภาพในการสมานแผลในเวชภัณฑ์ที่ใช้ในการดูแลผิว ยังถือเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่ง ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะทำการเติมเส้นใยนาโนของไคตินหรือเรียกได้อีกชื่อว่าไคตินวิสเกอร์ (chitin whisker) (รูปที่ 5) ลงในแผ่นฟิล์มเซมิคอนดักเตอร์ที่มียางพาราเป็นตัวประสาน ด้วยคุณสมบัติของไคติน ซึ่งได้แก่ความสามารถในการช่วยฟื้นฟูเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลและการเป็นตัวเติมให้ผิวหนัง (dermal filler) ทำให้มีการนำไคตินไปใช้ทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย ทั้งนี้ ไคตินวิสเกอร์มีข้อได้เปรียบกว่าไคตินแบบชิ้นหรือแบบผงทั่วไปคือ อนุภาคนาโนขนาดเล็กระดับนาโนทำให้ไคตินวิสเกอร์มีพื้นที่ผิวมาก จึงสามารถเข้าสัมผัสกับเนื้อเยื่อต่างๆ ในบริเวณที่ต้องการการฟื้นฟูได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการฟื้นฟูสภาพปกติของแผลจึงเกิดได้ดีขึ้น ยิ่งกว่านั้น มีการรายงานว่าไคตินวิสเกอร์ลงในน้ำเกลือแล้วฉีดลงไปในบริเวณผิวหนังซึ่งมีรอยขุ่น สามารถทำให้ผิวหนังบริเวณดังกล่าวกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ ทั้งยังมีระยะเวลาในการคงสภาพที่ยาวนานกว่าการฉีดกรดไฮยาลูรอนิก (hyaluronic acid) ซึ่งเป็นสารที่กระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อต่างๆ บริเวณผิวหนัง และไม่ทำให้เกิดอาการแพ้หรือการระคายเคืองด้วย (Morganti et al., 2006)



รูปที่ 5 ไคตินวิสเกอร์ซึ่ง (a) มีลักษณะเป็นคอลลอยด์ที่ลอยตัวอยู่ในน้ำ และ (b) เป็นเส้นใยนาโนของไคติน
(Wattanaphanit et al., 2008)

ดังนั้น การผลิตแผ่นมาร์สหน้าจากเซรีซินโดยใช้น้ำยางธรรมชาติเป็นวัตถุดิบ และเพิ่มประสิทธิภาพในการสมานแผลโดยการเติมเส้นใยนาโนของไคติน จึงเป็นงานวิจัยที่น่าสนใจ มีความเป็นไปได้สูง ใช้วัตถุดิบและเครื่องมือที่หาได้ง่ายในประเทศไทย ช่วยเพิ่มมูลค่าของทรัพยากร และเป็นการส่งเสริมการพัฒนาเวชภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นใช้เองภายในประเทศอันทำให้เกิดประโยชน์ต่อประชากรของประเทศได้เป็นอย่างดี โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) สกัดเซรีซินจากรังไหม และหาอัตราส่วนและสภาวะที่เหมาะสมในการผสมและขึ้นรูปสารละลายผสมระหว่างเซรีซินและน้ำยางธรรมชาติ เพื่อให้สามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้ (2) สกัดเส้นใยนาโนของไคตินและทำการเพิ่มประสิทธิภาพของแผ่นฟิล์มเซรีซิน/ยางธรรมชาติ ในการสมานแผลและดูแลผิว โดยการผสมเส้นใยนาโนของไคตินในอัตราส่วนต่างๆ และหาอัตราส่วนที่เหมาะสม และ (3) วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของแผ่นฟิล์มที่ได้ ที่สอดคล้องกับการนำไปใช้งานเป็นแผ่นมาร์สหน้า

อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods)

สารเคมี

รังไหมพันธุ์ไทยลูกผสม J108 x นางลาย (ลักษณะรังสีเหลือง เปลือกรงหนา) ซื้อมาจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ (นครราชสีมา) น้ำยางดิบ มาจากยางพาราซึ่งซื้อมาจากเกษตรกรชาวสวนยาง (พัทลุง) กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, HCl) ซื้อมาจาก RCI Labscan (ประเทศไทย) Tris-HCl เกรดอนุชีววิทยา (molecular biology grade) ซื้อมาจาก Scharlau Chemie (บาเซิลนา ประเทศสเปน)

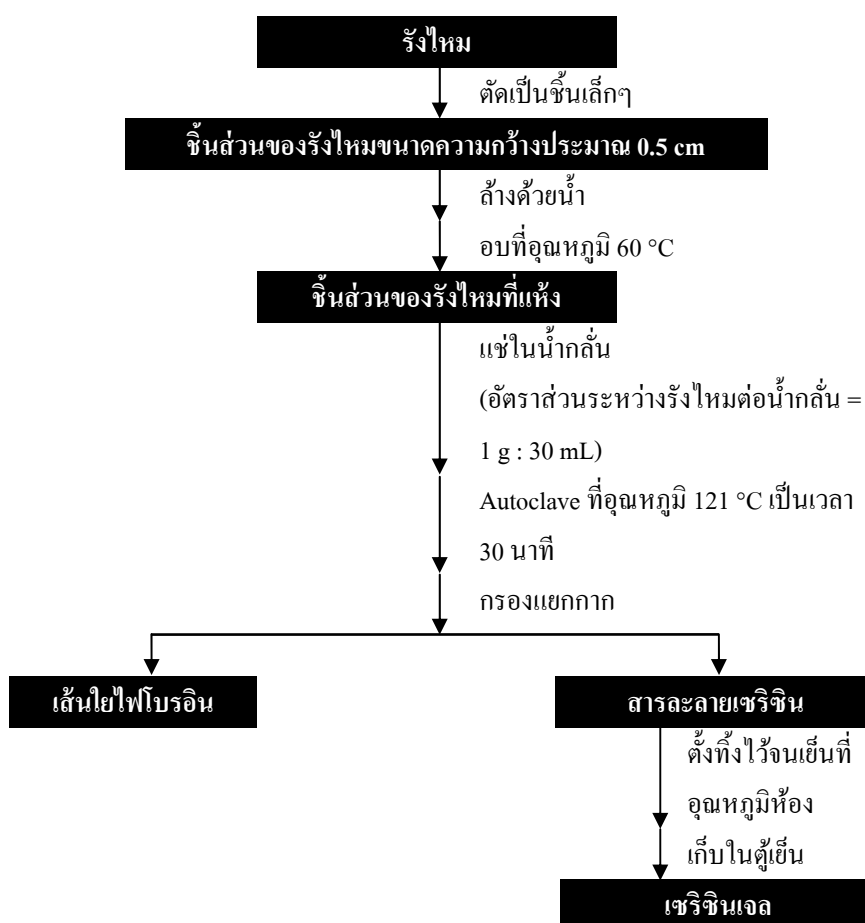
วิธีการ

1. การเตรียมและวิเคราะห์สมบัติของพอลิเมอร์วัตถุดิบ

1.1. เซรีซิน

สารละลายเซรีซินจากรังไหมเตรียมได้โดยนำรังไหมมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดความกว้างประมาณ 0.5 เซนติเมตร จากนั้นจึงทำความสะอาดรังไหมโดยการล้างด้วยน้ำ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C จนแห้ง นำรังไหมที่ได้ไปแช่ในน้ำกลั่นในอัตราส่วนของน้ำหนักของรังไหมต่อปริมาตรของน้ำกลั่นเท่ากับ 1 กรัม ต่อ 30 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยเครื่อง autoclave เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงกรองแยกกากออกจากสารละลาย ส่วนของกากที่แยกออกคือเส้นใยไฟโบรอิน

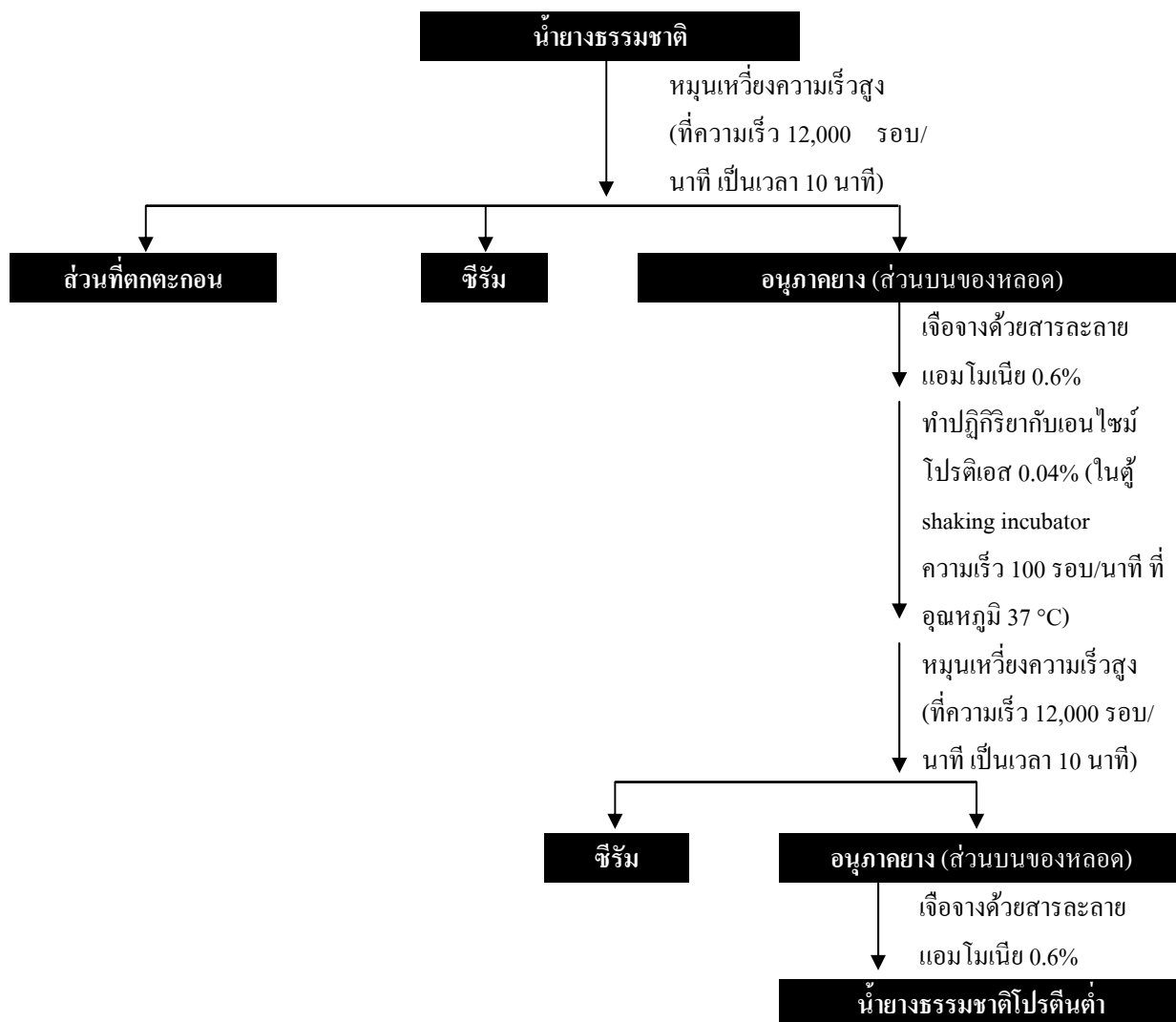
การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เอกลักษณ์ทางเคมีของเซรีซินด้วยเครื่อง FTIR ทำได้โดยนำสารละลายเซรีซินไปอบให้แห้ง จากนั้นจึงนำไปบดกับผงโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) ก่อนนำไปอัดเพื่อขึ้นรูปเป็นแผ่นบาง นำไปเข้าเครื่อง FTIR (Thermo Nicolet Nexus 670 spectrophotometer) โดยใช้อัตราการสแกน (scan rate) 64 สแกนในช่วงเลขคลื่น 4000 ถึง 400 cm^{-1}



รูปที่ 6 แผนผังแสดงขั้นตอนการเตรียมสารละลายเซรีซินที่ใช้ในโครงการวิจัย

1.2. น้ำยางธรรมชาติ

การลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติทำได้โดยวิธีหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (high speed centrifugation) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาโปรตีนในส่วนซีรัมออกจากส่วนของอนุภาคยาง จากนั้นจึงแยกเอาส่วนของอนุภาคยางด้านบนของหลอดไปเจือจางด้วยสารละลายแอมโมเนีย 0.6% ก่อนนำไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โปรติเอส 0.04% ในตู้ shaking incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยทำการปั่นให้สารละลายเคลื่อนที่ตลอดเวลาด้วยความเร็วคงที่ (100 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 4 ชั่วโมงถึง 3 วัน นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง จากนั้นจึงนำส่วนของอนุภาคยางด้านบนไปละลาย

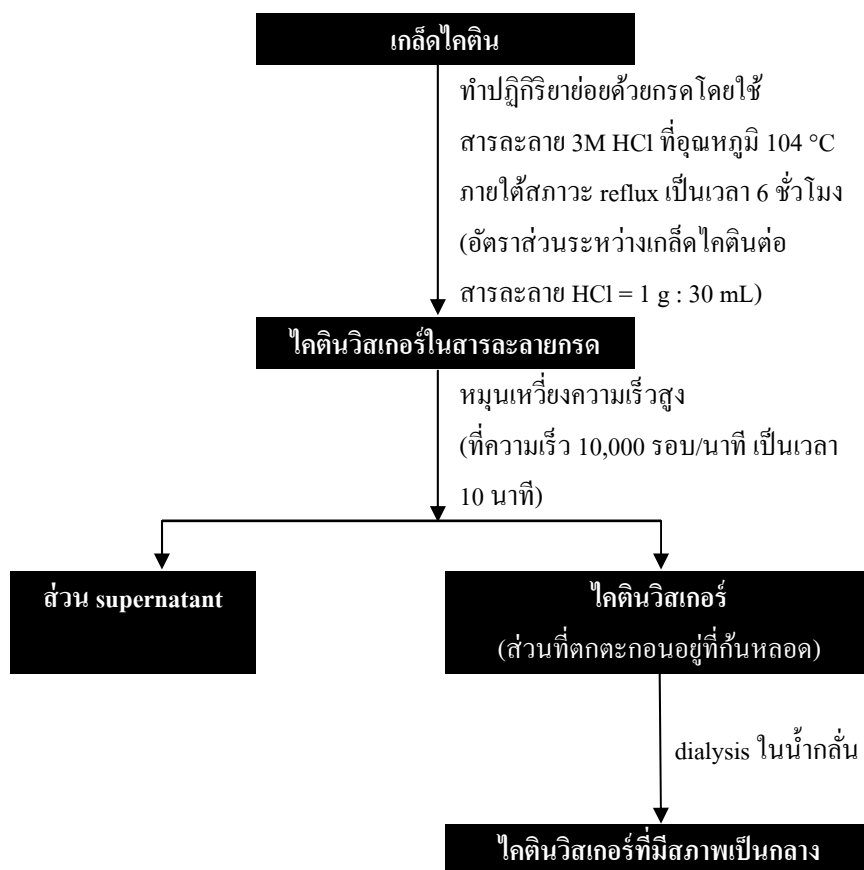


รูปที่ 7 แผนผังแสดงขั้นตอนการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางที่ใช้ในโครงการวิจัย

1.3. ไคตินวิสเกอร์

ไคตินวิสเกอร์เตรียมได้จากการนำไคตินที่สกัดได้จากเปลือกกุ้ง (*Penaeus merguensis*) มาทำปฏิกิริยาย่อยด้วยกรด (acid hydrolysis) ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 3M ที่อุณหภูมิ 104 °C ภายใต้สภาวะ reflux เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (อัตราส่วนระหว่างไคตินต่อกรดไฮโดรคลอริกเท่ากับ 1 กรัม ต่อ 30 มิลลิลิตร) ตามด้วยการหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (high speed centrifugation) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาสารละลายกรดไฮโดรคลอริกออกจากไคตินวิสเกอร์ (ไคตินวิสเกอร์คือส่วนที่ตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด) จากนั้นจึงนำไคตินวิสเกอร์มาทำการแพร่ผ่านเยื่อ (dialysis) ในน้ำกลั่นโดยเปลี่ยนน้ำกลั่นที่ใช้ทุกวัน เพื่อปรับสภาพของวิสเกอร์ให้เป็นกลางก่อนนำไปใช้ แผนผังแสดงขั้นตอนการเตรียมไคตินวิสเกอร์ที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้แสดงในรูปที่ 8

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เอกลักษณ์ทางเคมีของไคตินวิสเกอร์ด้วยเครื่อง FTIR ทำได้โดยนำคอลลอยด์ของไคตินวิสเกอร์ไปอบให้แห้ง จากนั้นจึงนำไปบดกับผงโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) ก่อนนำไปอัดเพื่อขึ้นรูปเป็นแผ่นบางนำไปเข้าเครื่อง FTIR (Thermo Nicolet Nexus 670 spectrophotometer) โดยใช้อัตราการสแกน (scan rate) 64 สแกนที่ช่วงเลขคลื่น 4000 ถึง 400 cm^{-1}



รูปที่ 8 แผนผังแสดงขั้นตอนการเตรียมไคตินวิสเกอร์ที่ใช้ในโครงการวิจัย

2. การเตรียมแผ่นฟิล์มเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์

การทดลองเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเซรีซินต่อยางธรรมชาติในการขึ้นรูปฟิล์ม ทำได้โดยการนำเซรีซินเจลที่เตรียมไว้ไปละลายโดยการให้ความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟ กำลังไฟ 330 วัตต์ เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นจึงผสมสารละลายเซรีซินดังกล่าวกับน้ำยางธรรมชาติภายใต้สภาวะการกวนด้วยความเร็วคงที่ด้วยเครื่อง magnetic stirrer โดยมีปริมาณเซรีซินในแผ่นฟิล์ม 0% ถึง 100% (%w/w, เทียบกับน้ำหนักของยางธรรมชาติ) ทำการขึ้นรูปฟิล์มโดยเทสารละลายผสมที่ได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงใน Petri dish แก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร แล้วอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากได้อัตราส่วนที่เหมาะสมของเซรีซินต่อยางธรรมชาติในการขึ้นรูปฟิล์มแล้ว จึงผสมไคตินวิสเกอร์ในปริมาณต่างๆ (0-30%) ลงในสารละลายเซรีซิน/ยางธรรมชาติ ภายใต้สภาวะการกวนด้วยความเร็วคงที่ด้วยเครื่อง magnetic stirrer แล้วจึงขึ้นรูปฟิล์มโดยวิธีการเดียวกันกับการขึ้นรูปฟิล์มของแผ่นฟิล์มเซรีซิน/ยางธรรมชาติ

3. การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของแผ่นฟิล์ม

3.1. ลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์ม

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) ทำได้โดยนำแผ่นฟิล์มติดลงบนแป้นอลูมิเนียมแล้วนำไปเคลือบแพลทินัมด้วยเครื่อง Ion Sputter (Hitachi E-1010 Ion Sputter) จากนั้นจึงนำไปเข้าเครื่อง SEM (Hitachi S-4800 SEM) โดยใช้ศักย์เร่งอิเล็กตรอนขนาด 2 กิโลโวลต์ และกำลังขยาย 50 และ 200 เท่า

3.2. เอกลักษณะโครงสร้างทางเคมีของแผ่นฟิล์ม

การวิเคราะห์เอกลักษณะทางเคมีของแผ่นฟิล์มด้วยเครื่อง FTIR ทำได้โดยนำฟิล์มดังกล่าวไปเข้าเครื่อง FTIR (Thermo Nicolet Nexus 670 spectrophotometer) ได้เลยโดยใช้อัตราการสแกน (scan rate) 64 สแกนในช่วงเลขคลื่น 4000 ถึง 400 cm^{-1}

3.3. ความสามารถในการทนแรงดึงยืด

ความสามารถในการทนแรงดึงยืดของแผ่นฟิล์มสามารถหาได้โดยใช้เครื่อง Universal Testing Machine (Lloyd, LRX) อ้างอิงตามมาตรฐาน ASTM D 6746 – 08 (Standard Test Method for Determination of Green Strength of Raw Rubber or Unvulcanized Compounds) และ ASTM D 412 – 06a (Standard Test Method for Vulcanized Rubber and Thermoplastic Elastomers—Tension) โดยตัดชิ้นงานเป็นรูปคัมเบลล์ (dumbbell shape) ที่มีความกว้างและความยาวของ spacer 5 mm และ 10 mm ตามลำดับ ความหนาของแผ่นฟิล์มมีค่าตั้งแต่ 0.1 mm ถึง 0.15 mm ระหว่างการทดสอบ ความยาวของระยะทดสอบ (gauge length) คือ 10 mm ขนาดของโหลดเซลล์ (load cell) และอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ (displacement rate) คือ 5 kN และ 50 mm/min ตามลำดับ ทั้งนี้ ค่าที่ได้จากการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบกับชิ้นงานจำนวน 5 ชิ้น

3.4. การบวมตัวในน้ำ

การทดสอบการบวมตัวในน้ำหรือความสามารถในการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์มทำได้โดยตัดแผ่นฟิล์มเป็นรูปวงกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 cm จากนั้นจึงชั่งน้ำหนักแห้งของแผ่นฟิล์ม ก่อนนำแผ่นฟิล์มแต่ละแผ่นไปแช่ในน้ำกลั่นปริมาตร 10 mL ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นฟิล์มที่อิ่มตัวด้วยน้ำมาชั่งด้วยกระดาษทิชชูเพื่อเอาน้ำส่วนเกินออก จากนั้นจึงชั่งน้ำหนักของแผ่นฟิล์มเปียก ร้อยละของการบวมตัวในน้ำหรือความสามารถในการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์มสามารถคำนวณได้จาก **สมการที่ 1**

สมการที่ 1

$$\text{ร้อยละของการบวมตัวในน้ำ} = \frac{\text{น้ำหนักเปียกของแผ่นฟิล์ม} - \text{น้ำหนักแห้งของแผ่นฟิล์ม}}{\text{น้ำหนักแห้งของแผ่นฟิล์ม}} \times 100$$

ทั้งนี้ ค่าที่ได้จากการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบกับชิ้นงานจำนวน 5 ชิ้น

3.5. ความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์

การทดสอบสมบัติทางชีวภาพของแผ่นฟิล์มต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) ใช้วิธี MTT assay แบบ direct contact test โดยทำการทดสอบในห้องทดลอง (*in vitro*) กับเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (human dermal fibroblast) การทดลองนี้อ้างอิงตามมาตรฐาน BS-EN30993-5 และ ISO10993-5 เพื่อประเมินการตอบสนองของเซลล์มนุษย์ต่อสิ่งที่สกัดได้จากชิ้นงานที่ทดสอบ โดยพิจารณาจากการถูกทำลายของเซลล์ วิธี MTT assay มีหลักการคือ เซลล์ที่ใช้ในการทดลองที่ยังมีชีวิตอยู่หลังการสัมผัสกับชิ้นงาน จะยังมีกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) เกิดขึ้น กระบวนการเมตาบอลิซึมนี้สามารถเปลี่ยนสาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งมีสีเหลืองให้เป็นสาร formazan ซึ่งมีสีฟ้า ดังนั้น สามารถใช้ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเป็นตัววัดปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สามารถแบ่งการทดลองได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ

3.5.1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell Culture)

เป็นการเลี้ยงขยายเซลล์ในหลอดทดลองโดยอาศัยอาหารสังเคราะห์ (medium) ซึ่งมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์อย่างครบถ้วน รวมถึงการควบคุมสภาวะต่างๆ (incubation) ที่มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ให้มีความเหมาะสม ในการทดลองนี้ใช้เซลล์ผิวหนังมนุษย์ (human dermal fibroblast cell line) โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่ผสม fetal bovine serum (10%) L-glutamine (2 mL) และยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด คือ penicillin (100 unit/mL) และ streptomycin (100 µg/mL) ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5%

3.5.2. MTT Assay

นำชิ้นงานแต่ละชิ้นซึ่งมีลักษณะเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 cm มาใส่ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 12 ช่อง (12-well plate) จากนั้นจึงนำ suspension ของเซลล์ที่เลี้ยงไว้ข้างต้นมาหยดลงบนผิวหน้าของชิ้นงานที่ความเข้มข้นของเซลล์ 1,000 cell/well/mL นำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปตรวจวัดความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยวิธี MTT assay ซึ่งทำได้โดยเติมสารละลาย MTT ซึ่งละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS (ความเข้มข้น 5 mg/mL) ปริมาตร 200 µL ลงในแต่ละช่องของ 12-well plate ที่มีชิ้นงานและ suspension ของเซลล์ข้างต้น ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนดูดสารละลายจากในแต่ละช่องออกมาเจือจางด้วย isopropanol ปริมาตร 200 µL นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible แบบ microplate reader (Molecular Device) ที่ความยาวคลื่น 570 nm จากนั้นจึงนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย SoftMax Program (Molecular Device) เพื่อหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ ค่าที่ได้จากการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบกับชิ้นงานจำนวน 3 ชิ้น

3.6. การปลดปล่อยเซริซินออกจากแผ่นฟิล์ม

เพื่อเป็นการยืนยันว่าสารเซริซินในแผ่นฟิล์มผสมเซริซิน/ยางธรรมชาติ หรือแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซริซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ สามารถถูกปลดปล่อยออกมาจากแผ่นฟิล์มเพื่อแสดงสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อการรักษาแผลหรือการดูแลผิวหนังที่ตึงเป้าหมายไว้ในโครงการวิจัย จึงทำการทดลองความสามารถในการปลดปล่อยเซริซินออกจากแผ่นฟิล์ม โดยแผ่นฟิล์มผสมเซริซิน/ยางธรรมชาติ หรือแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซริซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ที่ใช้ในการทดสอบ มีลักษณะเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 cm ในแต่ละชุดการทดลองใช้แผ่นฟิล์ม 2 ชิ้น โดยนำไปแช่น้ำหนักก่อนแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl (ความเข้มข้น 0.1 M, pH 7.4) ปริมาตร 5 mL จากนั้นจึงปิดฝาแล้วนำไปใส่ใน shaking incubator ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37 °C ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที ทำการเก็บสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้แช่ชิ้นงานที่ช่วงเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 10 นาทีถึง 2 วัน นำสารละลายดังกล่าวมาวัดปริมาณโปรตีน (เพื่อมาเทียบเป็นปริมาณเซริซิน) โดยใช้ชุด

3.6.1. การเตรียม Calibration Curve

เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของโปรตีนอ้างอิง (bovine serum albumin, BSA) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 nm

3.6.2. การเตรียม Working Reagent

เตรียม working reagent โดยผสม BCA reagent A ปริมาตร 50 mL กับ BCA reagent B ปริมาตร 1 mL working reagent ที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นสีเขียวใส

3.6.3. การหาความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากชิ้นงาน

นำสารละลายบัฟเฟอร์ที่เก็บหลังแช่ชิ้นงานในช่วงเวลาต่างๆ มาทดสอบหาปริมาณโปรตีน โดยเติม Working reagent ปริมาตร 400 μ L ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 20 μ L (อัตราส่วนโดยปริมาตรระหว่าง working reagent ต่อสารที่ต้องการทดสอบ = 20 : 1) เขย่าให้เข้ากันก่อนนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible แบบ microplate reader (TECAN, Infinite M200) ที่ความยาวคลื่น 562 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณกลับเป็นค่าความเข้มข้นตามสมการจาก calibration curve เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากชิ้นงานในแต่ละช่วงเวลาของการแช่ชิ้นงาน จากนั้นจึงคำนวณหาร้อยละของการปลดปล่อยโปรตีน (เซรีซิน) จากชิ้นงาน (% protein release) ตามสมการที่ 2 ค่าที่ได้จากการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบกับชิ้นงานจำนวน 3 ชิ้น

สมการที่ 2

$$\text{ร้อยละของการปลดปล่อยโปรตีน} = \frac{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากชิ้นงาน}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดในชิ้นงาน}} \times 100$$

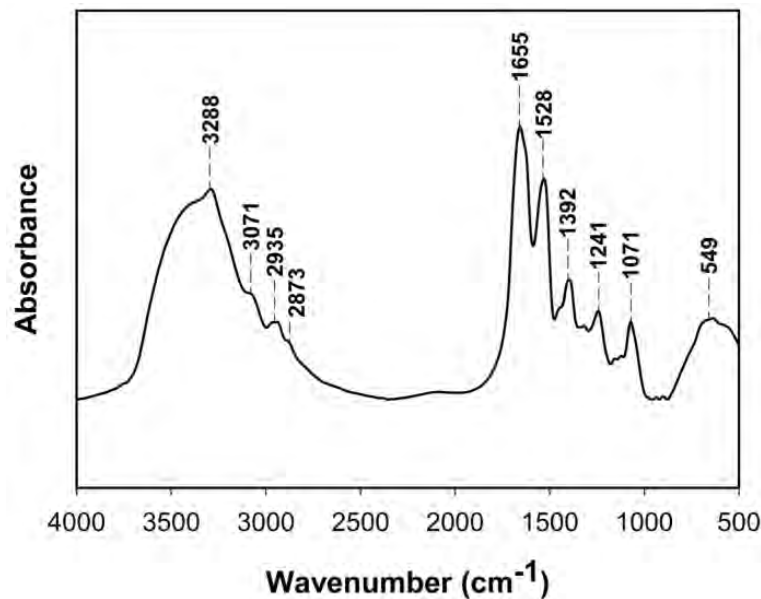
ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดในชิ้นงาน สามารถหาได้จากการนำสารละลายเซรีซินบริสุทธิ์ไปตรวจวัดค่าปริมาณโปรตีนตามวิธีข้างต้น จากนั้นจึงนำค่าที่ได้มาคำนวณเปรียบเทียบกับน้ำหนักของชิ้นงานจริงที่ใช้ในการทดลองในแต่ละชุดการทดลอง

ผลการทดลอง อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง (Results and Discussion)

1. คุณสมบัติของพอลิเมอร์วัตถุดิบ

1.1. เซรีซิน

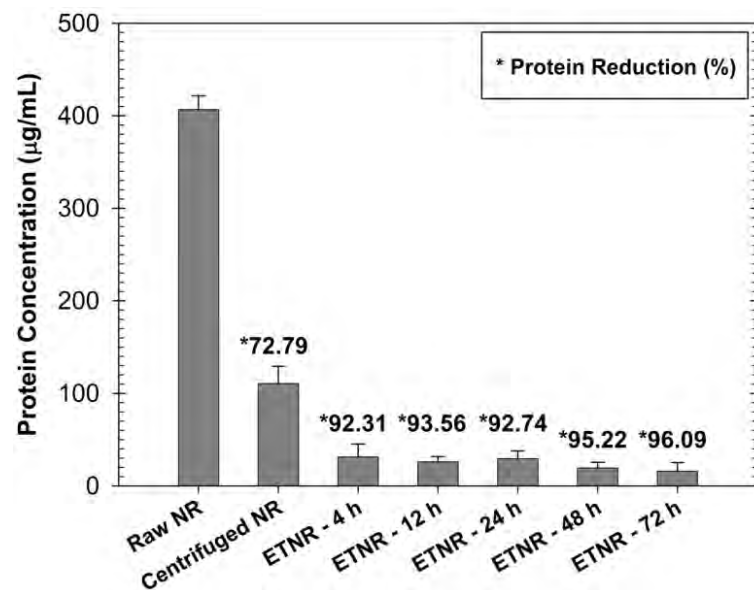
FTIR สเปกตรัมของเซรีซินแสดงในรูปที่ 9 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Sarovart et al., 2003) ยืนยันว่าสารที่ได้คือเซรีซิน



รูปที่ 9 FTIR สเปกตรัมของเซรีซิน

1.2. น้ำยางธรรมชาติ

ผลการทดลองการบำบัดโดยวิธีหมუნเหวี่ยงความเร็วสูงและวิธีบำบัดด้วยเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ พบว่า สามารถสกัดแยกโปรตีนออกจากน้ำยางธรรมชาติได้ตามปริมาณดังแสดงในรูปที่ 10 ทั้งนี้ สามารถสกัดแยกโปรตีนออกจากน้ำยางธรรมชาติได้ประมาณ 95% เมื่อใช้วิธีหมუნเหวี่ยงความเร็วสูงตามด้วยการบำบัดด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถึงแม้ว่าการเพิ่มระยะเวลาในการบำบัดด้วยเอนไซม์เป็น 72 ชั่วโมง จะทำให้สามารถลดปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นได้อีกเป็นประมาณ 96% แต่เนื่องจากการเพิ่มเวลาดังกล่าวทำให้อนุภาคยางจับตัวกันเป็นก้อนมากขึ้นในขั้นตอนการหมუნเหวี่ยงเพื่อแยกอนุภาคยางออกจากซีรัม และก้อนยางดังกล่าวสามารถละลายในสารละลายแอมโมเนีย 0.6% ได้ยากและได้ปริมาณเนื้อยางน้อยลง ดังนั้น จึงเลือกระยะเวลา 48 ชั่วโมง ในการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางเพื่อใช้ในการเตรียมน้ำยางธรรมชาติในโครงการวิจัยนี้ น้ำยางธรรมชาติโปรตีนต่ำที่เตรียมได้มีปริมาณของแข็งในน้ำยางทั้งหมด (solid content) โดยเฉลี่ยประมาณ 36%



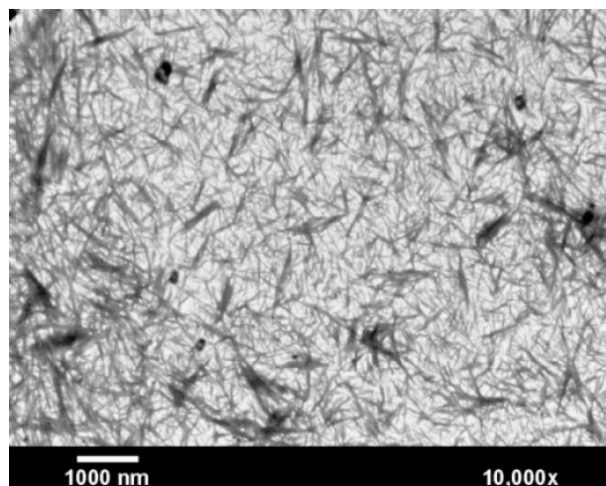
หมายเหตุ : Centrifuged NR = น้ำยางธรรมชาติที่ผ่านการบำบัดโดยวิธีหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง

ETNR (Enzyme Treated Natural Rubber) = น้ำยางธรรมชาติที่ผ่านการบำบัดโดยวิธีหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงตามด้วยวิธีบำบัดด้วยเอนไซม์

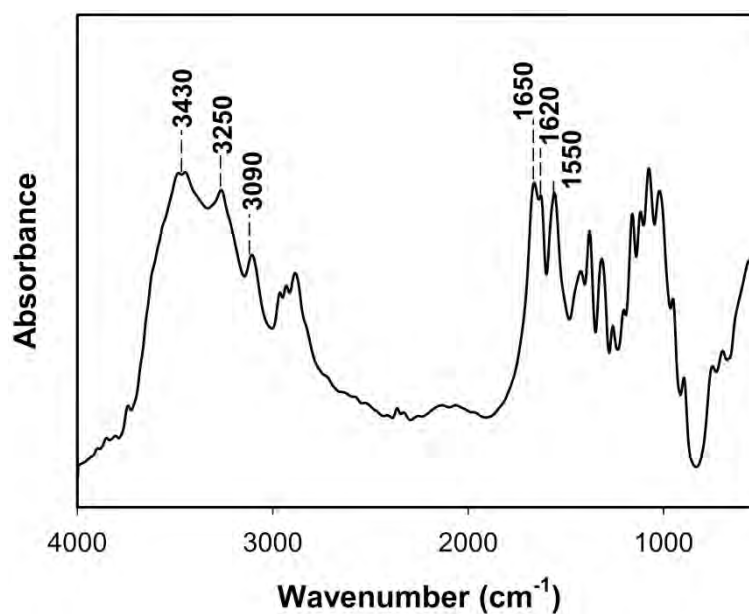
รูปที่ 10 ปริมาณโปรตีนในน้ำยางก่อนและหลังการบำบัดโดยวิธีหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงและวิธีบำบัดด้วยเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

1.3. ไคตินวิสเกอร์

ไคตินวิสเกอร์ที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นคอลลอยด์ในน้ำ มีความเข้มข้นของวิสเกอร์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของคอลลอยด์เฉลี่ยประมาณ 4.5% ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของคอลลอยด์ดังกล่าวด้วยเครื่อง TEM (**รูปที่ 11**) พบว่าประกอบด้วยเส้นใยที่มีขนาดระดับนาโน คือ มีความยาวและความกว้างเฉลี่ย 307 ± 100 nm และ 27 ± 12 nm ตามลำดับ และมีอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้าง (aspect ratio) คิดเป็น 11.37 FTIR สเปกตรัมของไคตินวิสเกอร์แสดงใน**รูปที่ 12** ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้ ([Wattanaphanit et al., 2008](#)) และมีลักษณะของสเปกตรัมแสดงถึงเอกลักษณ์ทางเคมีของไคติน



รูปที่ 11 ภาพ TEM แสดงลักษณะทางกายภาพของไคตินวิสเกอร์



รูปที่ 12 FTIR สเปกตรัมของไคตินวิสเกอร์

2. อัตราส่วนที่เหมาะสมในการเตรียมแผ่นฟิล์มเซลลูโลส/ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซลลูโลส/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์

อัตราส่วนระหว่างเซลลูโลสต่อยางธรรมชาติที่ทำการทดลองและผลการทดลองที่ได้แสดงในตารางที่ 1 ซึ่งพบว่าสามารถขึ้นรูปฟิล์มผสมเซลลูโลส/ยางธรรมชาติได้เมื่อมีปริมาณเซลลูโลสในแผ่นฟิล์มไม่เกิน 30% หากปริมาณเซลลูโลสมากกว่าจำนวนดังกล่าว จะไม่สามารถลอกฟิล์มออกจากโมลด์ได้ ทั้งนี้ อัตราส่วนที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดลองคือ ได้แก่ อัตราส่วนที่มีปริมาณเซลลูโลสมากที่สุดที่สามารถขึ้นรูปฟิล์มได้ และเพื่อศึกษาผลของปริมาณเซลลูโลสในแผ่นฟิล์มต่อคุณสมบัติของแผ่นฟิล์มผสมด้วย จึงเลือก 2 อัตราส่วนมาทำการทดลองต่อ ได้แก่ ที่ความเข้มข้นของเซลลูโลส 20% และ 30%

ตารางที่ 1 ความสามารถในการขึ้นรูปฟิล์มของแผ่นฟิล์มเซรีซิน/ยางธรรมชาติ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของเซรีซิน

ปริมาณเซรีซิน (%w/w, เทียบกับน้ำหนักของยางธรรมชาติ)	0	10	15	20	30	40	50	90	100
ความสามารถในการขึ้นรูปฟิล์ม	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗

ตารางที่ 2 แสดงความสามารถในการขึ้นรูปฟิล์มของแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของไคตินวิสเกอร์

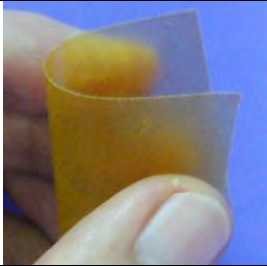
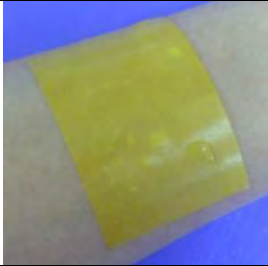
ตารางที่ 2 ความสามารถในการขึ้นรูปฟิล์มของแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของไคตินวิสเกอร์

ความสามารถในการขึ้นรูปฟิล์ม								
ปริมาณไคตินวิสเกอร์ (%w/w, เทียบกับน้ำหนักของยางธรรมชาติ)	0	1	2	5	10	15	20	30
20 %w/w เซรีซิน	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗
30 %w/w เซรีซิน	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗

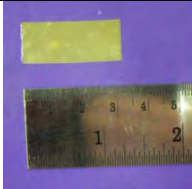
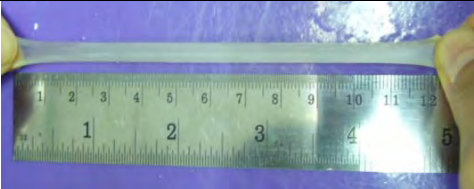
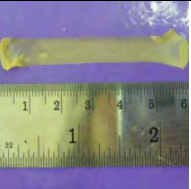
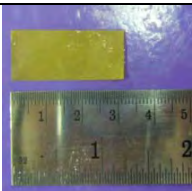
ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถผสมไคตินวิสเกอร์ลงในแผ่นฟิล์ม 20% และ 30% เซรีซิน/ยางธรรมชาติ ได้มากที่สุด 20% และ 15% (%w/w, เทียบกับน้ำหนักของยางธรรมชาติ) ตามลำดับ ทั้งนี้ หากเพิ่มปริมาณไคตินวิสเกอร์ให้มากกว่าจำนวนดังกล่าว ฟิล์มที่ได้จะแตกและไม่สามารถลอกออกจากโมลด์ได้

ส่วนฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ที่สามารถขึ้นรูปได้มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มใสสีเหลือง ซึ่งเมื่อเปียกน้ำจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองขุ่น มีความอ่อนนุ่มและสามารถแนบติดกับผิวหนังได้ดี ทำให้เหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้เป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลและดูแลผิวหนังในรูปแบบของแผ่นมาร์ส ตัวอย่างของแผ่นฟิล์มผสมที่ได้ในสถานะแห้งและเปียกแสดงในตารางที่ 3 ส่วนความสามารถในการทนต่อแรงดึงยืดและความสามารถในการกลับคืนสู่รูปร่างดั้งเดิมของฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์แสดงในตารางที่ 4 จากผลการทดลองในตารางที่ 3 และ 4 แสดงให้เห็นว่า ฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ มีความอ่อนนุ่มและความยืดหยุ่นสูงกว่าฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ทั้งนี้ ได้รายงานสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ต่างๆ ในรูปของค่าแรงดึงจนขาด (stress at break) และค่าการยืดตัวจนขาด (elongation at break) ไว้ในส่วนของการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของแผ่นฟิล์ม

ตารางที่ 3 ลักษณะของแผ่นฟิล์มเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ในสภาวะแห้งและเปียก

	สภาวะแห้ง	สภาวะเปียก
30% เซรีซิน/ยางธรรมชาติ		
30% เซรีซิน/ยางธรรมชาติ + 15% ไคตินวิสเกอร์		

ตารางที่ 4 ความสามารถในการทนต่อแรงดึงยืดและความสามารถในการกลับคืนสู่รูปร่างดั้งเดิมของฟิล์มเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ในสภาวะเปียก

	ก่อนดึงยืด	ขณะดึงยืด	หลังดึงยืด
30% เซรีซิน/ยางธรรมชาติ			
		ค่าการยืดตัว (elongation) = 300%	
30% เซรีซิน/ยางธรรมชาติ + 15% ไคตินวิสเกอร์			
		ค่าการยืดตัว (elongation) = 200%	

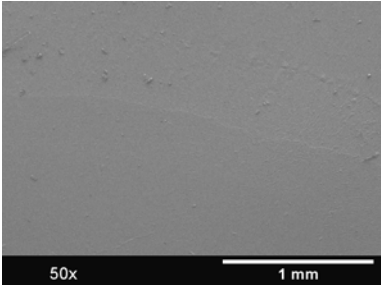
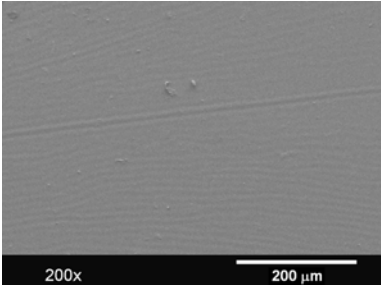
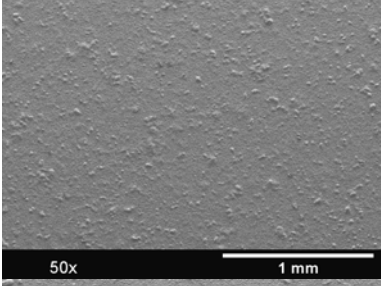
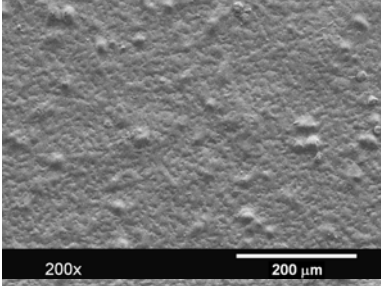
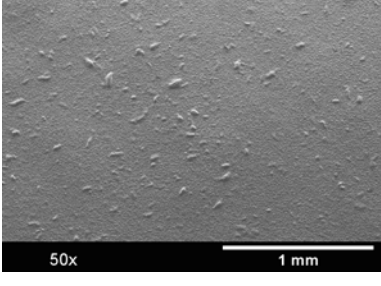
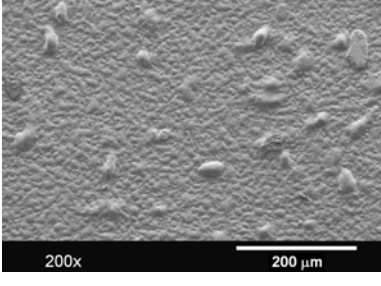
3. สมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของแผ่นฟิล์ม

3.1. ลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์ม

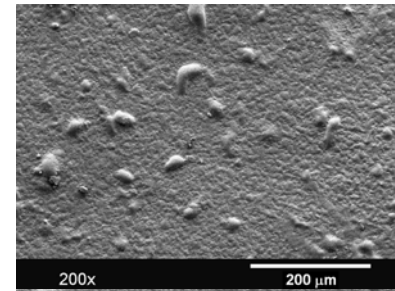
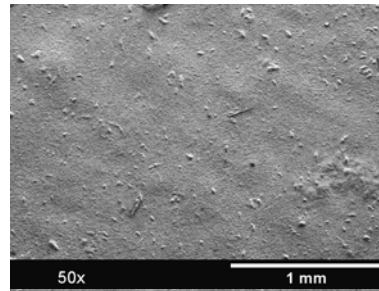
ลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของไคตินวิสเกอร์ โดยมีปริมาณเซรีซินต่อยางธรรมชาติ 20% และ 30% แสดงในตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ จะเห็นว่า แผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ มีลักษณะพื้นผิวขรุขระ ในขณะที่แผ่นฟิล์มยางธรรมชาติบริสุทธิ์มีผิวเรียบ ทั้งนี้อาจเกิดจากความ

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพื้นผิวของแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ จะเห็นว่า พื้นผิวของแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ มีเม็ดเล็กๆ ปรากฏขึ้นในลักษณะแผ่กระจายเมื่อมีปริมาณไคตินวิสเกอร์ผสมอยู่น้อย ($\leq 1\%$) หรือเป็นกลุ่มตุ่มเล็กๆ เมื่อมีปริมาณไคตินวิสเกอร์ผสมอยู่มาก ($\geq 5\%$) และเมื่อเปรียบเทียบโดยภาพรวมมีแนวโน้มว่ากลุ่มตุ่มดังกล่าวจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อปริมาณไคตินวิสเกอร์เพิ่มขึ้น ลักษณะที่เกิดขึ้นนี้อาจมีสาเหตุมาจากการต่อเชื่อมเข้าด้วยกันของอนุภาค (coalescence) ของไคตินวิสเกอร์ จนเกิดเป็นการรวมกลุ่ม (agglomeration) โดยมีอนุภาคยางเป็นสารยึดเหนี่ยว (binder) (Kohjiya et al., 2006; Kohjiya et al., 2008)

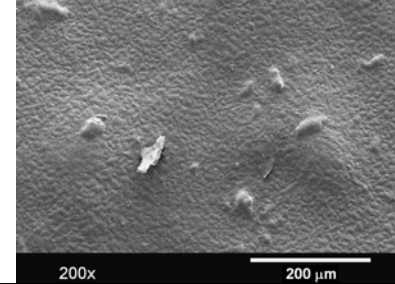
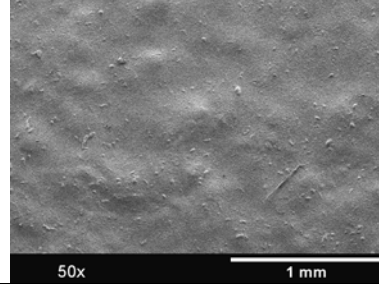
ตารางที่ 5 รูปภาพ SEM แสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ (20% เซรีซิน/ยางธรรมชาติ) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของไคตินวิสเกอร์

ปริมาณไคตินวิสเกอร์ ในแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยาง ธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ (%w/w, เทียบกับน้ำหนักของยางธรรมชาติ)	กำลังขยาย	
	50x	200x
ฟิล์มยางธรรมชาติ		
0		
1		

5



15

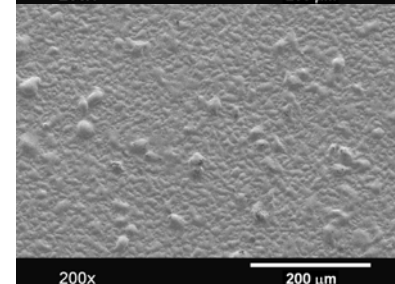
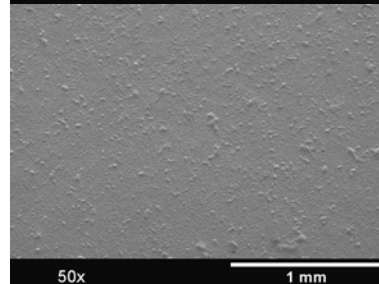
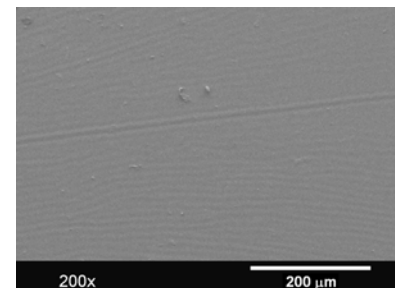
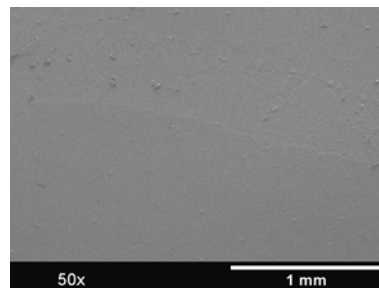


ตารางที่ 6 รูปภาพ SEM แสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ (30% เซรีซิน/ยางธรรมชาติ) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของไคตินวิสเกอร์

ปริมาณไคตินวิสเกอร์	กำลังขยาย	
ในแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ (%w/w, เทียบกับน้ำหนักของยางธรรมชาติ)	50x	200x

ฟิล์มยางธรรมชาติ

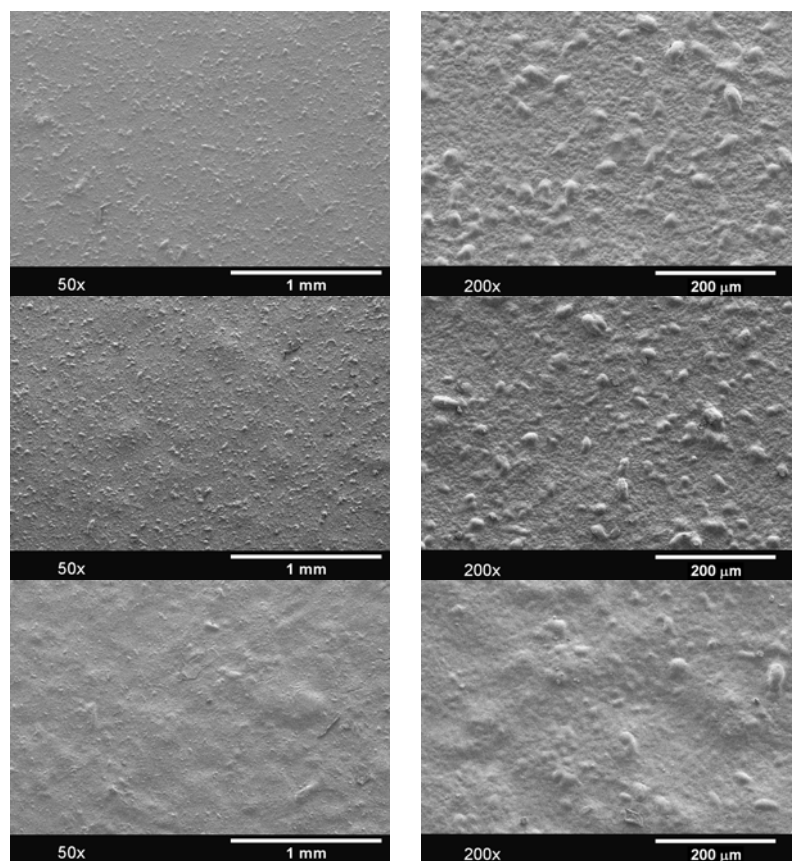
0



1

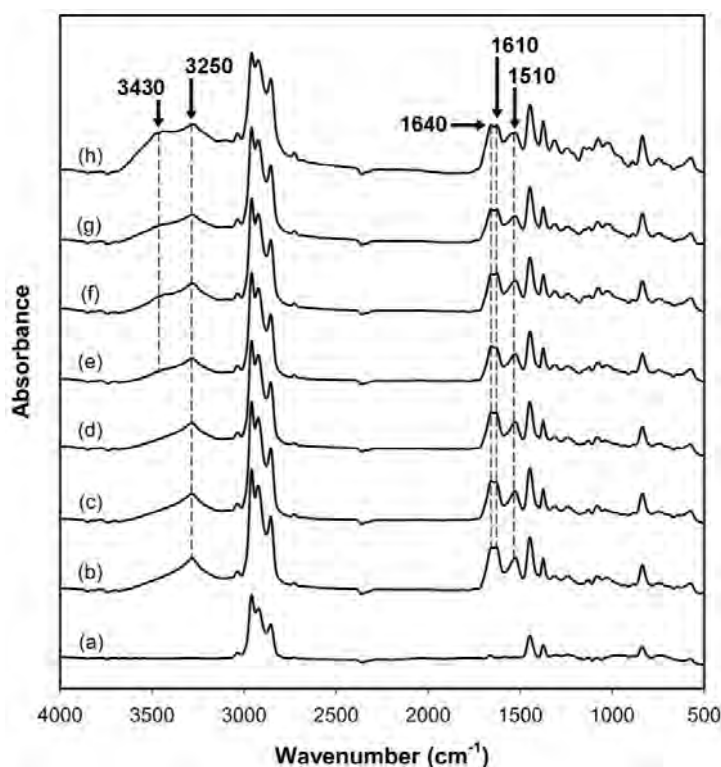
5

15



3.2. เอกลักษณะโครงสร้างทางเคมีของแผ่นฟิล์ม

FTIR สเปกตรัมของฟิล์มยางธรรมชาติบริสุทธิ์ (ที่ผ่านการบำบัดเพื่อลดปริมาณโปรตีนแล้ว) ฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ที่มีปริมาณไคตินวิสเกอร์ต่างๆ แสดงในรูปที่ 13 ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าแถบการดูดกลืนที่แสดงถึงเอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีของเซรีซินปรากฏขึ้นในสเปกตรัมของฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ที่ตำแหน่งเลขคลื่น 3250, 1640, 1610, และ 1510 cm^{-1} ซึ่งเป็นแถบการยืด (stretching) ของ N-H, แถบการยืดของ C=O, แถบการโค้งงอ (bending) ของ N-H ในเอมีน (amine) และในเอไมด์ (amide) II ตามลำดับ (Sarovart et al., 2003; Watthanaphanit et al., 2008; Watthanaphanit et al., 2010) จะเห็นว่าแถบการดูดกลืนของเซรีซินในแผ่นฟิล์มผสมนี้ เลื่อนมาอยู่ที่ตำแหน่งเลขคลื่นต่ำกว่าใน เซรีซินบริสุทธิ์ (ดูรูปที่ 2) แต่เนื่องจากทั้งเซรีซินและไคตินวิสเกอร์แสดงเอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีที่บริเวณแถบการดูดกลืนใกล้เคียงกัน จึงไม่สามารถอธิบายการเกิดอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างสารซึ่งเป็นสาเหตุของการเลื่อนตำแหน่งของเลขคลื่นดังกล่าวได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม ความสูงของแถบการดูดกลืนที่แสดงถึงเอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีของไคตินที่ 3430 cm^{-1} (แถบการยืดของ N-H และ O-H) เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณไคตินวิสเกอร์เพิ่มขึ้น อันเป็นการยืนยันการมีอยู่และปริมาณที่เพิ่มขึ้นของไคตินวิสเกอร์ในแผ่นฟิล์มเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ได้อย่างชัดเจน



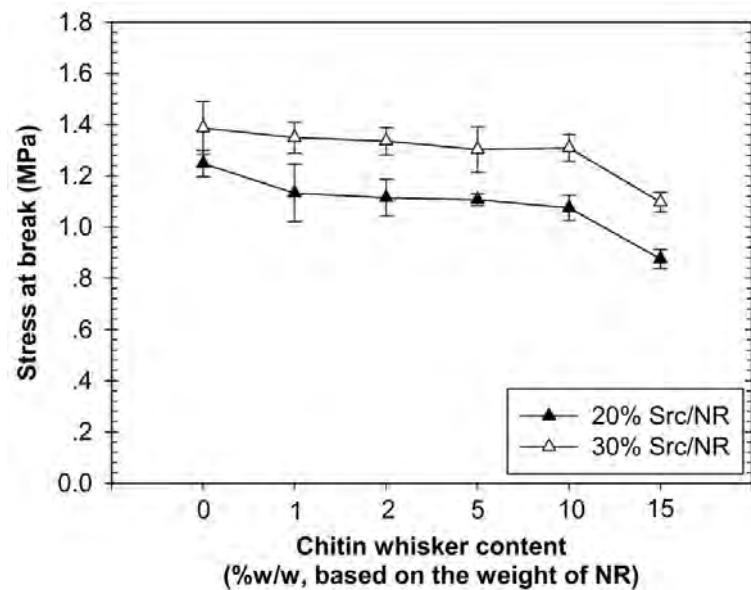
รูปที่ 13 FTIR สเปกตรัมของ (a) फिल्मยางธรรมชาติบริสุทธิ์ (b) फिल्मผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และ फिल्मคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ที่มีปริมาณไคตินวิสเกอร์ (c) 1%, (d) 2%, (e) 5%, (f) 10%, (g) 15%, และ (h) 20% (%w/w, เทียบกับน้ำหนักของยางธรรมชาติ) โดยมีปริมาณเซรีซินต่อยางธรรมชาติ 20%

3.3. ความสามารถในการทนแรงดึงยืด

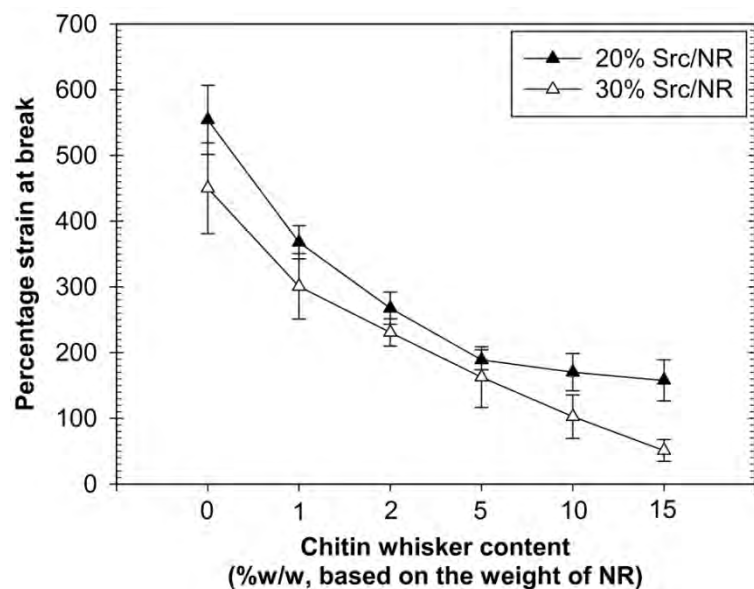
ความสามารถในการทนแรงดึงยืดของแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ต่างๆ แสดงในรูปของค่าแรงดึงจนขาด (stress at break) และค่าการยืดตัวจนขาด (elongation at break) โดยมีผลการทดสอบดังแสดงใน **รูปที่ 14** ผลการทดสอบการทนต่อแรงดึงจนขาด (**รูปที่ 14A**) แสดงให้เห็นว่า แผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 30% ให้ค่าการทนต่อแรงดึงจนขาดสูงกว่าแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 20% ในขณะที่ค่าแรงดึงจนขาดของฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ จะลดลงเมื่ออัตราส่วนของไคตินวิสเกอร์เพิ่มขึ้น ซึ่งเมื่อพิจารณาจากผลของลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์ม (**ตารางที่ 5 และ 6**) แสดงให้เห็นว่า การลดลงของค่าแรงดึงจนขาดเมื่อปริมาณไคตินวิสเกอร์เพิ่มขึ้นเกิดจากการจับกันเป็นก้อนของไคตินวิสเกอร์ ซึ่งมีผลให้การรวมเป็นเนื้อเดียวกันของยางธรรมชาติกับไคตินวิสเกอร์ไม่ดีพอ ทำให้ความสามารถในการดูดซับพลังงานลดลง

สำหรับแนวโน้มของค่าความยืดหยุ่นของชิ้นงานซึ่งดูได้จากค่าการยืดตัวจนขาด (elongation at break) (**รูปที่ 14B**) พบว่าแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 20% ให้ค่าการยืดตัวจนขาดสูงกว่าแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 30% เนื่องจากมีสัดส่วนของยางธรรมชาติซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ให้สมบัติความยืดหยุ่นต่อแผ่นฟิล์มสูงกว่า นอกจากนี้ ค่าการยืดตัวจนขาดของฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ จะลดลงเมื่ออัตราส่วนของไคตินวิสเกอร์เพิ่มขึ้น เนื่องจากสัดส่วนของยางธรรมชาติลดลงและ การจับกันเป็นก้อนของไคตินวิสเกอร์ที่เพิ่มขึ้นทำให้มีรอยต่อระหว่างก้อนของวิสเกอร์ซึ่งเป็นบริเวณที่แผ่นฟิล์มเกิดการขาดได้ง่ายเพิ่มมากขึ้นด้วย

A



B

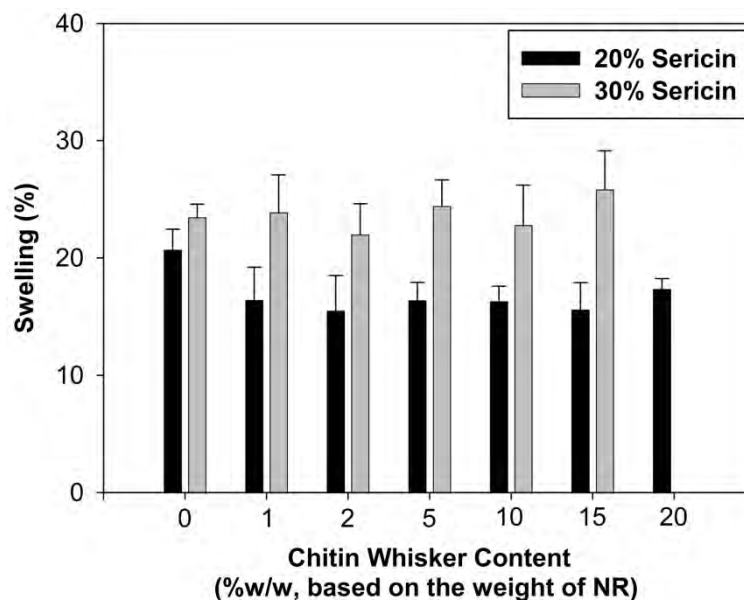


รูปที่ 14 ความสามารถในการทนแรงดึงยืดของแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเชริซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ต่างๆ ในรูปของ (A) ค่าแรงดึงจนขาด (stress at break) และ (B) ค่าการยืดตัวจนขาด (elongation at break)

3.4. การบวมตัวในน้ำ

ค่าการบวมตัวในน้ำของแผ่นฟิล์มซึ่งแสดงถึงความสามารถในการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์มแสดงในรูปที่ 15 ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงผลของปริมาณเชริซิน (20% และ 30%) พบว่า แผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเชริซิน/ยางธรรมชาติ 30% มีค่าการบวมตัวในน้ำสูงกว่าแผ่นฟิล์มที่มีปริมาณเชริซิน 20% อย่างเห็นได้ชัด ผลการทดลองนี้ยืนยันว่าเชริซินเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ช่วยเพิ่มความสามารถในการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์มผสมเชริซิน/ยางธรรมชาติ ดังนั้น จึงสามารถดูดซับเลือดและน้ำหนองที่หลั่งออกมาจากบาดแผลได้ในกรณีที่นำไปใช้งานเป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผล ในขณะที่เดียวกันสามารถทำหน้าที่เป็นสารให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวได้ด้วย

เมื่อพิจารณาถึงผลของปริมาณไคตินวิสเกอร์ที่มีต่อการบวมตัวในน้ำของแผ่นฟิล์ม พบว่า ค่าการบวมตัวในน้ำของแผ่นฟิล์มที่ความเข้มข้นต่างๆ ของไคตินวิสเกอร์ในแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 30% ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่การเติมไคตินวิสเกอร์ลงในแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 20% ทำให้ค่าการบวมตัวในน้ำลดลง อย่างไรก็ตาม ปริมาณไคตินวิสเกอร์ที่เพิ่มขึ้นไม่ได้ส่งผลให้ค่าการบวมตัวในน้ำของแผ่นฟิล์มเกิดการเปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์มเป็นผลมาจากปริมาณของเซรีซินในแผ่นฟิล์มเป็นหลัก



รูปที่ 15 ค่าการบวมตัวในน้ำของแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 20% และ 30% ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของไคตินวิสเกอร์

3.5. ความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์

ผลการประเมินความเป็นไปได้ในการนำแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้จริงทางคลินิก โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (human dermal fibroblast) ด้วยวิธี MTT assay แสดงใน **ตารางที่ 7**

จาก **ตารางที่ 7** แสดงให้เห็นว่า หลังเซลล์ทดสอบสัมผัสกับชิ้นงานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ยังมีค่า $>70\%$ และสูงถึง $>90\%$ ในบางกลุ่มตัวอย่างชิ้นงาน ซึ่งสูงกว่าค่าที่ยอมรับได้คือ $\geq 50\%$ อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางโดยวิธีหมั่นเหวี่ยงความเร็วสูงตามด้วยการบำบัดด้วยเอนไซม์ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง และการนำผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นไปใช้จริงทางคลินิกมีความปลอดภัยสูง เนื่องจากไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์

ตารางที่ 7 ร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ทดสอบ human dermal fibroblast หลังสัมผัสกับชิ้นงานแผ่นฟิล์มยางธรรมชาติที่ผ่านการลดปริมาณโปรตีนแล้ว แผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชิ้นงาน	ร้อยละการมีชีวิตอยู่ (% cell viability)
แผ่นฟิล์มยางธรรมชาติบริสุทธิ์ที่ผ่านการลดปริมาณโปรตีน	89 ± 4
แผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ (20% เซรีซิน)	73 ± 2
แผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ (1% ไคตินวิสเกอร์)	91 ± 2
แผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ (5% ไคตินวิสเกอร์)	99 ± 3
แผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ (15% ไคตินวิสเกอร์)	98 ± 5

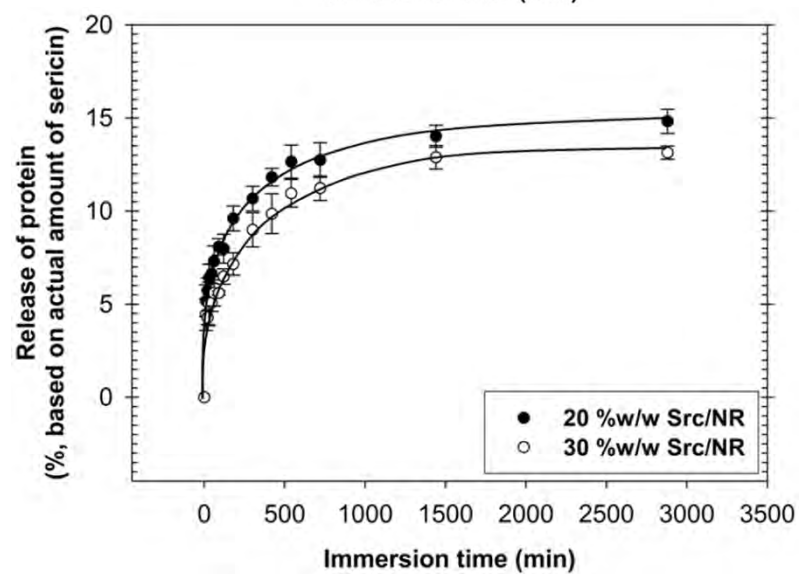
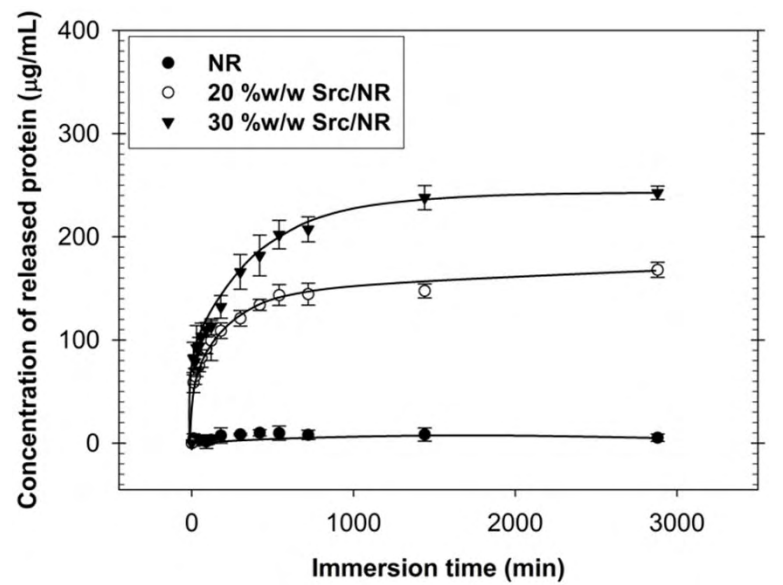
3.6. การปลดปล่อยเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์ม

การทดลองเพื่อศึกษาสมบัติในการปลดปล่อยสารเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การศึกษาถึง (1) ผลของปริมาณเซรีซิน และ (2) ผลของปริมาณไคตินวิสเกอร์ โดยในแต่ละการทดลองได้รายงานผลการคำนวณในรูปของความเข้มข้น และร้อยละของเซรีซินที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากแผ่นฟิล์ม (เทียบกับปริมาณเซรีซินทั้งหมดที่มีในแผ่นฟิล์ม) ผลการทดลองการปลดปล่อยเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์มแสดงใน **รูปที่ 16** โดย **รูปที่ 16A** แสดงผลของปริมาณเซรีซินต่อการปลดปล่อยเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์ม และ **รูปที่ 16B** แสดงผลของปริมาณไคตินวิสเกอร์ต่อการปลดปล่อยเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์ม

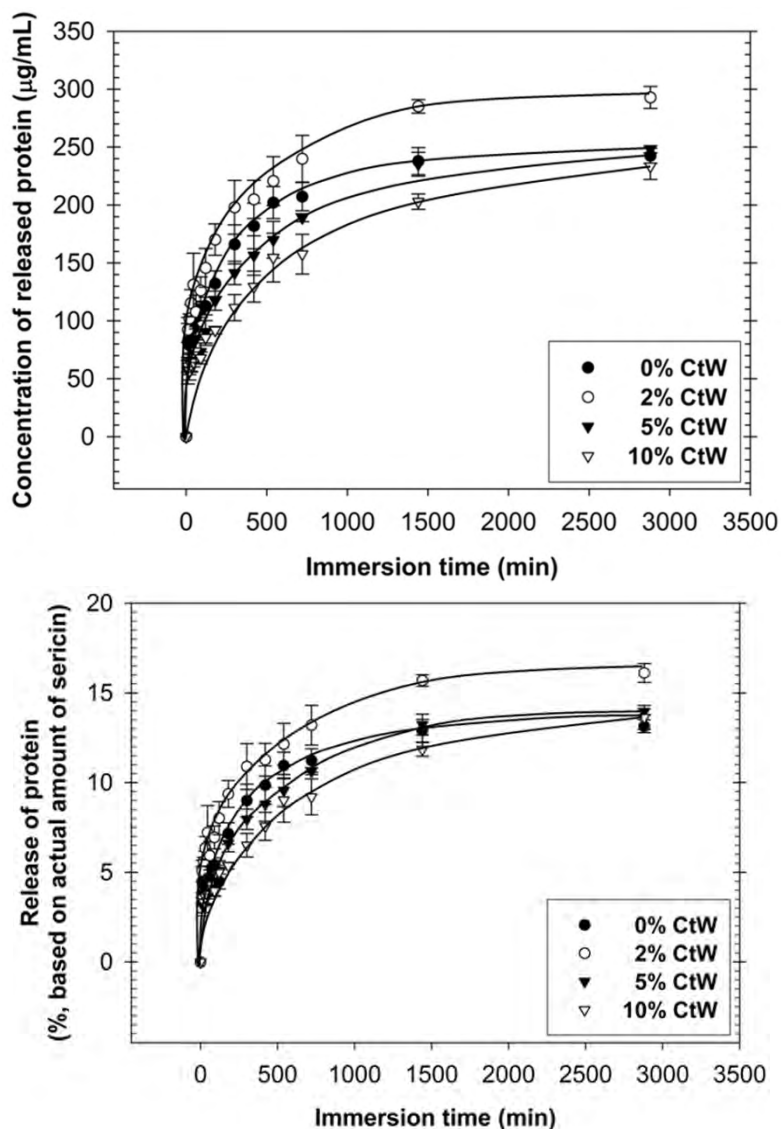
จาก **รูปที่ 16A** พบว่า ในขณะที่แผ่นฟิล์มยางธรรมชาติไม่แสดงการปลดปล่อยโปรตีนออกมาจากแผ่นฟิล์ม โปรตีนถูกปลดปล่อยออกมาจากแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติอย่างช้าๆ และต่อเนื่อง ทั้งในแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 20% และ 30% โดยมีเซรีซินที่ถูกปลดปล่อยออกมาเป็นเวลา 2 วันในปริมาณ 170 $\mu\text{g/mL}$ และ 240 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาเป็นโปรตีนจากเซรีซิน อย่างไรก็ตาม พบว่าค่าที่ได้จากการคำนวณในรูปร้อยละของเซรีซินมีร้อยละการปลดปล่อยของเซรีซินจากแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 20% สูงกว่าใน 30% คือ คิดเป็น 15% และ 13.5% ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของปริมาณไคตินวิสเกอร์ที่มีต่อการปลดปล่อยเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์ม (**รูปที่ 16B**) พบว่าแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ที่มีอัตราส่วนของไคตินวิสเกอร์น้อย (ได้แก่ 2%) แสดงปริมาณเซรีซินที่ถูกปลดปล่อยจากแผ่นฟิล์มสูงสุด (สูงกว่าแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติที่ไม่มีไคตินวิสเกอร์) แต่เมื่อปริมาณไคตินวิสเกอร์เพิ่มขึ้น (5% และ 10%) กลับทำให้ปริมาณเซรีซินที่ถูกปลดปล่อยจากแผ่นฟิล์มลดลง ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าการกระจายตัวของเส้นใยไคตินวิสเกอร์อย่างสม่ำเสมอในแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ที่มีอัตราส่วนของไคตินวิสเกอร์ 2% ช่วยเพิ่มความสามารถในการปลดปล่อยเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์ม เนื่องจากไคตินวิสเกอร์ไปขัดขวางการเกิดอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างเซรีซินในส่วนของเมทริกซ์ ทำให้เซรีซินถูกปลดปล่อยออกมาได้ง่ายขึ้น ในขณะที่เมื่อปริมาณไคตินวิสเกอร์เพิ่มขึ้น ไคตินวิสเกอร์มีแนวโน้มจะจับตัวกันเป็นก้อนมากขึ้น และเซรีซินเองก็มีแนวโน้มจะรวมตัวกันมากขึ้นเช่นกัน ทำให้ปริมาณเซรีซินที่ถูกปลดปล่อยออกมาลดลง ดังนั้น จึงอาจสรุปได้ว่าการผสมไคตินวิสเกอร์ลงในปริมาณน้อยมีผลดีต่อการผลิตแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์หลายประการ ได้แก่ (1) ทำให้การกระจายตัวของเส้นใยไคตินวิสเกอร์ในแผ่นฟิล์มสม่ำเสมอ ซึ่งส่งผลให้ (2) มีความสามารถในการทน

A



B



รูปที่ 16 ความเข้มข้นและร้อยละการปลดปล่อยของเซรีซินจากแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ในรูปของ (A) ผลของปริมาณเซรีซิน และ (B) ผลของปริมาณไคตินวิสเกอร์ ที่มีต่อการปลดปล่อยสารเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์ม

สรุปผลการทดลอง (Conclusion)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาแผ่นมาร์สหน้าสำหรับใช้เป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลและดูแลผิวหนัง ซึ่งประกอบขึ้นจาก เซรีซิน ยางธรรมชาติ และเส้นใยนาโนของไคติน โดยทำการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มด้วยวิธี solution casting ทั้งนี้ น้ำยางธรรมชาติทำหน้าที่เป็นวัตถุประสานเพื่อช่วยในการขึ้นรูปของเซรีซิน ในขณะที่เซรีซินแสดงสมบัติในการช่วยเพิ่มความสามารถในการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ ผลการศึกษาพบว่า แผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ที่พัฒนาขึ้น มีความแข็งแรงและความยืดหยุ่นสูง ทั้งยังสามารถแนบติดกับผิวหนังได้ดีในสภาวะชุ่มน้ำ จึงเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการนำไปผลิตเป็นแผ่นมาร์สหน้า ส่วนการเดิม

เอกสารอ้างอิง (References)

- Dash, R., Mukherjee, S., Kundu, S.C. Isolation, purification and characterization of silk protein sericin from cocoon peduncles of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. International Journal of Biological Macromolecules, 38 (2006), 255–258.
- Fan, J.B., Wu, L.P., Chen, L.S., Mao, X.Y., Ren, F.Z. Antioxidant activities of silk sericin from silkworm *Bombyx mori*. Journal of Food Biochemistry, 33 (2009), 74–88.
- Health and Safety Executive. (2008) About latex allergies. Retrieved December 12, 2009 from <http://www.hse.gov.uk/latex/about.htm>.
- Kohjiya, S., Kato, A., Suda, T., Shimanuki, J., Ikeda, Y. Visualization of carbon black networks in rubberymatrix by skeletonisation of 3D-TEM image. Polymer, 2006, 47, 3298–301.
- Kohjiya, S., Kato, A., Ikeda, Y. Visualization of nanostructure of soft matter by 3D-TEM: Nanoparticles in a natural rubber matrix. Progress in Polymer Science, 2008, 33, 979–997.
- Maikrang, K., Aramwit, P. Preparation of sericin film with different polymers. 13th International Conference on Biomedical Engineering, 23 (2009), 1356–1358.
- Marcelino, L.G., Liu, L., Feng, X. Sericin/PVA blend membranes for pervaporation separation of ethanol/water mixtures. Journal of Membrane Science, 295 (2007), 71–79.
- Morganti, P., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C. Multifunctional use of innovative chitin derivatives for skin care. Journal of Applied Cosmetological, 24 (2006), 105–114.
- Padamwar, M.N., Pawar, A.P., Daithankar, A.V., Mahadik, K.R. Silk sericin as a moisturizer: an *in vivo* study. Journal of Cosmetic Dermatology, 4 (2005), 250–257.
- Perrella, F.W., Gaspari, A.A. Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. Methods, 27 (2002), 77–86.
- Review of Natural Rubber Market, A quarterly publication of the Association of Natural Rubber Producing Countries, Kuala Lumpur, January–September 2009.

- Rippel, M.M., Galembeck, F. Nanostructures and adhesion in natural rubber: New era for a classic. Journal of the Brazilian Chemical Society, 20 (2009), 1024–1030.
- Sarovart, S., Sudatis, B., Meesilpa, P., Grady, B. P., Magaraphan, R. The use of sericin as an antioxidant and antimicrobial for polluted air treatment. Reviews on Advanced Materials Science, 2003, 5, 193–198.
- Terada, S., Sasaki, M., Yanagihara, K., Yamada, H. Preparation of silk protein sericin as mitogenic factor for better mammalian cell culture. Journal of Bioscience and Bioengineering, 100 (2005), 667–671.
- Tsubouchi, K., Igarashi, Y., Takasu, Y., Yamada, H. Sericin enhances attachment of cultured human skin fibroblasts. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 69 (2005), 403–405.
- Turjanmaa, K. Natural rubber latex allergy: Clinical manifestations (including contact dermatitis) and diagnosis. Revue Francaise D'Allergologie ET D'Immunologie Clinique, 37 (1997), 1177–1179.
- Vaithanomsat, P., Kitpreechavanich, V. Sericin separation from silk degumming wastewater. Separation and Purification Technology, 59 (2008), 129–133.
- Villapalos, J.L., Jeschke, M.G., Herndon, D.N. Review: Topical management of facial burns. Burns, 34 (2008), 903–911.
- Wattanaphanit, A., Supaphol, P., Tamura, H., Tokura, S., Rujiravanit, R. Fabrication, structure, and properties of chitin whisker-reinforced alginate nanocomposite fibers. Journal of Applied Polymer Science, 2008, 110, 890–899.
- Wattanaphanit, A., Supaphol, P., Tamura, H., Tokura, S., Rujiravanit, R. Wet-spun alginate/chitosan whiskers nanocomposite fibers: Preparation, characterization and release characteristic of the whiskers. Carbohydrate Polymers, 2010, 79, 738–746.
- Woods, J.A., Lambert, S., Thomas, Platts-Mills, T.A.E., Drake, D.B., Edlich, R.F. Natural rubber latex allergy: Spectrum, diagnostic approach, and therapy. The Journal of Emergency Medicine, 15 (1997), 71–85.
- Yip, E., Poon, N.K., Lang, M.K., Turjanmaa, K. in: Latex Protein Allergy: The Latest Position. European Rubber Journal, Paris, 1995.
- Yip, E., Palosuo, T., Alenius, H., Turjanmaa, K. Correlation between total extractable proteins and allergen levels of natural rubber latex gloves. Journal of Natural Rubber Research, 12 (1997), 120–130.
- Zhang, Y.Q., Ma, Y., Xia, Y.Y., Shen, W.D., Mao, J.P., Xue, R.Y. Silk sericin–insulin bioconjugates: synthesis, characterization and biological activity. Journal of Control Release, 115 (2006), 307–315.

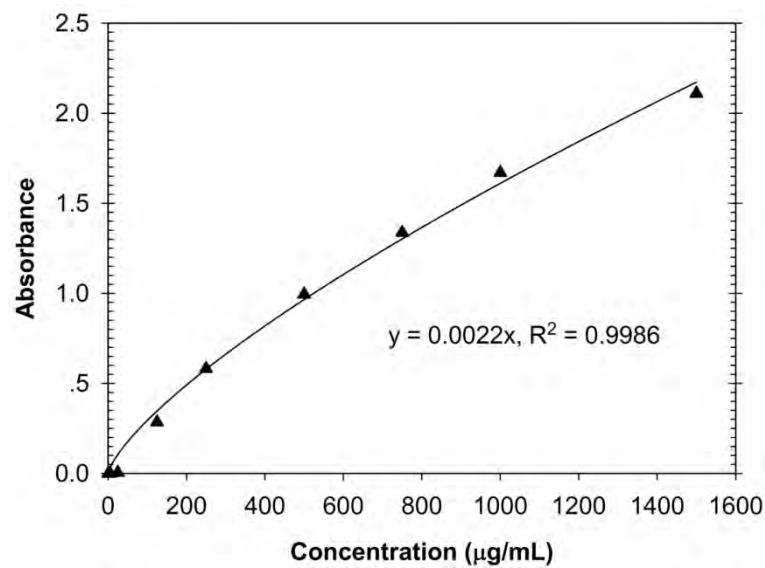
ภาคผนวก

ข้อมูลสนับสนุนผลการทดลอง (Supported Data)

การลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ

ค่าแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนอ้างอิง (Bovine Serum Albumin, BSA) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm ตามวิธี Modified Lowry ที่ใช้ในการทำ calibration curve เพื่อหาปริมาณโปรตีนในน้ำยาง

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbance
1	0
5	0
25	0.00492
125	0.28496
250	0.58197
500	0.99489
750	1.33774
1000	1.66989
1500	2.10972



Calibration curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนอ้างอิง (BSA) และค่าการดูดกลืนแสง UV (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 750 nm

ปริมาณโปรตีนในน้ำยางก่อนและหลังการบำบัด โดยวิธีหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงและวิธีบำบัดด้วยเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

Sample	Absorbance	Protein concentration (µg/mL)	Average	SD
Raw NR	0.86237	391.9863636	406.7969697	14.85244806
	0.92772	421.6909091		
	0.89477	406.7136364		
Centrifuged NR	0.20775	94.43181818	110.6742424	18.8541473
	0.23373	106.2409091		
	0.28897	131.3500000		
ETNR - 4h	0.04692	21.32727273	31.3030303	13.93346522
	0.05579	25.35909091		
	0.10389	47.22272727		
ETNR - 12h	0.04523	20.55909091	26.18787879	5.5003049
	0.0582	26.45454545		
	0.06941	31.55000000		
ETNR - 24h	0.04673	21.24090909	29.51969697	8.192323222
	0.06533	29.69545455		
	0.08277	37.62272727		
ETNR - 48h	0.02907	13.21363636	19.46515152	6.02973406
	0.05554	25.24545455		
	0.04386	19.93636364		
ETNR - 72h	0.05574	25.33636364	15.90757576	9.317960456
	0.0345	15.68181818		
	0.01475	6.704545455		

หมายเหตุ Centrifuged NR = น้ำยางธรรมชาติที่ผ่านการบำบัดโดยวิธีหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง

:

ETNR (Enzyme Treated Natural Rubber) = น้ำยางธรรมชาติที่ผ่านการบำบัดโดยวิธีหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงตามด้วยวิธีบำบัดด้วยเอนไซม์

จากค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนในน้ำยางสามารถหาร้อยละของปริมาณโปรตีนที่ลดลงจากน้ำยางดิบ (% Protein reduction) ได้จากสมการ

$$\text{ร้อยละของปริมาณโปรตีนที่ลดลง} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนในน้ำยางดิบ} - \text{ปริมาณโปรตีนที่ผ่านการบำบัดแล้ว}}{\text{ปริมาณโปรตีนในน้ำยางดิบ}} \times 100 \quad \#$$

สมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม

Stress at break (MPa)

20% Src/NR	N = 5	Average	SD
0% CTW	1.252395156 1.247639389 1.163862725 1.270165997 1.305247943	1.247862242	0.052122673
1% CTW	1.006976587 1.017558742 1.182307508 1.207461248 1.247074995	1.132275816	0.112020952
2% CTW	1.00060989 1.085608101 1.147954132 1.164829464 1.171745051	1.114149328	0.071997073
5% CTW	1.126156805 1.104421971 1.132926057 1.097097132 1.073277198	1.106775833	0.023879033
10% CTW	1.017827465 1.154364072 1.068568897 1.05899539 1.073668506	1.074684866	0.049664217
15% CTW	0.847858018 0.829275237 0.923456702 0.887088424 0.88915872	0.87536742	0.03715312

Stress at break (MPa)

30% Src/NR	N= 5	Average	SD
0% CTW	1.399058813 1.232597556 1.501541576 1.347498846 1.45156702	1.386452762	0.10348073
1% CTW	1.33441196 1.413533768 1.263998452 1.400002786 1.334104457	1.349210285	0.060053354
2% CTW	1.332297187 1.245940921 1.349619531 1.371792525 1.378596169	1.335649267	0.053396544
5% CTW	1.174276233 1.324793524 1.26531272 1.339801476 1.410728697	1.30298253	0.088635371
10% CTW	1.267486841 1.296339697 1.254856586 1.363826357 1.362980588	1.309098014	0.05180473
15% CTW	1.050294881 1.133483183 1.086302812 1.074821751 1.139528336	1.096886193	0.038494447

Percentage strain at break (%)

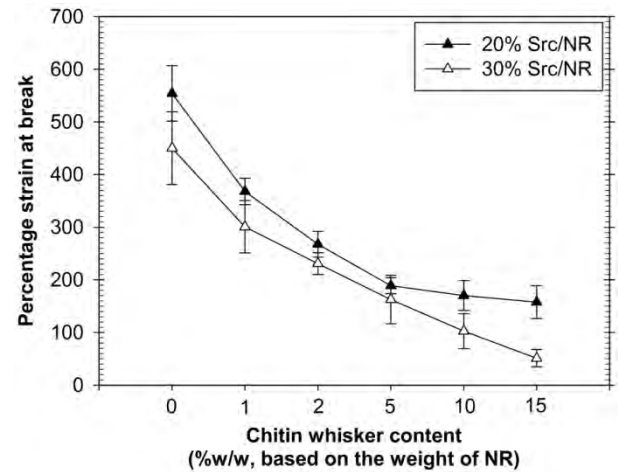
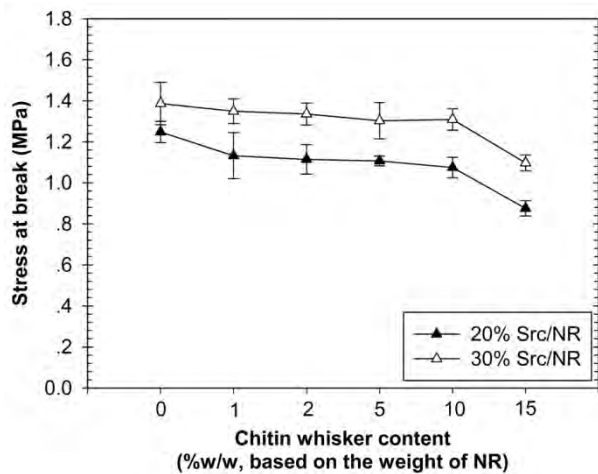
20% Src/NR	N = 5	Average	SD
0% CTW	609.4047405 494.1783532 605.9351406 548.2115827 513.0418152	554.1543264	52.57502524
1% CTW	336.23757 391.3807563 373.6196811 390.9222431 347.5304054	367.9381312	25.1570414
2% CTW	283.1891838 225.6389826 273.4973609 286.5663929 268.8979629	267.5579766	24.49453222
5% CTW	204.4830803 169.6837454 200.8978751 193.1886388 176.7200161	188.9946711	15.18836279
10% CTW	197.1542915 192.9865067 176.5383042 128.6614576 155.8454031	170.2371926	28.36120088
15% CTW	179.0853078 136.9418395 142.6236909 201.8953504 128.5856402	157.8263657	31.29026531

Percentage strain at break (%)

30% Src/NR	N = 5	Average	SD
0% CTW	475.6881891 342.7351348 520.4903664 425.3253086 486.2657483	450.1009494	69.02629946
1% CTW	260.9183453 329.302774 322.3269347 236.880517 354.8695637	300.8596269	49.68793535
2% CTW	243.9689714 221.6717102 202.6128302 256.4906452 229.5678309	230.8623976	20.69282511
5% CTW	225.6787595 165.0887836 146.0050606 99.05714109 177.6095506	162.6878591	46.1612903
10% CTW	106.9045671 136.8685797 132.0447872 69.13661545 68.04171258	102.5992524	33.06786083
15% CTW	67.61826996 59.48197869 61.89700897 32.18526823 34.6264826	51.16180169	16.49856788

Average values of stress at break and percentage strain at break

Sample	Stress at Break (MPa)		Percentage Strain at Break	
	Average	SD	Average	SD
20% Src/NR				
0% CTW	1.247862242	0.052122673	554.1543264	52.57502524
1% CTW	1.132275816	0.112020952	367.9381312	25.1570414
2% CTW	1.114149328	0.071997073	267.5579766	24.49453222
5% CTW	1.106775833	0.023879033	188.9946711	15.18836279
10% CTW	1.074684866	0.049664217	170.2371926	28.36120088
15% CTW	0.87536742	0.03715312	157.8263657	31.29026531
30% Src/NR				
0% CTW	1.386452762	0.10348073	450.1009494	69.02629946
1% CTW	1.349210285	0.060053354	300.8596269	49.68793535
2% CTW	1.335649267	0.053396544	230.8623976	20.69282511
5% CTW	1.30298253	0.088635371	162.6878591	46.1612903
10% CTW	1.309098014	0.05180473	102.5992524	33.06786083
15% CTW	1.096886193	0.038494447	51.16180169	16.49856788



ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ ดำเนินการมา และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

เดือนที่	แผนกิจกรรมที่สอดคล้องกับวัตถุประสงค์	ผลที่คาดว่าจะได้รับ (Output)	ผลสำเร็จ
1-3	การเตรียมและวิเคราะห์คุณสมบัติของพอลิเมอร์วัตถุดิบ	• เจลของเซริซิน • น้ำยางธรรมชาติที่มีปริมาณโปรตีนต่ำ • ค่าแสดงปริมาณโปรตีนในน้ำยางหลังการสกัดแยก • คอลลอยด์ของไคตินวิสเกอร์ • รูปภาพแสดงลักษณะและขนาดเส้นใยนาโนของไคติน (TEM)	100%
4-6	การเตรียมแผ่นฟิล์มเซริซินโดยใช้น้ำยางธรรมชาติเป็นวัตถุดิบและการผสมเส้นใยนาโนของไคตินลงในแผ่นฟิล์มเซริซิน/ยางธรรมชาติ	• แผ่นฟิล์มเซริซิน/ยางธรรมชาติ • แผ่นฟิล์มเซริซิน/ยางธรรมชาติ ที่มีเส้นใยนาโนของไคตินกระจายตัวอยู่	100%
7-9	การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของแผ่นฟิล์ม - การศึกษาผลของเส้นใยนาโนของไคตินต่อลักษณะพื้นผิวและ โครงสร้างทางเคมีของแผ่นฟิล์ม	• รูปภาพแสดงลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์ม (SEM) • กราฟแสดงโครงสร้างทางเคมีของแผ่นฟิล์ม (FTIR)	100%
10-12	การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของแผ่นฟิล์ม - การศึกษาผลของเส้นใยนาโนของไคตินต่อความแข็งแรงและการบวมตัวของแผ่นฟิล์ม	• กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเส้นใยนาโนของไคตินในแผ่นฟิล์มกับค่าการยืดตัวจนขาด (% elongation at break) และค่าความสามารถในการทนแรงดึงยึดของแผ่นฟิล์ม (tensile strength) • กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเส้นใยนาโนของไคตินในแผ่นฟิล์มกับค่าการบวมตัวของแผ่นฟิล์ม (swelling behavior)	100%
13-15	การศึกษาคผลของแผ่นฟิล์มที่มีต่อพฤติกรรมของเซลล์	• รูปภาพแสดงรูปร่างของเซลล์ผิวหนัง (fibroblast cell) ที่ถูกเลี้ยงบนแผ่นฟิล์ม • กราฟแสดงผลของแผ่นฟิล์มต่อปริมาณของเซลล์ผิวหนัง	-

16-18	การวิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง	● รายงานฉบับสมบูรณ์ ● ต้นแบบผลิตภัณฑ์แผ่นมาร์สหน้า (facial mask) เพื่อใช้ในการบำบัดแผลและรอยแผลเป็นสำหรับผู้ป่วย	100%
-------	-------------------------------	---	------

นอกจากนี้ เนื่องจากมีงบประมาณและระยะเวลาเพียงพอ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการปลดปล่อยเซริซินออกจากแผ่นฟิล์มผสมเซริซิน/ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซริซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ เพิ่มเติม เพื่อเป็นการยืนยันว่าสารเซริซินในแผ่นฟิล์มผสมเซริซิน/ยางธรรมชาติ หรือแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซริซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ สามารถถูกปลดปล่อยออกมาจากแผ่นฟิล์มเพื่อแสดงสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อการรักษาแผลหรือการดูแลผิวหนังตามที่ตั้งเป้าหมายไว้ในโครงการวิจัย

บทความสำหรับเผยแพร่

Innovative Sericin Film as Skin Care Facial Paper Mask: Utilization of Natural Rubber as a Film Binder and Chitin Whiskers as Nanoscopic Fillers

Anyarat Watthanaphanit¹ and Ratana Rujiravanit^{1, 2*}

¹The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Abstract

An innovative skin care facial paper mask composing of silk sericin (SRC), natural rubber (NR), and chitin whisker (CTW) was developed. SRC — a glue-like protein found in silk cocoons — has several beneficial properties for the treatment of skin as well as wound care, such as good skin moisturizing ability, antioxidant, and antimicrobial properties. However, pure SRC is generally difficult to be fabricated due to its weak structural properties. This limitation of SRC was overcome by using NR as a binder because of its excellent ability to form film, good adhesiveness, and flexibility. In addition, CTW was chosen as another component due to its ability to promote tissue repair of wound. Before the film formation, protein in the natural rubber latex (NRL) was removed by centrifugation and enzymatic treatment in order to avoid allergic reactions and cytotoxicity problems. The ETNR/SRC sponges having different blend compositions were fabricated by solution casting technique and then the compositions having high SRC content which the film could be formed was selected, i.e., 20% and 30% SRC. After that, ETNR/SRC/CTW containing 20% or 30% SRC and different contents of CTW were fabricated. The effect of the blend compositions on the surface morphology, chemical structure, mechanical property, and water sorption capacity of the films was determined. In addition, release profiles of the SRC from the ETNR/SRC films and the ETNR/SRC/CTW films containing different content of the CTW were investigated.

Keywords: Facial paper mask; Sericin; Natural rubber; Chitin whiskers

1. Introduction

The face is the central point of the physical features of the human being. It transmits expressions and emotions, communicates feelings and allows for individual identity. Cosmetic medical treatments of face therefore have become increasingly popular over the past decade. The treatments are important not only for beauty but also for facial problem such as facial burns and facial scar. In order to mature the scar and redistribute the structure of the collagen fibers, the option of pressure garment fitting and facial mask fitting are available. The most likely mechanism of actions for facial treatment is hydration, thus skin moisturizing agent is important ([Villapalos et al., 2008](#)). Presently, most of cosmetic medical treatments used in Thailand are imported from foreign countries resulting in a high cost of materials. Therefore, it is unaffordable for poor even some moderate people. This project thus aims to develop the novel skin care facial paper mask by utilizing the waste products as well as an abundant resource found in Thailand.

Silk, a natural macromolecular protein produced by Lepidopteron insects of the family Bombycidae and Saturniidae, has been widely used in textile industries because of its glossy surface and desirable mechanical properties. The silk fiber is mainly composed of a fibrous protein (fibroin) core, with a glue protein (sericin) surrounding it ([Dash et al., 2006](#)). Fibroin is the protein that forms the filament of silkworm and gives its unique physical and chemical properties while most of sericin much be removed as a waste during the degumming process of silk manufacturing ([Vaithanomsat and Kitpreechavanich, 2008](#)). Over 30 countries produce silk. The cocoon production is about 1 million tons (fresh weight) worldwide and this is equivalent to 400,000 ton of dry cocoon which produces about 50,000 tons of sericin. In Thailand, the silk production is originated in northeastern and the production is about 5,000 tons in 2005. Therefore, if sericin can be utilized to make a value-added product developed from the waste, it will represent a significant source of profit as well as diminish the pollution problem.

Sericin (SRC) is hydrophilic in nature. It contains 18 amino acids including essential amino acids and 30% is serine which is the main amino acid of natural moisture factor (NMF) in human skin ([Padamwar et al., 2005](#)). SRC is thus an excellent moisturizing agent. The small SRC peptides are soluble in cold water while the larger ones are soluble in hot water. It has sol-gel property as it easily dissolves in hot water and again returns to gel on cooling. SRC is well-recognized as an antioxidant ([Fan et al., 2009](#)), It has a strong affinity to keratin and forms a moisturizing, semioclusive, protective,

anti-wrinkle film on the skin surface, imparting an immediate, long lasting, smooth, silky feeling. Some reports suggest that SRC enhances attachment and growth of human skin fibroblast cells (Terada et al., 2005; Tsubouchi et al., 2005). Furthermore, *in vivo* experiments showed that the SRC peptides have no immunogenicity and can be used effectively in biomedical applications (Zhang et al., 2006). Because of the aforementioned unique properties of SRC, SRC containing products are available as cream (e.g., Yuzu Tsuyaya, Dermaxime) and liquid (e.g., Pentapharm) for facial treatment.

However, SRC has been always neglected in the field of tissue engineering due to its weak structural properties and high water solubility. SRC are known to form fragile films and scaffolds that are difficult to fabricate because SRC is amorphous by nature owing to its wide range of molecular weights, ranging from 10 to over 300 kDa (Marcelino et al., 2007). As a result, researchers have blended SRC with other natural or synthetic polymers such as polyvinyl alcohol, polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer, and glycerine to fabricate 2D and 3D matrices (Maikrang et al., 2009). Mandal et al. (2009) reported the fabrication of 3D sericin/gelatin scaffolds and 2D films using non-mulberry *Antheraea mylitta* silk cocoon SRC protein. Both scaffold and film formation is feasible using glutaraldehyde and 12 N HCl as crosslinking and group-activating agents, respectively. Although the crosslinking agent is present, the researchers mentioned that, caution was exercised in handling pure SRC films as they could break easily. Work related to an attempt on fabrication of SRC film by avoiding the usage of toxic chemicals for both extraction and crosslinking was done. Dash et al. (2009) reported that silk gland SRC protein has a potential as a SRC source for the film formation without the crosslinking agent but specification of the material's part means limitation on its quantity.

Natural rubber (NR) is an elastic hydrocarbon polymer usually described as poly(*cis*-1,4-isoprene), and is found in the sap of certain plants. The most commonly known source of natural rubber is the rubber tree (*Hevea brasiliensis*), which originated in Brazil and now grows in East Asia and tropical Africa. During the present time, Thailand is a major world supplier of natural rubber latex (NRL), i.e. in 2007–2009, the top three natural rubber producing countries are Thailand, Indonesia, and Malaysia. (Review of NR market Q3, 2009). Nevertheless, the NRL price is low compared with the other commercial products derived from the latex. Thus it is important to encourage the production of NR into the other value-added product form.

NRL is a cloudy white liquid, similar in appearance to milk. It exhibits colloidal behavior having rubber particles suspended in water. The rubber particle diameter is between 5 and 3,000 nm, and

they are surrounded by a complex mixture of proteins, lipids, and long-chain fatty acids, which impart negatively charge (Rippel and Galembeck, 2009). Most of the protein (75%) in the NRL is freely dissolved in the serum fraction while a minor fraction (25%) is bound to the surface of the rubber particles (Yip et al., 1995). Figure 1 shows schematic drawing of the NR suspension.

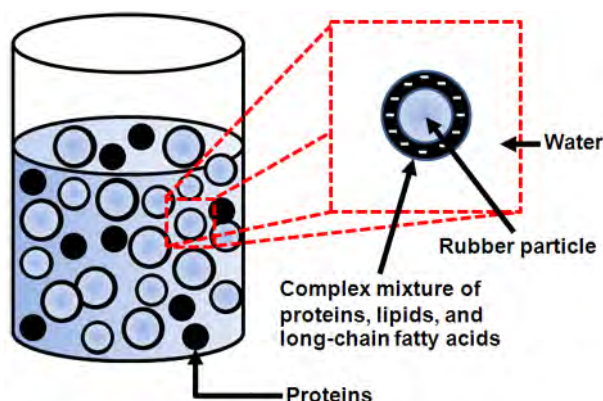


Figure 1 Schematic drawing of the natural rubber suspension.

This latex will turn into a rubbery mass within 12 hours after it is exposed to the air and the obtained rubbery mass has excellent mechanical properties, outstanding elasticity, resilience, flexibility at low temperature, facile adhesion, ability to disperse heat, as well as relatively high water resistance (Rippel and Galembeck, 2009). As a consequence, it is possible to mix NRL with SRC aqueous solution and produce flexible SRC films having desirable mechanical and adhesion properties as well as avoiding dissolution of the film in water. Concisely, rubber particles can disperse in the SRC aqueous solution matrix and thus act as a binder of SRC film. Figure 2 shows chemical structures of SRC and NR. According to the chemical structure of SRC, it should be hypothesized that rubber particles could disperse well in the SRC matrix because of the repulsion force between negatively charges surrounding the rubber particle and OH group of SRC, leading to homogeneous blending.



Figure 2 Chemical structures of sericin and natural rubber.

It is well known in the literature that NRL can give allergic reactions and has cytotoxicity problems ([Turjanmaa, 1997](#); [Woods et al., 1997](#)), which is of great concern especially on this application where the natural rubber containing film is used on the human body. There are two types of allergy related to natural rubber latex, one caused by the natural proteins and the other by chemicals that are used to convert the natural rubber latex to a usable item. They are respectively called Type I and Type IV allergy ([Health and Safety Executive, 2008](#)). Latex allergy normally attacks individuals who are habitually introduced to rubber materials such as rubber manufacture workers, and individuals who have had several operations or several medical procedures where latex materials were employed. Patients who get allergic reactions to foods, like kiwifruit, chestnuts, bananas, avocados, and tomatoes, have a greater chance of acquiring latex allergic reactions since the protein in these items is basically similar to the protein contained in NR. Therefore, the majority of the population is not a clinical risk ([Health and Safety Executive, 2008](#)). Several new biomedical applications for NRL have been proposed using a process without the use of chemicals ([Balabanian et al., 2006](#); [Paulo et al., 2005](#); [Herculano et al., 2007](#)) in order to depart from Type IV allergy. Reduction of protein from NRL to avoid Type I allergy also could be done. It is generally believed that the potentially allergenic protein components are those associated with the aqueous soluble serum fraction of natural rubber latex, therefore, centrifugation is one of the method used to reduce the total protein content. In addition, [Perrella and Gaspari \(2002\)](#) reported that the treatment of NRL with proteolytic enzymes significantly reduces the antigenicity of the rubber containing materials.

Generally, most structural biological materials (such as wood, arthropod exoskeletons, and skeletal elements of vertebrates and other invertebrates) are multiphase biological composite materials. They differ fundamentally from most man-made structural materials since they have been optimized in their functions in the long selection and adaptation process during evolution; thus their natural constructions give the impression to exploit in a more efficient and well-designed way. Chitin polymer is known to form microfibrillar arrangements. These fibrils are usually embedded in a protein matrix, and their diameters usually range from 2.5 to 2.8 nm, with the chitin microfibrils (referred to as “chitin whiskers”, CTW) from the cuticles of crustaceans being found to be as large as 25 nm ([Revol and Marchessault, 1993](#)). Chitin is well-recognized as a biocompatible material because of its low antigenicity, low toxicity, and biodegradability ([Krajewska, 1991](#)). It is a substrate for lysozyme

digestion and, therefore, several research studies have reported on its use in medicine. Because of their high degree of crystallinity, chitin whiskers are useful to improve the mechanical integrities of several types of materials. They also find applications in medical areas, principally for the regeneration of wound tissues and as dermal fillers. An enormous surface area is their main advantage over the original chitin flake and powder. This property enables chitin nanofibrils to interact effectively with compounds existing in living tissues. Thus, the wound recovery ability and the ability to induce the formation of granulation tissues are obtained. The use of CTW in cosmetics was reported. The CTWs are suspended in saline and injected under the wrinkle skin with the aid of a G30 needle. The whiskers can restore the skin's normal look. They last longer than hyaluronic acid (a non-sulfated glycosaminoglycan distributed widely in connective, epithelial, and neural tissues) and do not give rise to any allergic reaction. Dibutyl chitin containing CTWs was also manufactured for facial mask (Morganti et al., 2006). As a consequence, in order to acquire a more efficient facial paper mask, CTWs were additionally added in the SRC containing NR film. Fortunately, shrimp shells, an important source of chitin, are currently a waste product from sea food industry found originally in Thailand.

In this project, possible SRC films containing NR and CTW were developed. Inclusion of the NR in the film is done in order to assist a film forming ability of SRC as well as improve the film adhesiveness, while CTWs help to improve mechanical integrity and treatment properties of the materials. As distinguished from other previous fabrications, the preparation of film described here has the advantage of using the target substances with the exclusion of crosslinking as well as group-activating agents. In order to stay clear of allergy, the NRL was centrifuged and treated with proteolytic enzyme before mixing. Specifically, this study aims to develop the novel skin care facial paper mask by utilizing waste products (i.e., SRC and chitin) as well as value adding an abundant resource (i.e., NR) found in Thailand.

2. Experimental Section

2.1. Materials

Bombyx mori silk cocoons and *Penaeus merguensis* shrimp shells were supplied by Queen Sirikit Sericulture Center (Nakorn Ratchasima, Thailand) and Surapon Food Co. Ltd. (Samut Prakarn, Thailand), respectively. Natural rubber latex of *Hevea Brasiliensis* tree cultivated from Phatthalung

(Thailand) was used. Hydrochloric acid (HCl; 37%) was purchased from RCI labscan (Thailand). Tris-HCl (molecular biology grade) was purchased from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). All other chemicals were used as received.

2.2. Preparation of Raw Materials

2.2.1. Preparation of Enzyme-Treated Natural Rubber Latex (ET-NRL)

The raw NRL was centrifuged at a speed of 12,000 rpm for 10 s in order to remove freely dissolved protein in the serum fraction. The rubber particles appeared on the top part of the centrifuge tube were picked up from the tube and diluted with 4% NH_4OH aqueous solution. Centrifuged ammoniated NRL was then treated with a protease enzyme (0.4%) for several periods of time, i.e., 4, 12, 24, 48, and 72 h, in a shaking incubator at a speed of 150 rpm, 37°C. The enzyme-treated NRL (ET-NRL) was centrifuged (12,000 rpm, 10 s) to separate the protein supernatant (serum) from the rubber particles. After that, protein content remaining in the ET-NRL was determined by using Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Product No. 23240) and the test was done according to ASTM D 5712-99 standard test method.

2.2.2. Preparation of Sericin (SRC) Solution

Bombyx mori silk cocoons were washed with distilled water and dried in an oven at a temperature of 60°C prior to cut into thin strips (around 0.5 cm wide). Sericin was extracted from the cocoons by immersing the cocoon pieces in distilled water and autoclaving at 121°C for 30 min. Ratio of the cocoon weight in its dry state to the water volume was 1 g : 30 mL. After that, the aqueous solution was filtered to remove insoluble materials. A sericin solution will turn into a gel state after a period of time and can return to a solution upon heating. It was stored in a refrigerator before use.

2.2.3. Preparation of Chitin Whisker (CTW) Suspension

Decalcification and deproteinization of shrimp shells to obtain chitin were carried out according to the procedure described by [Shimahara and Takigushi \(1988\)](#). Chitin whiskers were prepared from the as-prepared chitin based on the method described by [Paillet and Dufresne \(2001\)](#). The whisker suspension was obtained by hydrolyzing chitin sample with 3N HCl at 104°C for 6 h under vigorous stirring. The ratio of the 3N HCl solution to chitin was 30 cm^3/g . After acid hydrolysis, the suspension

was immediately diluted with distilled water, followed by centrifugation to separate the chitin whisker solid residues from the aqueous medium and, because of the nanocrystalline nature of the as-prepared whiskers; the centrifugation could be achieved at 10,000 rpm for 10 min. This process was repeated three times. To remove HCl that could be remained in the suspension, the suspension was further dialyzed in distilled water at room temperature for 3 days until pH=6. Homogeneity of the suspension was further achieved by sonication for 5 min and the suspension was subsequently filtered to remove residual aggregates and was kept in a refrigerator prior to further use. Morphology of the as-prepared CTW was observed by a JEOL model JEM 2100 transmission electron microscopic (TEM) using an operating voltage of 200 kV. Samples for TEM observations were prepared by dropping a diluted whisker suspension on a carbon-coated copper grid and air-dried before TEM observation.

2.3. Fabrication of ETNR/SRC Films and ETNR/SRC/CTW Nanocomposite Films

The ETNR/SRC films and ETNR/SRC/CTW nanocomposite films were fabricated by the solution-casting technique. For preparing the ETNR/SRC films, the SRC content was varied to be 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 %w/w (based on the weight of ETNR). The suspension (20 mL) was then poured into a glass Petri-dish (15 cm in diameter) and dried in an oven at a control temperature of 60°C for 24 h. Since the neat SRC is known to form fragile films, the higher the SRC content leads to the weaker the film forming ability. In this study, the composition having the highest SRC content was chosen before preparing the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films since beneficial properties of the SRC were required. After that, the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films were prepared by blending various compositions of the CTW, i.e., 0, 1, 2, 5, 10, and 15 %w/w (based on the weight of ETNR) to investigate the effect of individual constituents on the properties of the films. Preparation of films was done by the same method as described for the ETNR/SRC films.

2.4. Characterizations of ETNR/SRC Films and ETNR/SRC/CTW Nanocomposite Films

2.4.1. Surface Morphology

Surface morphology of the ETNR/SRC films and ETNR/SRC/CTW nanocomposite films were observed by scanning electron microscope (SEM), using a Hitachi S-4800 SEM at an operating

voltage of 2 kV to obtain a magnification of 50× and 200×. The specimens were coated with platinum in ion sputter equipment (Hitachi E-1010 Ion Sputter) before the SEM observation.

2.4.2. Chemical Structure

FTIR spectra of the pure components (SRC powder, CTW powder, and ETNR film), ETNR/SRC films, and ETNR/SRC/CTW nanocomposite films were characterized by a Thermo Nicolet Nexus 670 spectrophotometer. The observation for the SRC and the CTW powder was done using KBr method while samples in the form of film could be used directly for the observation. The test was done with a total 64 scans at a resolution of 4 cm⁻¹ and frequency range of 4000–400 cm⁻¹.

2.4.3. Mechanical Property

Stress at break and percentage strain at break of the ETNR/SRC films and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films were measured according to ASTM D 6746 – 08 (Standard Test Method for Determination of Green Strength of Raw Rubber or Unvulcanized Compounds) and ASTM D 412 – 06a (Standard Test Method for Vulcanized Rubber and Thermoplastic Elastomers—Tension) using a universal testing machine (Lloyd, LRX). The load cell, the gauge length, and the displacement rate used were 500 N, 10 mm, and 50 mm/min, respectively. The film samples were first cut into a dumbbell shape with a length and a width of spacer equal to 5 mm and 10 mm, respectively, before drying in an oven at 40°C for 2 h. During the measurements, both the temperature and the relative humidity were 25°C ± 2°C and 55% ± 2%, respectively. The stress at break and the percentage strain at break were average values of 5 specimens.

2.4.4. Water Sorption Capacity

The ETNR/SRC films and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films were cut into spherical shape with a diameter of 1 cm. The films were accurately weighed in the dry state and then submersed in 10 mL of purified water. After 1 h of submersion, the films were removed and weighed in their wet state to determine the amount of water contained in the films. The experiment was performed five times under the same condition. The percentage swelling of the films was calculated using the following equation:

$$\text{Water sorption capacity (\%)} = ((W_t - W_0)/W_0) \times 100$$

where W_0 is the weight of each sample in its dry state and W_t is the weight of the sample after submersion in distilled water for 1 h.

2.5. Release of Protein from ETNR/SRC Films and ETNR/SRC/CTW Nanocomposite Films

Release characteristic of the SRC from the neat ETNR film, the ETNR/SRC films, and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films with different concentrations of CTW was investigated by total immersion method. Two samples having spherical shape with a diameter of 1 cm was immersed in 5 mL of the 0.1 M Tris-HCl buffer solution (pH 7.4). The test was performed in a shaking incubator (100 rpm) at the physiological temperature of 37°C. At a specified immersion period ranging between 0 and 48 h (2880 min), 20 µL of a sample solution was withdrawn. The amount of protein (referring to the SRC) in the sample solutions was determined using a BCA protein assay kit (Pierce®, Thermo Scientific, product number 23225). The method is a colorimetric determination method where the concentration of protein is measured using UV-vis spectrophotometer at the wavelength of 562 nm. The obtained data were calculated to determine the amount of protein released from the samples at each immersion time point using the following equation:

$$\text{Protein release (\%)} = (C_t/C_a) \times 100$$

where C_t is the amount of protein in a sample solution at each immersion time and C_a is the actual amount of protein in the sample. The actual amount of protein in the ETNR/SRC films and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films was determined from calculation. The experiments were carried out in triplicate and the results were reported as average values.

3. Results and Discussion

3.1. Protein Content in Enzyme-Treated Natural Rubber Latex (ET-NRL)

The protein content in the NRL after treating with different methods of treatment is shown in **Figure 3**. It was found that, protein content in the centrifuged NRL decreased from that of the raw NRL as much as 72.79%. After the centrifuged NRL was further treated with protease enzyme for 4, 12, 24,

48, and 72 h, protein reductions were 92.31, 93.56, 92.74, 95.22, and 96.09%, respectively. Since the longer enzyme treatment time led the NRL to exhibit unacceptable coagulation. Therefore, the enzyme treatment time of 48 h was chosen for the preparation of ET-NRL in this study.

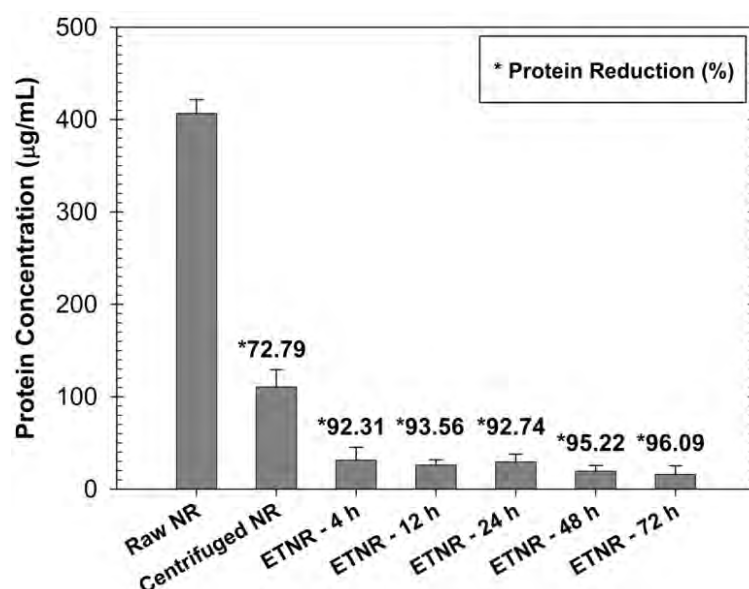


Figure 3 Protein content in the NRL after treating with different methods of treatment.

3.2. Morphology and sizes of chitin whiskers

The as-prepared chitin whisker suspensions from hydrolyzed shrimp shells displayed colloidal behavior because of the presence of the positive charges induced on the surface of the crystallites by the protonation of the amino groups ($-\text{NH}_3^+$) (Marchessault et al., 1959). The degree of deacetylation of these chitin whiskers was 20.4% and the solid fraction of these colloidal suspensions was 4.45% w/v. A selected TEM image illustrating the as-prepared chitin whiskers from a colloidal suspension is shown in Figure 4. The suspension consisted of slender rods of crystalline fragments of chitin, which are present both in their individual and aggregated forms. These individual crystalline fragments of chitin exhibited a broad distribution in both of their width (d) and length (L). Specifically, the average width of these whiskers was 27 ± 12 nm, whereas the average length was 307 ± 100 nm. The aspect ratio (L/d) of these whiskers was around 11.37. These dimensions are different from what was reported for chitin whiskers obtained from crab shells (Revol and Marchessault, 1993) and squid pens

(Paillet and Dufresne, 2001) in which the average width, the average length, and the aspect ratio were 10 nm, 150 nm, and 15, respectively.

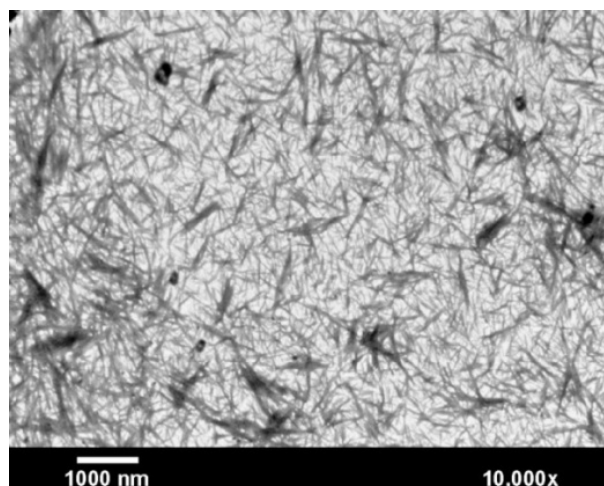
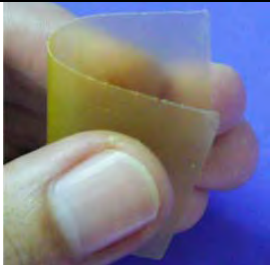
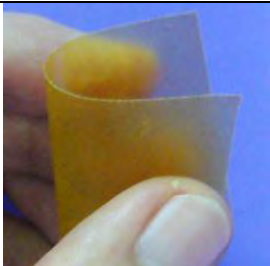
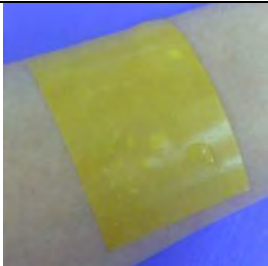
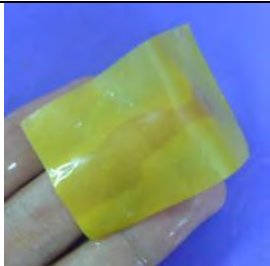


Figure 4 TEM image of chitin whisker suspension.

3.3. Film Forming Ability of ETNR/SRC Films and ETNR/SRC/CTW Nanocomposite Films

After the fabrication of films, the neat SRC films could not be prepared. The SRC films were fragile and could not be removed out from the glass mould, while the ETNR/SRC films could be prepared without cross-linking. The higher the SRC content led to the weaker the film forming ability. In this study, the highest content of SRC that could be blended with the ETNR was 30 %w/w (based on the weight of ETNR). As a result, the composition of the ETNR/SRC at 30 %w/w of the SRC was chosen for preparing the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films. In addition, in order to compare the properties of films having different contents of the SRC, the composition of ETNR/SRC at 20 %w/w of the SRC was additionally chosen. Appearance of ETNR/SRC film containing 30% SRC and ETNR/SRC/CTW nanocomposite film containing 30% SRC and 15% CTW (%w/w, based on the weight of ETNR) are shown in Table 1. According to Table 1, both the ETNR/SRC film containing 30% SRC and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite film containing 30% SRC and 15% CTW in their dry state were transparent and flexible while the films in their wet state were soft and could conform to skin.

Table 1 Appearance of ETNR/SRC film containing 30% SRC and ETNR/SRC/CTW nanocomposite film containing 30% SRC and 15% CTW (%w/w, based on the weight of ETNR)

	Dry state	Wet state	
ETNR/SRC film containing 30% SRC			
ETNR/SRC/CTW nanocomposite film containing 30% SRC and 15% CTW			

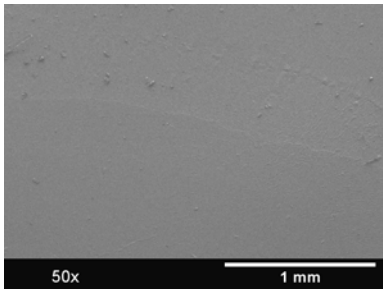
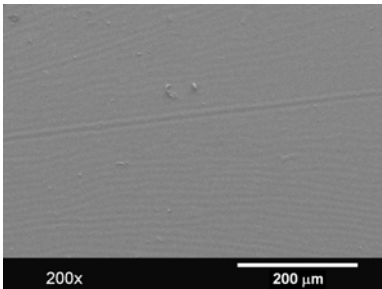
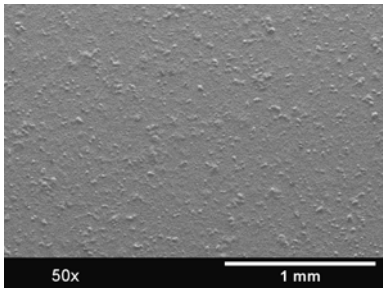
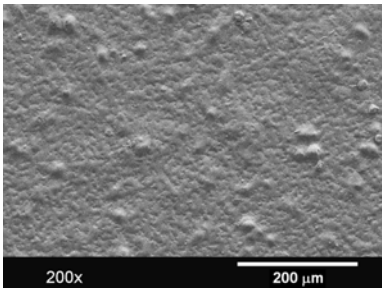
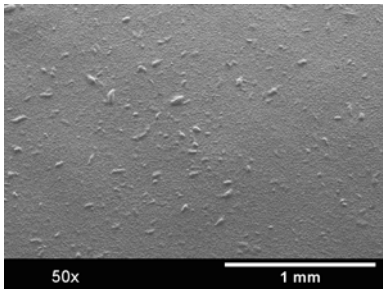
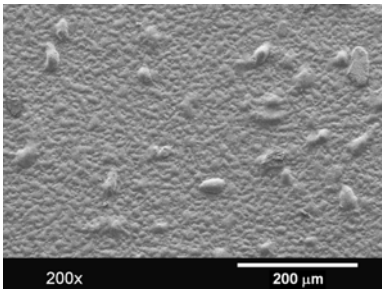
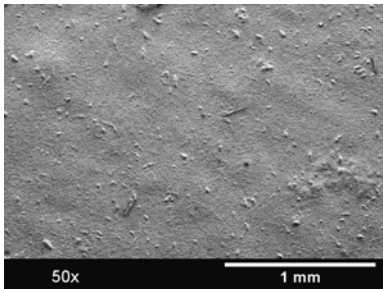
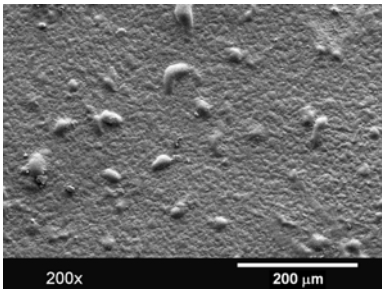
3.4. Characterizations of ETNR/SRC Films and ETNR/SRC/CTW Nanocomposite Films

3.4.1. Surface Morphology of Neat ETNR Film, ETNR/SRC Films and ETNR/SRC/CTW Nanocomposite Films

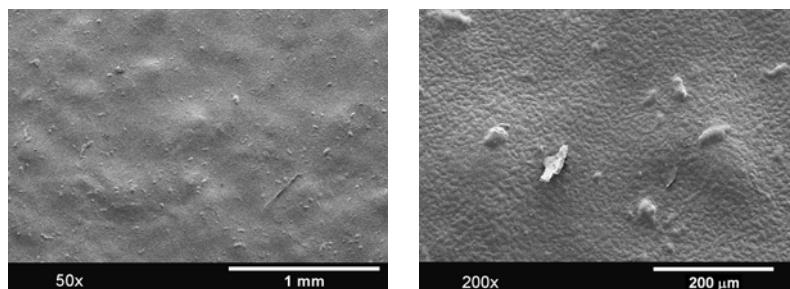
Surface morphology of the neat ETNR film, the ETNR/SRC film containing 30% SRC, and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films containing 30% SRC and different contents of CTW are shown in [Table 2](#). It was found that, while the ETNR/SRC film surface was rough, the neat ETNR film surface was smooth. The one reason which can be explained this point is the difference in polarity of the rubber particles and the SRC molecules which are hydrophobic and hydrophilic, respectively. Therefore, after the ETNR suspension and the SRC aqueous solution were mixed and dried in an oven during the fabrication of films, self-assembly of both the NR particles and the SRC molecules could occur when the medium, i.e. water, was evaporated from the environment. Comparison between surface morphology of the ETNR/SRC film and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films containing different contents of CTW revealed that when the CTW content increased small protrusions appeared on the film surface tended to become a hill-like structure. Furthermore, the hill-like structure on the film surface was broader when the CTW content was further increased ($\geq 5\%$). These results could be caused by a coalescence of the CTW nanofibers which led to an agglomeration of the CTW, having NR particles as a film binder ([Kohjiya et al., 2006](#); [Kohjiya et al., 2008](#)). Similar results were observed

for the ETNR/SRC film containing 20% SRC, and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films containing 20% SRC and different contents of CTW. Therefore, the data are not shown.

Table 2 Selected SEM images of the neat ETNR film, the ETNR/SRC film containing 30% SRC and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite film containing 30% SRC and different contents of CTW

CTW content in ETNR/SRC/CTW nanocomposite film	Magnification	
	50x	200x
Control (neat ETNR film)		
0		
1		
5		

15



3.4.2. Chemical Structure

FTIR spectra of the SRC powder and the CTW powder are shown in Figure 5. FTIR spectrum of the SRC (Figure 5A) was in accordance with the work reported by Sarovart et al. (2003) while spectrum of the CTW (Figure 5B) was in accordance with the work reported by Watthanaphanit et al. (2008) confirming characteristic absorption bands of SRC and chitin, respectively.

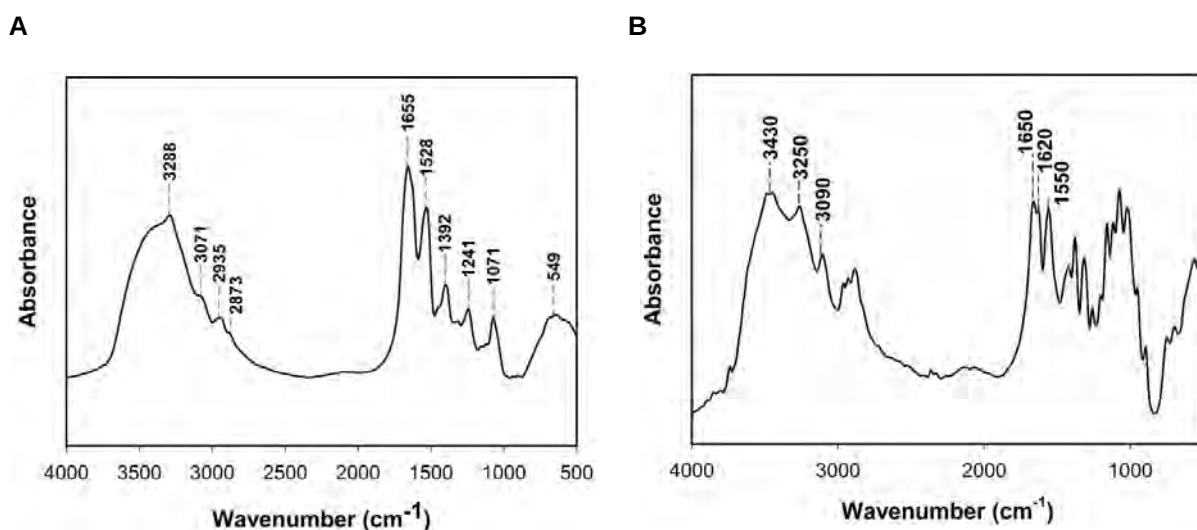


Figure 5 FTIR spectra of (A) SRC powder and (B) CTW powder.

FTIR spectra of the neat ETNR film, the ETNR/SRC film containing 20% SRC, and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films containing 20% SRC and different contents of CTW are shown in Figure 6. The results showed that characteristic absorption peaks of SRC were observed in the spectrum of the ETNR/SRC film and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films at 3250, 1640, 1610, and 1510 cm^{-1} corresponding to N–H stretching, C=O, and N–H bending in amine and amide II, respectively (Sarovart et al., 2003; Watthanaphanit et al., 2008; Watthanaphanit et al., 2010). It was

found that all characteristic absorption peaks of SRC in the ETNR/SRC film and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films shifted to the lower wavenumber compared with the peaks in the neat SRC powder (see Figure 5). However, since the SRC and the CTW exhibited characteristic absorption peaks at the near region, it is difficult to determine the type of interactions between the polymers. Besides, intensity of a peak at 3430 cm^{-1} corresponding to N–H and O–H stretching increased with the increase in the CTW content. The results confirmed the increment of the CTW content in the films.

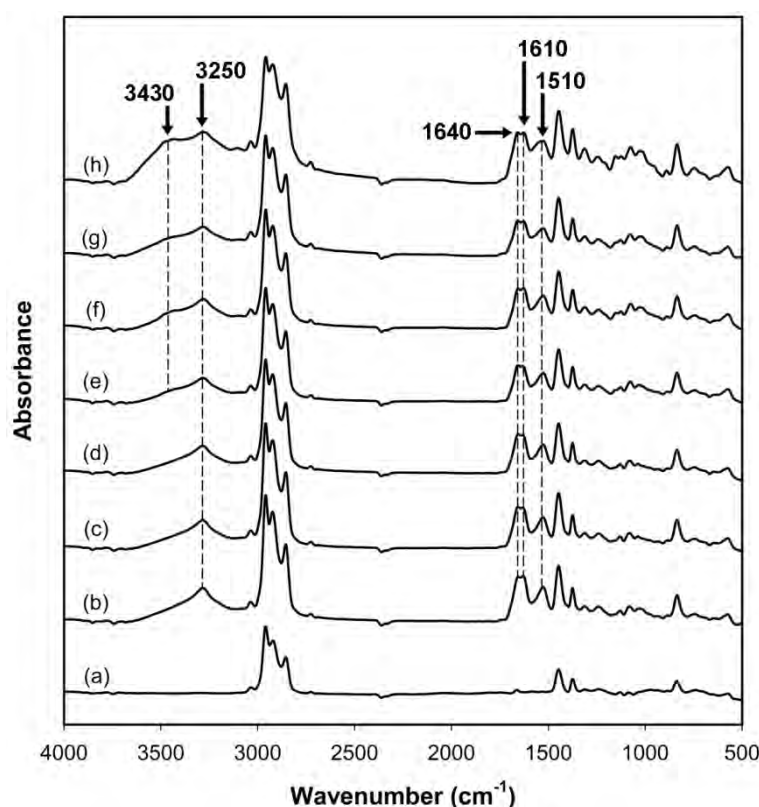
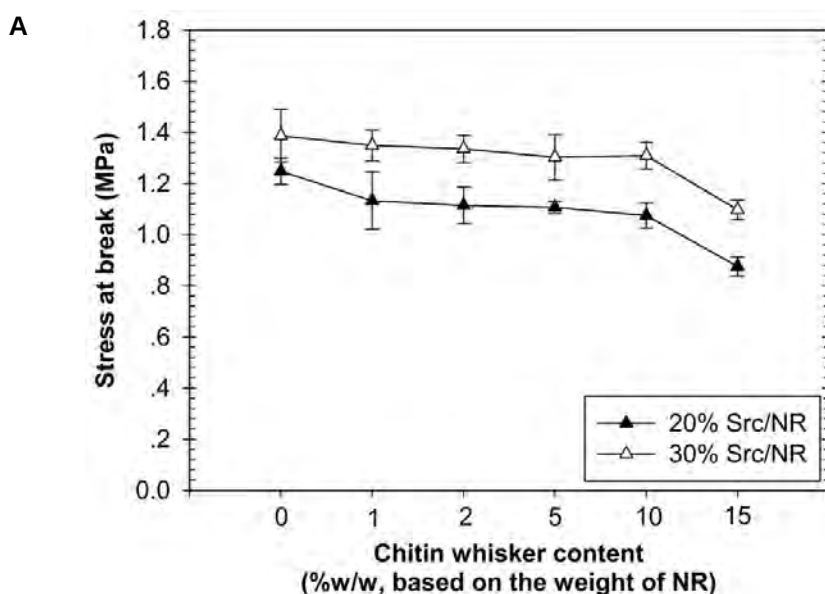


Figure 6 FTIR spectra of (a) neat ETNR film, (b) ETNR/SRC film containing 20% SRC, and ETNR/SRC/CTW nanocomposite films containing 30% SRC and (c) 1%, (d) 2%, (d) 3%, (e) 5%, (f) 10%, (g) 15%, and (h) 20% CTW (%w/w, based on the weight of ETNR).

3.4.3. Mechanical Property

The stress at break and the percentage strain at break of ETNR/SRC/CTW nanocomposite films containing 20% or 30% SRC with various amount of CTW are shown in Figures 7A and 7B, respectively. The stress at break of the nanocomposite films decreased slightly from that of the ETNR/SRC film with initial increase in the whisker content, until a whisker content of 15% was

reached, the property value significantly decreased. A similar trend was observed on the elongation at break of these films, but in a more remarkable value. Comparison between the films containing different content of SRC revealed that, the films with higher SRC content exhibited better stress at break and percentage strain at break properties. Mechanical properties of nanocomposites do not depend only on the amount, the size, the shape, and the alignment of the fillers, but also on the ability of the matrix to transfer the stress to the fillers (Sretenovic et al., 2006). The latter depends solely on the affinity between the matrix and the fillers. The decrease in both the stress at break and the elongation at break of the nanocomposite films should be due to self-assembly of the polymers that hinder the stress transfer between the matrix and the fillers. In addition, aggregation of the whiskers caused significant disruption to the continuity of the matrix and was a reason for the decrease in the elongation at break.



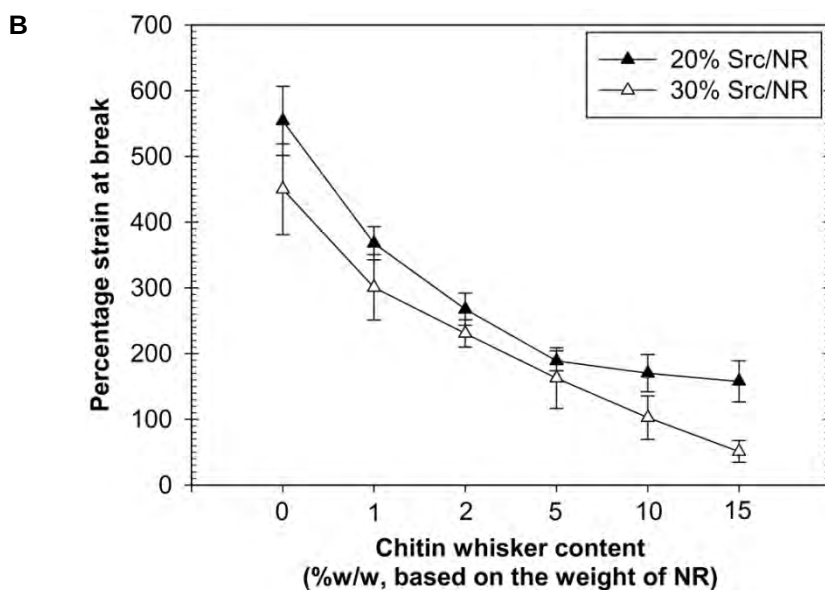


Figure 7 (A) Stress at break and (B) percentage strain at break of ETNR/SRC/CTW nanocomposite films containing 20% or 30% SRC and different contents of CTW.

3.4.4. Water Sorption Capacity

Water sorption capacity of the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films containing 20% and 30% SRC and different contents of CTW are shown in [Figure 8](#). Comparison between the nanocomposite films containing different contents of SRC, the water sorption capacity of the films containing 30% SRC was significantly higher than that of 20% SRC. While that of the films with the same SRC content did not exhibit remarkable change in the water sorption capacity. These findings confirmed that SRC played an important role in holding water and thus could function as a moisturizing agent when the materials are used. On the other hand, CTW content in the nanocomposite films did not significantly influence the water sorption capacity of the films.

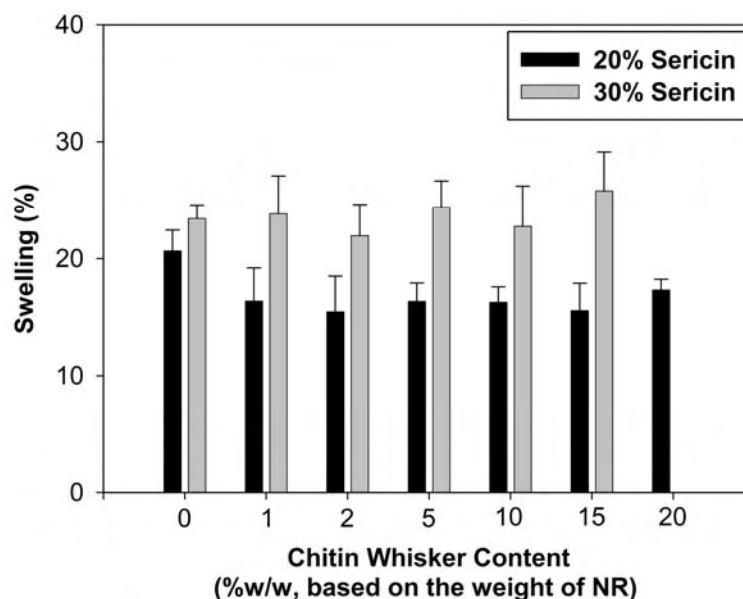


Figure 8 Water sorption capacity of the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films containing 20% or 30% SRC and different contents of CTW.

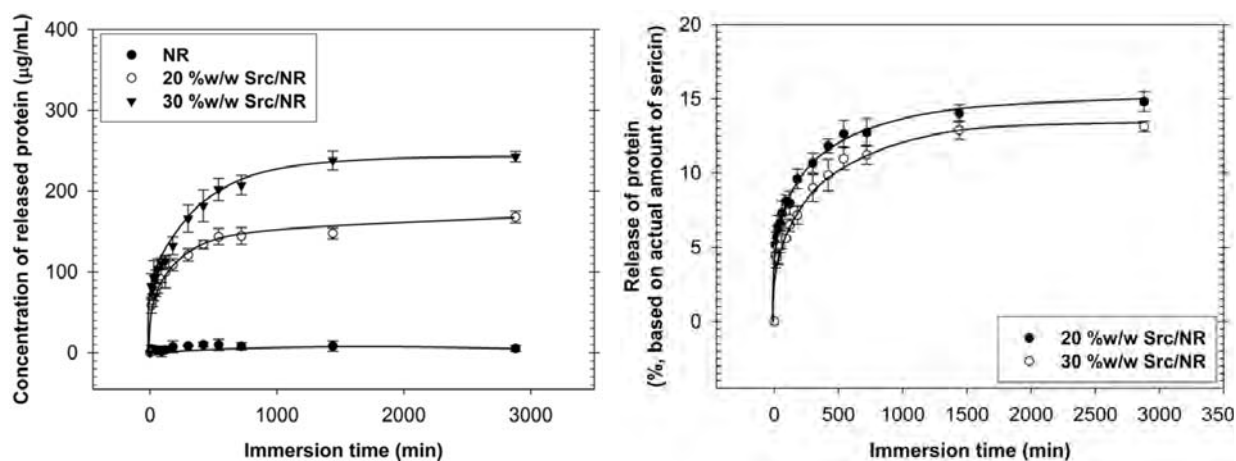
3.5. Release of Protein from ETNR/SRC Films and ETNR/SRC/CTW Nanocomposite Films

Release of protein (SRC) from the ETNR/SRC films and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films was evaluated in terms of: (1) effect of the SRC content and (2) effect of the CTW content. The calculation was done in terms of concentration of released protein and percentage of the protein released from the materials. Results are shown in [Figures 9](#), where [Figure 9A](#) shows effect of the SRC content and [Figure 9B](#) shows effect of the CTW content.

According to [Figure 9A](#), no protein was released from the neat ETNR film and the concentration of protein released from the ETNR/SRC films containing 30% SRC was higher than that of containing 20% SRC. However, calculation in term of percentage of the protein released showed that ETNR/SRC films containing 20% SRC exhibited higher percentage of the released protein than that of the one containing 30% SRC. In case of ETNR/SRC/CTW nanocomposite films containing different concentration of CTW (see [Figure 9B](#)), it was found that small amount of CTW (i.e. 2% CTW) helped to enhance the release amount of the SRC from the nanocomposite films but when the CTW content was higher than this composition (i.e. $\geq 5\%$) release ability of the SRC from the films tended to decrease. The reason which was suitable for describing these results should be the distribution of the CTW in the nanocomposite films. The even distribution of the CTW in the ETNR/SRC/CTW

nanocomposite films containing low CTW content (i.e. 2% CTW) helps to disrupted the interactions between the SRC itself, while at high CTW content (i.e. $\geq 5\%$) agglomeration of the CTW nanofibers occurred and the SRC tends to agglomerate and could be released from the films with a smaller amount.

A



B

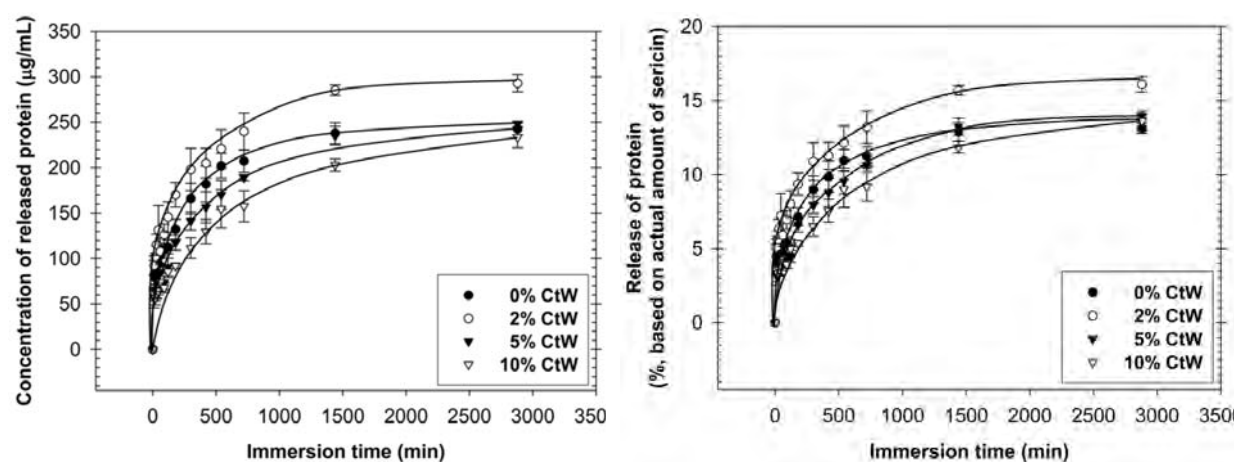


Figure 9 Release profile of protein (SRC) from the neat ETNR films, the ETNR/SRC films, and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films containing different concentration of CTW. The study was evaluated in terms of (A) effect of the SRC content and (B) effect of the CTW content.

4. Conclusions

The neat ETNR film, the ETNR/SRC film, and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films containing different contents of CTW were fabricated by solution casting technique. NRL functioned to be a binder for SRC because of its excellent mechanical properties, outstanding elasticity, flexibility, and adhesion property, while the SRC showed a benefit to improve water sorption capacity of the films. The ETNR/SRC film and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films were strong and flexible. Apart from their ability to accelerate wound healing, CTWs in the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films dispersed evenly in the film when the CTW content was low (i.e. $\leq 2\%$ CTW). Sufficient amount of the SRC both in the ETNR/SRC film and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films could be released out from the films. Therefore, it was expected that the released SRC could function to protect a skin or wound from infection, to prevent damage from oxidation to cells, and eventually to promote wound healing. Although the complete releasing of SRC from the films could not be achieved, it was expected that the remaining portion of SRC in the film could help to provide moisturizing effect to the skin as well as wound.

5. Acknowledgements

We greatly appreciate the financial support from Thailand Research Fund - TRF under the Medium-Size Projects on Rubber (MPR) and the National Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Thailand. The first author would like to acknowledge the Ratchadapisek Somphot Endowment Fund, Chulalongkorn University, Thailand, for granting her post-doctoral fellowship.

6. References

- Dash, R., Mukherjee, S., Kundu, S.C. Isolation, purification and characterization of silk protein sericin from cocoon peduncles of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. International Journal of Biological Macromolecules, 38 (2006), 255–258.
- Dash, B.C., Mandal, B.B., Kundu, S.C. Silk gland sericin protein membranes: Fabrication and characterization for potential biotechnological applications. Journal of Biotechnology, Article in press (2009).

- Fan, J.B., Wu, L.P., Chen, L.S., Mao, X.Y., Ren, F.Z. Antioxidant activities of silk sericin from silkworm *Bombyx mori*. Journal of Food Biochemistry, 33 (2009), 74–88.
- Health and Safety Executive. (2008) About latex allergies. Retrieved December 12, 2009 from <http://www.hse.gov.uk/latex/about.htm>.
- Kohjiya, S., Kato, A., Suda, T., Shimanuki, J., Ikeda, Y. Visualization of carbon black networks in rubberymatrix by skeletonisation of 3D-TEM image. Polymer, 47 (2006), 3298–301.
- Kohjiya, S., Kato, A., Ikeda, Y. Visualization of nanostructure of soft matter by 3D-TEM: Nanoparticles in a natural rubber matrix. Progress in Polymer Science, 33 (2008), 979–997.
- Krajewska, B. Chitin and its derivatives as supports for immobilization of enzymes. Acta Biotechnol., 11 (1991), 269–277.
- Maikrang, K., Aramwit, P. Preparation of sericin film with different polymers. 13th International Conference on Biomedical Engineering, 23 (2009), 1356–1358.
- Mandal, B.B., Priya, A.S., Kundu, S.C. Novel silk sericin/gelatin 3-D scaffolds and 2-D films: Fabrication and characterization for potential tissue engineering applications. Acta Biomaterialia, 5 (2009), 3007–3020.
- Marcelino, L.G., Liu, L., Feng, X. Sericin/PVA blend membranes for pervaporation separation of ethanol/water mixtures. Journal of Membrane Science, 295 (2007), 71–79.
- Marchessault, R.H., Morehed, F.F., Walter, N.M. Liquid crystal systems from fibrillar polysaccharides. Nature, 184 (1959), 632–633.
- Morganti, P., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C. Multifunctional use of innovative chitin derivatives for skin care. Journal of Applied Cosmetological, 24 (2006), 105–114.
- Padamwar, M.N., Pawar, A.P., Daithankar, A.V., Mahadik, K.R. Silk sericin as a moisturizer: an *in vivo* study. Journal of Cosmetic Dermatology, 4 (2005), 250–257.
- Paillet, M., Dufresne, A. Chitin whisker reinforced thermoplastic nanocomposites. Macromolecules, 34 (2001), 6527–6530.
- Perrella, F.W., Gaspari, A.A. Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. Methods, 27 (2002), 77–86.
- Review of Natural Rubber Market, A quarterly publication of the Association of Natural Rubber Producing Countries, Kuala Lumpur, January–September 2009.

- Revol, J.F., Marchessault, R.H. In vitro chiral nematic ordering of chitin crystallites. International Journal of Biological Macromolecules, 15 (1993), 329–335.
- Rippel, M.M., Galembeck, F. Nanostructures and adhesion in natural rubber: New era for a classic. Journal of the Brazilian Chemical Society, 20 (2009), 1024–1030.
- Shimahara, K., Takigushi, Y. (1988). Biomass, part B: Lignin, pectin, and chitin. New York, NY: Advance Press.
- Sretenovic, A., Muller, U., Gindl, W. Mechanism of stress transfer in a single wood fiber-LDPE composite by means of electronic laser speckle interferometry. Composites Part A: applied science and manufacturing, 37 (2006), 1406–1412.
- Terada, S., Sasaki, M., Yanagihara, K., Yamada, H. Preparation of silk protein sericin as mitogenic factor for better mammalian cell culture. Journal of Bioscience and Bioengineering, 100 (2005), 667–671.
- Tsubouchi, K., Igarashi, Y., Takasu, Y., Yamada, H. Sericin enhances attachment of cultured human skin fibroblasts. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 69 (2005), 403–405.
- Turjanmaa, K. Natural rubber latex allergy: Clinical manifestations (including contact dermatitis) and diagnosis. Revue Francaise D'Allergologie ET D'Immunologie Clinique, 37 (1997), 1177–1179.
- Vaithanomsat, P., Kitpreechavanich, V. Sericin separation from silk degumming wastewater. Separation and Purification Technology, 59 (2008), 129–133.
- Villapalos, J.L., Jeschke, M.G., Herndon, D.N. Review: Topical management of facial burns. Burns, 34 (2008), 903–911.
- Watthanaphanit, A., Supaphol, P., Tamura, H., Tokura, S., Rujiravanit, R. Fabrication, structure, and properties of chitin whisker-reinforced alginate nanocomposite fibers. Journal of Applied Polymer Science, 110 (2008), 890–899.
- Woods, J.A., Lambert, S., Thomas, Platts-Mills, T.A.E., Drake, D.B., Edlich, R.F. Natural rubber latex allergy: Spectrum, diagnostic approach, and therapy. The Journal of Emergency Medicine, 15 (1997), 71–85.
- Yip, E., Poon, N.K., Lang, M.K., Turjanmaa, K. in: Latex Protein Allergy: The Latest Position. European Rubber Journal, Paris, 1995.

Zhang, Y.Q., Ma, Y., Xia, Y.Y., Shen, W.D., Mao, J.P., Xue, R.Y. Silk sericin–insulin bioconjugates: synthesis, characterization and biological activity. *Journal of Control Release*, 115 (2006), 307–315.

Figure Captions

Figure 1 Schematic drawing of the natural rubber suspension.

Figure 2 Chemical structures of sericin and natural rubber.

Figure 3 Protein content in the NRL after treating with different methods of treatment.

Figure 4 TEM image of chitin whisker suspension.

Figure 5 FTIR spectra of (A) SRC powder and (B) CTW powder.

Figure 6 FTIR spectra of (a) neat ETNR film, (b) ETNR/SRC film containing 20% SRC, and ETNR/SRC/CTW nanocomposite films containing 30% SRC and (c) 1%, (d) 2%, (d) 3%, (e) 5%, (f) 10%, (g) 15%, and (h) 20% CTW (%w/w, based on the weight of ETNR).

Figure 7 (A) Stress at break and (B) percentage strain at break of ETNR/SRC/CTW nanocomposite films containing 20% or 30% SRC and different contents of CTW.

Figure 8 Water sorption capacity of the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films containing 20% or 30% SRC and different contents of CTW.

Figure 9 Release profile of protein (SRC) from the neat ETNR films, the ETNR/SRC films, and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite films containing different concentration of CTW. The study was evaluated in terms of (A) effect of the SRC content and (B) effect of the CTW content.

List of Tebles

Table 1 Appearance of ETNR/SRC film containing 30% SRC and ETNR/SRC/CTW nanocomposite film containing 30% SRC and 15% CTW (%w/w, based on the weight of ETNR)

Table 2 Selected SEM images of the neat ETNR film, the ETNR/SRC film containing 30% SRC and the ETNR/SRC/CTW nanocomposite film containing 30% SRC and different contents of CTW

แบบสรุปโครงการวิจัย

สัญญาเลขที่ RDG5350062 ชื่อโครงการ การผลิตแผ่นมาร์สหน้าเพื่อใช้เป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลและดูแลผิวหนังจากเซริซิน โดยใช้น้ำยางธรรมชาติเป็นวัตถุดิบและเพิ่มประสิทธิภาพในการสมานแผลโดยการเติมเส้นใยนาโนของไคติน หัวหน้าโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา รุจิรวนิช หน่วยงาน วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 0-2218-4132 โทรสาร 0-2215-4459 อีเมล ratana.r@chula.ac.th

ความสำคัญ/ความเป็นมา

ใบหน้า เป็นอวัยวะที่เป็นเอกลักษณ์และเป็นจุดเด่นของร่างกาย มีบทบาทสำคัญในการถ่ายทอดความรู้สึกและอารมณ์ รวมทั้งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างบุคคลได้ การมีผิวหนังที่มีสุขภาพดีจึงมีส่วนให้บุคคลมีความรู้สึกที่ดีต่อตัวเอง รวมทั้งช่วยเสริมสร้างความเชื่อมั่นในการเข้าสังคม ซึ่งนำไปสู่โอกาสและความสำเร็จในด้านอื่นๆตามมา การศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีและผลิตภัณฑ์ในการดูแลผิวหนังจึงเป็นเรื่องที่ได้รับความสำคัญมากขึ้นในปัจจุบัน ซึ่งนอกจากจะเป็นการส่งเสริมให้มีสุขภาพผิวที่ดีแล้ว ยังช่วยในการบำบัดดูแลผู้มีปัญหาผิวหนังจากอุบัติเหตุต่างๆ เช่น แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก แผลจากการสัมผัสสารเคมี แผลหลังการผ่าตัด หรือแผลเป็นที่เกิดขึ้นหลังการรักษา ทั้งนี้ หลักการสำคัญในการรักษาแผลดังกล่าวคือการทำให้การเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจนซึ่งเป็นส่วนโครงสร้างของผิวหนังมีความสมบูรณ์ ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ที่นำมาใช้ในการรักษาดังกล่าวแล้ว เช่น pressure garment และ facial mask ซึ่งใช้สวมใส่เพื่อรีดบริเวณแผลที่ได้รับการรักษาเพื่อป้องกันการเกิดแผลเป็น หรือใช้รีดบริเวณแผลเป็นเพื่อช่วยให้แผลเป็นนั้นลดการขยายตัวและการนูนของแผลเป็นได้ และปัจจัยหลักในการรักษาคือการให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวหนังอย่างเหมาะสม (hydration) ดังนั้นสิ่งสำคัญที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการรักษา คือ สารให้ความชุ่มชื้น (moisturizing agent) แก่ผิว

ปัจจุบันเวชภัณฑ์ที่ใช้ในการดูแลผิวหนัง (cosmetic medical treatment) เพื่อบำบัดแผลดังกล่าวข้างต้นส่วนใหญ่ในประเทศไทยนำเข้าจากต่างประเทศ ส่งผลให้มีราคาแพง ทำให้ผู้มีรายได้น้อยหรือแม้กระทั่งผู้มีรายได้ปานกลาง ซึ่งเป็นประชากรส่วนใหญ่ของประเทศไม่สามารถซื้อได้ ทำได้เพียงการรักษาแผลให้หายเท่านั้น จึงเป็นจุดเริ่มต้นของงานวิจัยซึ่งมีจุดมุ่งหมายเพื่อผลิตแผ่นมาร์สหน้า (facial mask) เพื่อช่วยในการบำบัดแผลและรอยแผลเป็นสำหรับผู้ป่วย โดยการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติที่มีศักยภาพสูงและมีมากในประเทศไทย ได้แก่ ยางพารา เซริซิน (ซึ่งเป็นโปรตีนจากไหมธรรมชาติ) และไคติน (สกัดได้จากเปลือกของกุ้งหรือปู ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารทะเล) ดังนั้น การศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์ดังกล่าว นอกจากจะช่วยเพิ่มมูลค่าของทรัพยากรภายในประเทศแล้ว ยังทำให้ได้เวชภัณฑ์บำบัดแผลและดูแลผิวหนังที่มีราคาถูกกว่าผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- (1) เพื่อสกัดโปรตีนเซรีซินจากรังไหมและหาอัตราส่วนและสภาวะที่เหมาะสมในการผสมและขึ้นรูปสารละลายผสมระหว่างเซรีซินและน้ำยางธรรมชาติ เพื่อให้สามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้
- (2) เพื่อสกัดเส้นใยนาโนของไคตินจากเปลือกกุ้งและทำการเพิ่มประสิทธิภาพของแผ่นฟิล์มเซรีซิน/ยางธรรมชาติในการสมานแผลและดูแลผิว โดยการผสมเส้นใยนาโนของไคตินในอัตราส่วนต่างๆ และหาอัตราส่วนที่เหมาะสม
- (3) เพื่อวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของแผ่นฟิล์มที่ได้ ที่มีสมบัติสอดคล้องกับการนำไปใช้งานเป็นแผ่นมาร์สหน้า

ผลการวิจัย

การลดปริมาณโปรตีนในน้ำยาง

สิ่งสำคัญอย่างหนึ่งในงานวิจัยนี้คือการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดอาการแพ้ที่อาจเกิดขึ้นในผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ โดยเลือกใช้วิธีหมუნเหวี่ยงความเร็วสูงตามด้วยการบำบัดด้วยเอนไซม์โปรติเอส 0.04% ที่เวลาต่างๆ ทั้งนี้ สามารถสกัดแยกโปรตีนออกจากน้ำยางธรรมชาติได้ประมาณ 95% เมื่อใช้วิธีหมუნเหวี่ยงความเร็วสูงตามด้วยการบำบัดด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถึงแม้ว่าการเพิ่มระยะเวลาในการบำบัดด้วยเอนไซม์เป็น 72 ชั่วโมง จะทำให้สามารถลดปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นได้อีกเล็กน้อยเป็นประมาณ 96% แต่เนื่องจากการเพิ่มเวลาดังกล่าวทำให้อนุภาควางจับตัวกันเป็นก้อนมากขึ้นในขั้นตอนการหมუნเหวี่ยงเพื่อแยกอนุภาควางออกจากซีรัม และก้อนยางดังกล่าวสามารถละลายในสารละลายแอมโมเนีย 0.6% ได้ยากและได้ปริมาณเนื้อยางน้อยลง ดังนั้น จึงใช้ระยะเวลา 48 ชั่วโมงสำหรับการบำบัดด้วยเอนไซม์ในการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางเพื่อใช้ในการเตรียมน้ำยางธรรมชาติในโครงการวิจัยนี้ น้ำยางธรรมชาติโปรตีนต่ำที่เตรียมได้มีปริมาณของแข็งในน้ำยางทั้งหมด (solid content) โดยเฉลี่ยประมาณ 36%

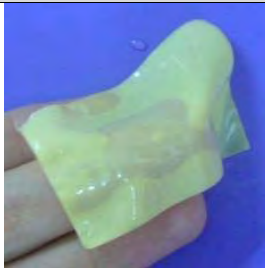
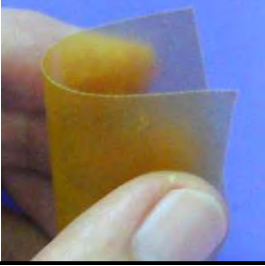
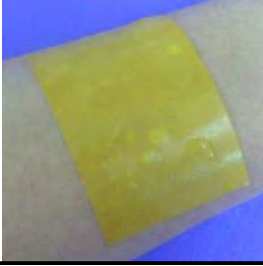
อัตราส่วนที่เหมาะสมในการเตรียมแผ่นฟิล์มเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์

จากการศึกษาเพื่อหาอัตราส่วนผสมระหว่างเซรีซินต่อยางธรรมชาติในการขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มพบว่า สามารถขึ้นรูปแผ่นฟิล์มผสมระหว่างเซรีซิน/ยางธรรมชาติได้เมื่อมีปริมาณเซรีซินในแผ่นฟิล์มไม่เกิน 30% หากปริมาณเซรีซินมากกว่าจำนวนดังกล่าว จะไม่สามารถลอกแผ่นฟิล์มออกจากโมลด์ได้ ทั้งนี้ อัตราส่วนที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อ ได้แก่ อัตราส่วนที่มีปริมาณเซรีซินมากที่สุดที่สามารถขึ้นรูปฟิล์มได้ และเพื่อศึกษาผลของปริมาณเซรีซินในแผ่นฟิล์มต่อคุณสมบัติของแผ่นฟิล์มผสมด้วย จึงเลือก 2 อัตราส่วนมาทำการทดลองต่อ ได้แก่ ที่ความเข้มข้นของเซรีซิน 20% และ 30%

จากการทดลองผสมไคตินวิสเกอร์เป็นอีกองค์ประกอบหนึ่งในแผ่นฟิล์ม พบว่า สามารถผสมไคตินวิสเกอร์ลงในแผ่นฟิล์ม 20% และ 30% เซรีซิน/ยางธรรมชาติ ได้มากที่สุด 20% และ 15% (%w/w, เทียบกับน้ำหนักของยางธรรมชาติ) ตามลำดับ ทั้งนี้ หากเพิ่มปริมาณไคตินวิสเกอร์ให้มากกว่าจำนวนดังกล่าว ฟิล์มที่ได้จะแตกและไม่สามารถลอกออกจากโมลด์ได้

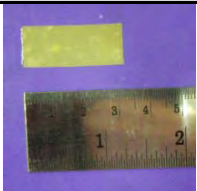
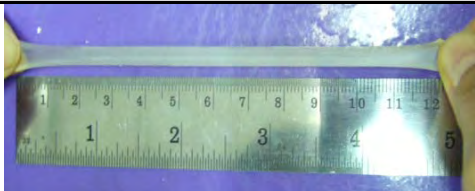
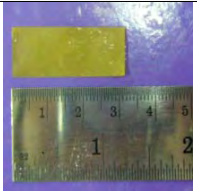
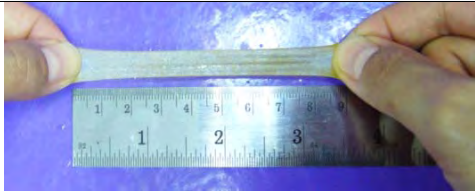
ฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ที่สามารถขึ้นรูปได้มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มใสสีเหลือง ซึ่งเมื่อเปียกน้ำจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองขุ่น มีความอ่อนนุ่มและสามารถแนบติดกับผิวหนังได้ดี ทำให้เหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้เป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลและดูแลผิวหนังในรูปแบบของแผ่นมาร์ส ตัวอย่างของแผ่นฟิล์มผสมที่ได้ในสถานะแห้งและเปียกแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะของแผ่นฟิล์มเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ในสถานะแห้งและเปียก

	สถานะแห้ง	สถานะเปียก	
30% เซรีซิน/ยางธรรมชาติ			
30% เซรีซิน/ยางธรรมชาติ + 15% ไคตินวิสเกอร์			

ความสามารถในการทนต่อแรงดึงขีดยืดและความสามารถในการกลับคืนสู่รูปร่างดั้งเดิมของฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ แสดงในตารางที่ 2 จากผลการทดลองในตารางที่ 1 และ 2 แสดงให้เห็นว่าฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ มีความอ่อนนุ่มและความยืดหยุ่นสูงกว่าฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์

ตารางที่ 2 ความสามารถในการทนต่อแรงดึงยืดและความสามารถในการกลับคืนสู่รูปร่างดั้งเดิมของฟิล์มเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ในสภาวะเปียก

	ก่อนดึงยืด	ขณะดึงยืด	หลังดึงยืด
30% เซรีซิน/ยางธรรมชาติ			
		ค่าการยืดตัว (elongation) = 300%	
30% เซรีซิน/ยางธรรมชาติ + 15% ไคตินวิสเกอร์			
		ค่าการยืดตัว (elongation) = 200%	

แผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ที่พัฒนาขึ้น มีความแข็งแรงและความยืดหยุ่นสูง ทั้งยังสามารถแนบติดกับผิวหนังได้ดีในสภาวะชุ่มน้ำ การเติมไคตินวิสเกอร์มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสมานแผลให้แก่ผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้พบว่า การผสมไคตินวิสเกอร์ลงในปริมาณน้อย ($\leq 2\%$) มีผลดีต่อการผลิตแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์หลายประการ ได้แก่ (1) ทำให้การกระจายตัวของเส้นใยไคตินวิสเกอร์ในแผ่นฟิล์มสม่ำเสมอ ซึ่งส่งผลให้ (2) มีความสามารถในการทนแรงดึงยืดสูง และ (3) เพิ่มความสามารถในการปลดปล่อยเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์ม

สมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม

ความสามารถในการทนแรงดึงยืดของแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ต่างๆ แสดงในรูปของค่าแรงดึงจนขาด (stress at break) และค่าการยืดตัวจนขาด (elongation at break) ผลการทดสอบการทนต่อแรงดึงจนขาด พบว่าแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 30% ให้ค่าการทนต่อแรงดึงจนขาดสูงกว่าแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 20% ในขณะที่ค่าแรงดึงจนขาดของฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ จะลดลงเมื่ออัตราส่วนของไคตินวิสเกอร์เพิ่มขึ้น ซึ่งเมื่อพิจารณาจากลักษณะพื้นผิวของแผ่นฟิล์มด้วยแล้ว การลดลงของค่าแรงดึงจนขาดเมื่อปริมาณไคตินวิสเกอร์เพิ่มขึ้นเกิดจากการจับกันเป็นก้อนของไคตินวิสเกอร์ ซึ่งมีผลให้การรวมเป็นเนื้อเดียวกันของยางธรรมชาติกับไคตินวิสเกอร์ไม่ดีพอ ทำให้ความสามารถในการดูดซับพลังงานลดลง

สำหรับแนวโน้มของค่าความยืดหยุ่นของชิ้นงานซึ่งดูได้จากค่าการยืดตัวจนขาด (elongation at break) พบว่า แผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 20% ให้ค่าการยืดตัวจนขาดสูงกว่าแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 30% เนื่องจากมีสัดส่วนของยางธรรมชาติซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ให้สมบัติความยืดหยุ่นต่อแผ่นฟิล์มสูงกว่า นอกจากนี้ ค่าการยืดตัวจนขาดของฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ จะลดลงเมื่ออัตราส่วนของไคตินวิสเกอร์เพิ่มขึ้น เนื่องจากสัดส่วนของยางธรรมชาติลดลงและการจับกันเป็นก้อนของไคตินวิสเกอร์ที่เพิ่มขึ้นทำให้มีรอยต่อระหว่างกลุ่มก้อนของวิสเกอร์ซึ่งเป็นบริเวณที่แผ่นฟิล์มเกิดการขาดได้ง่ายเพิ่มมากขึ้นด้วย

การบวมตัวในน้ำของแผ่นฟิล์ม

ค่าการบวมตัวในน้ำของแผ่นฟิล์มจะแสดงถึงความสามารถในการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์ม เมื่อพิจารณาถึงผลของปริมาณเซรีซิน (20% และ 30%) พบว่า แผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 30% มีค่าการบวมตัวในน้ำสูงกว่าแผ่นฟิล์มที่มีปริมาณเซรีซิน 20% อย่างเห็นได้ชัด ผลการทดลองนี้ยืนยันว่าเซรีซินเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ช่วยเพิ่มความสามารถในการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ ดังนั้นจึงสามารถดูดซับเลือดและน้ำหนองที่หลั่งออกมาจากบาดแผลได้ในกรณีที่น่าไปใช้งานเป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผล ในขณะที่ยวกันสามารถทำหน้าที่เป็นสารให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวได้ด้วย

เมื่อพิจารณาถึงผลของปริมาณไคตินวิสเกอร์ที่มีต่อค่าการบวมตัวในน้ำของแผ่นฟิล์ม พบว่า ค่าการบวมตัวในน้ำของแผ่นฟิล์มที่ความเข้มข้นต่างๆ ของไคตินวิสเกอร์ในแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 30% ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่การเติมไคตินวิสเกอร์ลงในแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 20% ทำให้ค่าการบวมตัวในน้ำลดลง อย่างไรก็ตาม ปริมาณไคตินวิสเกอร์ที่เพิ่มขึ้นไม่ได้ส่งผลให้ค่าการบวมตัวในน้ำของแผ่นฟิล์มเกิดการเปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการดูดซับน้ำของแผ่นฟิล์มเป็นผลมาจากปริมาณของเซรีซินในแผ่นฟิล์มเป็นหลัก

ความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์

ผลการประเมินความเป็นไปได้ในการนำแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้จริงทางคลินิก โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (human dermal fibroblast) ด้วยวิธี MTT assay แสดงในตารางที่ 3

จากตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่า หลังเซลล์ผิวหนังที่ใช้ทดสอบโดยการสัมผัสกับชิ้นงานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ยังมีค่าสูงกว่า 70% และสูงถึงมากกว่า 90% ในบางกลุ่มตัวอย่างชิ้นงาน ซึ่งสูงกว่าค่าที่ยอมรับได้คือมากกว่าหรือเท่ากับ 50% อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางโดยวิธีหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงตามด้วยการบำบัดด้วยเอนไซม์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง และการนำผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นไปใช้จริงทางคลินิกมีความปลอดภัยสูง เนื่องจากไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ผิวหนัง

ตารางที่ 3 ร้อยละการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ทดสอบ human dermal fibroblast หลังสัมผัสกับชิ้นงานแผ่นฟิล์มยางธรรมชาติที่ผ่านการลดปริมาณโปรตีนแล้ว แผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน /ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน /ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ชิ้นงาน	ร้อยละการมีชีวิตอยู่ (% cell viability)
แผ่นฟิล์มยางธรรมชาติบริสุทธิ์ที่ผ่านการลดปริมาณโปรตีน	89 ± 4
แผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ (20% เซรีซิน)	73 ± 2
แผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ (1% ไคตินวิสเกอร์)	91 ± 2
แผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ (5% ไคตินวิสเกอร์)	99 ± 3
แผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ (15% ไคตินวิสเกอร์)	98 ± 5

การปลดปล่อยเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์ม

การทดลองเพื่อศึกษาสมบัติในการปลดปล่อยสารเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ และแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การศึกษาถึง (1) ผลของปริมาณเซรีซิน และ (2) ผลของปริมาณไคตินวิสเกอร์ โดยในแต่ละการทดลองได้รายงานผลการคำนวณในรูปของความเข้มข้น และร้อยละของเซรีซินที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากแผ่นฟิล์ม (เทียบกับปริมาณเซรีซินทั้งหมดที่มีในแผ่นฟิล์ม)

ในขณะที่แผ่นฟิล์มยางธรรมชาติไม่แสดงการปลดปล่อยโปรตีนออกจากแผ่นฟิล์ม โปรตีนเซรีซินถูกปลดปล่อยออกมาจากแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติอย่างช้าๆและต่อเนื่อง ทั้งในแผ่นฟิล์มที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 20% และ 30% โดยมีเซรีซินที่ถูกปลดปล่อยออกมาที่เวลา 2 วันในปริมาณ 170 µg/mL และ 240 µg/mL ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาเป็นโปรตีนจากเซรีซิน อย่างไรก็ตาม พบว่าค่าที่ได้จากการคำนวณในรูปร้อยละของเซรีซินมีร้อยละการปลดปล่อยของเซรีซินจากแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติที่มีอัตราส่วนของเซรีซิน/ยางธรรมชาติ 20% สูงกว่าใน 30% คือคิดเป็น 15% และ 13.5% ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของปริมาณไคตินวิสเกอร์ที่มีต่อการปลดปล่อยเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์ม พบว่า แผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ ที่มีอัตราส่วนของไคตินวิสเกอร์น้อย (ได้แก่ 2%) แสดงปริมาณเซรีซินที่ถูกปลดปล่อยจากแผ่นฟิล์มสูงสุด (สูงกว่าแผ่นฟิล์มผสมเซรีซิน/ยางธรรมชาติที่ไม่มีไคตินวิสเกอร์) แต่เมื่อปริมาณไคตินวิสเกอร์เพิ่มขึ้น (5% และ 10%) กลับทำให้ปริมาณเซรีซินที่ถูกปลดปล่อยจากแผ่นฟิล์มลดลง ซึ่งอาจอธิบายได้ว่า การกระจายตัวของเส้นใยไคตินวิสเกอร์อย่างสม่ำเสมอในแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซรีซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์ที่มีอัตราส่วนของไคตินวิสเกอร์ 2% ช่วยเพิ่มความสามารถในการปลดปล่อยเซรีซินออกจากแผ่นฟิล์ม เนื่องจากไคตินวิสเกอร์ไปขัดขวางการเกิดอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างเซรีซิน

การบรรลุวัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ผลที่ได้รับ	บรรลุวัตถุประสงค์ข้อที่....	โดยทำให้.....
แผ่นฟิล์มผสมเซริซิน/ยางธรรมชาติ	1. หาอัตราส่วนและสภาวะที่เหมาะสมในการผสมและขึ้นรูปสารละลายผสมระหว่างเซริซินและน้ำยางธรรมชาติ เพื่อให้สามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้	สามารถขึ้นรูปแผ่นฟิล์มผสมระหว่างเซริซิน/ยางธรรมชาติได้เมื่อมีปริมาณเซริซินในแผ่นฟิล์มไม่เกิน 30%
แผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซริซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์	2. ผสมเส้นใยนาโนของไคตินในอัตราส่วนต่างๆในแผ่นฟิล์มผสมระหว่างเซริซินและน้ำยางธรรมชาติ และหาอัตราส่วนที่เหมาะสม	การผสมไคตินวิสเกอร์ลงในปริมาณ 2% มีผลดีต่อสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มคอมโพสิตเซริซิน/ยางธรรมชาติ/ไคตินวิสเกอร์
แผ่นฟิล์มต้นแบบสำหรับการนำไปใช้งานเป็นแผ่นมาร์สหน้า	3. วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของแผ่นฟิล์มที่ได้ โดยที่แผ่นฟิล์มมีสมบัติสอดคล้องกับการนำไปใช้งานเป็นแผ่นมาร์สหน้า	แผ่นฟิล์มต้นแบบที่มีส่วนผสมของเซริซิน 20% และไคตินวิสเกอร์ 2% มีความแข็งแรงและความยืดหยุ่นสูง อีกทั้งยังสามารถแนบติดกับผิวหนังได้ดีในสภาวะชุ่มน้ำ สามารถให้ความชุ่มชื้นและมีความปลอดภัยต่อเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ จึงเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการนำไปใช้เป็นแผ่นมาร์สหน้า

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ยังไม่มี

หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์และใช้ประโยชน์ด้านไหน

ยังไม่มี

การประชาสัมพันธ์

1. สิ่งพิมพ์ทั่วไป
2. สิ่งพิมพ์ทางวิชาการ

เตรียมบทความทางวิชาการสำหรับเผยแพร่ในวารสารวิชาการในหัวข้อเรื่อง Innovative Sericin Film as Skin Care
Facial Paper Mask: Utilization of Natural Rubber as a Film Binder and Chitin Whiskers as Nanoscopic Fillers

คำชี้แจงต่อข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิต่อโครงการ

“การผลิตแผ่นมาร์สหน้าเพื่อใช้เป็นเวชภัณฑ์บำบัดแผลและดูแลผิวหนังจากเซริซินโดยใช้น้ำยางธรรมชาติเป็นวัตถุดิบ และเพิ่มประสิทธิภาพในการสมานแผลโดยการเติมเส้นใยนาโนของไคติน”

สัญญาเลขที่ RDG5350062

ความคิดเห็นข้อที่	คำชี้แจง
1. ขอให้นักวิจัยทบทวนข้อมูลเกี่ยวกับรายละเอียดของการการเตรียมแผ่นฟิล์มเซริซิน/ยางธรรมชาติ (หน้า 14 ข้อ 2)	ดูคำชี้แจงตามข้อ 2 และ 3
2. หน้า 15 ข้อ 3.4 นักวิจัยควรทบทวนการเตรียมแผ่นฟิล์ม (ตามที่ระบุในหน้า 14 ข้อ 2) คือตามที่ระบุ ปริมาณเซริซินในแผ่นฟิล์ม 0% ถึง 100% (% w/w, เทียบกับน้ำหนักของยางธรรมชาติ) นั้น ไม่น่าจะใช่เพราะจากรูปที่ 7 (หน้า 13) สิ่งสุดท้ายที่ได้จากการเตรียมคือ น้ำยางธรรมชาติโปรตีนต่ำ (เป็นของเหลว ซึ่งนักวิจัยระบุ	การคำนวณปริมาณเซริซินในแผ่นฟิล์ม 0% ถึง 100% (%w/w, เทียบกับน้ำหนักของยางธรรมชาติ) (โดยยางธรรมชาติในที่นี้ หมายถึง ยางที่ผ่านการลดปริมาณโปรตีนแล้ว) ตัวอย่างการคำนวณ: การเตรียมแผ่นฟิล์ม 10 %w/w เซริซิน/ยางธรรมชาติ กำหนดให้ใช้สารละลายเซริซิน 100 mL เนื่องจากน้ำหนักต่อปริมาตรเฉลี่ยของสารละลายเซริซิน = 1 %w/v ในสารละลายเซริซิน 100 mL มีน้ำหนักแห้งของเซริซิน = 1 g ต้องการเตรียมแผ่นฟิล์ม 10 %w/w เซริซิน/ยางธรรมชาติ หมายถึง จะมีเนื้อเซริซิน 10 g หากมีเนื้อยาง 100 g หากมีเนื้อเซริซิน 1 g จะมีเนื้อยาง $(100 \text{ g} / 10 \text{ g}) \times 1 \text{ g} = 10 \text{ g}$ เนื่องจากน้ำยางธรรมชาติโปรตีนต่ำมี TSC = 36% หมายถึง จะมีเนื้อยาง 36 g ในน้ำยาง 100 mL ต้องการเนื้อยาง 10 g ต้องใช้น้ำยาง $(100 \text{ mL} / 36 \text{ g}) \times 10 \text{ g} = 27.78 \text{ mL}$

	ดังนั้น ในการเตรียมแผ่นฟิล์ม 10 %w/w เซรีซิน/ยางธรรมชาติ จึงนำสารละลายเซรีซิน 100 mL มาผสมกับน้ำยางธรรมชาติโปรตีนต่ำ 27.78 mL ทำการขึ้นรูปฟิล์มโดยเทสารละลายผสมที่ได้ปริมาตร 20 มิลลิตร ลงใน Petri dish แก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร แล้วอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ ผู้วิจัยเลือกคำนวณโดยใช้หน่วย %w/w เนื่องจากน้ำยางธรรมชาติที่ได้มาในแต่ละครั้งจะมีปริมาณเนื้อยางที่ต่างกัน ดังนั้น การคำนวณโดยการเทียบโดยน้ำหนัก จึงสามารถเป็นค่ามาตรฐานที่ดีกว่าการเทียบโดยปริมาตร
ความคิดเห็นข้อที่	คำชี้แจง
3. ขอให้ตรวจสอบ/ทบทวนว่า น้ำยางหลังการปั่นเหวี่ยง/ทรีต ลดโปรตีนแล้ว มีค่า TSC ต่ำเพียง 36% แน่หรือ? อนึ่งสูตรที่นักวิจัยชี้แจงการคำนวณค่า %TSC ในคำชี้แจงต่อความเห็นในการประเมินรายงานความก้าวหน้ารอบ 9 เดือนนั้น ถูกต้อง	<u>น้ำยางธรรมชาติโปรตีนต่ำมี TSC = 36% เนื่องจาก</u> หลังการปั่นเหวี่ยงเนื้อยางที่ได้จะมีลักษณะเป็นก้อนจับกันและแยกตัวออกมาอยู่บริเวณส่วนบนของหลอด centrifuge ซึ่งไม่สามารถนำมาผสมกับสารละลายเซรีซินได้ทันที ต้องนำมาเจือจางด้วยสารละลายแอมโมเนีย 0.6% ก่อนเพื่อให้กลับมาอยู่ในรูปของสารละลายดังเดิม (ตามแผนผังแสดงขั้นตอนการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางในรูปที่ 7) ค่า TSC จึงต่ำเพียง 36% ทั้งนี้ค่า TSC คำนวณได้จากการนำสารละลายหลังการเจือจาง 10 mL มาอบจนแห้ง จากนั้นจึงนำมาชั่งน้ำหนัก พบว่า คิดเป็นเนื้อยางแห้งหนัก 3.6 g ดังนั้นค่า TSC = $(3.6 \text{ g} / 10 \text{ mL}) \times 100$ = 36%
4. ยังมองไม่เห็นภาพการนำไปทดสอบจริง อาจจะเป็นผิวหนังของ	ในการที่จะทำการทดสอบผลิตภัณฑ์ในสัตว์ทดลองได้นั้นจะต้องผ่านขั้นตอนของการพิจารณาเห็นชอบจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองก่อน ทั้งนี้การทดลองจะต้องเป็นไปตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่กำหนดโดยสภาวิจัยแห่งชาติ หรือการ

ความคิดเห็นข้อที่	คำชี้แจง
5. ควรมีข้อมูลเปรียบเทียบกับของนำเข้าจากต่างประเทศในเชิงวิทยาศาสตร์	การเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้กับผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศจะต้องเปรียบเทียบโดยดูจากผลการรักษาบาดแผลจริงจึงจะสามารถสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ให้ผลในการรักษาได้ในระดับใดเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นถ้าสามารถทำการวิจัยในขั้นสัตว์ทดลองก็สามารถแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองเป็นสองกลุ่มในการทดสอบผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นกับผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ
ข้อเสนอแนะข้อที่	คำชี้แจง
1. เมื่อได้ผลการทดลองแล้ว นักวิจัยควรขอความร่วมมือทาง การแพทย์เพื่อนำไปใช้จริง คือการแปะแผ่นดังกล่าว เพื่อจะได้ข้อมูลที่แท้จริงเป็นเบื้องต้น แล้วจึงนำไปต่อยอดในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป	การทดลองในคนนั้นจำเป็นต้องมีกลุ่มอาสาสมัครที่เป็นผู้ป่วยที่ยินดีเข้าร่วมในการวิจัย ดังนั้นความร่วมมือจากแพทย์จึงเป็นสิ่งสำคัญ ถ้ามีแพทย์ที่ให้ความสนใจในงานวิจัยนี้และต้องการจะนำไปทดลองใช้กับผู้ป่วย ผู้วิจัยก็มีความยินดีที่จะให้ความร่วมมืออย่างเต็มที่
2. งานวิจัยสามารถขยายผลในเชิงธุรกิจได้	ถ้ามีผู้ประกอบการสนใจลงทุนก็น่าจะสามารถขยายผลในเชิงธุรกิจได้ อย่างไรก็ตามการทำการตลาดให้กับผลิตภัณฑ์ก็เป็นปัจจัยสำคัญในการประสบความสำเร็จทางธุรกิจของการจำหน่ายผลิตภัณฑ์นี้ ดังนั้นจึงน่าจะมีนักการตลาดมาร่วมให้คำปรึกษาแนะนำ