



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของ EDTA
Synthesis of EDTA nanoparticles

ชื่อนิสิต	นายเพชร สายเชื้อ	เลขประจำตัว	6033065023
ภาควิชา	เคมี		
ปีการศึกษา	2563		

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของ EDTA
Synthesis of EDTA nanoparticles

โดย
นายเพชร สายเชื้อ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

โครงการ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของ EDTA


โดย นายเพชร สายเชื้อ


ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

- | | |
|---|------------------|
| 1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภาค อนุตรศักดิ์ดา | ประธานกรรมการ |
| 2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สกุณสุข อุ๋นอรุโณทัย | กรรมการ |
| 3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ | อาจารย์ที่ปรึกษา |

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี


(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ)
อาจารย์ที่ปรึกษา


(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิร์ โยเว่น)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 27 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2564

ชื่อโครงการ การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของ EDTA

ชื่อนิสิตหัวหน้าโครงการ นายเพชร สายเชื้อ เลขประจำตัว 6033065023

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โรจน์ฤทธิ์ โจงนเศนศ

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้สังเคราะห์อนุภาคนาโนของแคลเซียมฮีทไทเทได้สำเร็จ สภาวะที่ใช้สังเคราะห์ปรับตามอัตราส่วนและความเข้มข้นของฮีทไทเทและแคลเซียมไอออน เวลาในการตกตะกอนร่วม และ ชนิดและความเข้มข้นของพอลิเมอร์รองรับ โดยพิสูจน์เอกลักษณ์อนุภาคนาโนที่ได้ด้วยหลายเทคนิครวมเช่น เอ็นทีเอ ดีแอลเอส ไอซีพี-ไออีเอส และ อีเอ และยังพบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียซูโดโมแนส แอรูจิโนซาของอนุภาคนาโนนี้ด้วย

คำสำคัญ: การยับยั้งแบคทีเรีย, อนุภาคนาโนของแคลเซียมฮีทไทเท, การตกตะกอนร่วม, พอลิเมอร์รองรับ, แบคทีเรียซูโดโมแนส แอรูจิโนซา

Project Title Synthesis of EDTA nanoparticles

Student Name Phachara Saichau

Student ID 6033065023

Advisor Name Assistant Professor Rojrit Rojanathanes, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2020

Abstract

This research successfully synthesised calcium EDTA nanoparticles. The synthesis condition was optimised by varying ratio and concentration of EDTA and Ca^{2+} , reaction time, and type and concentration of polymer support. The nanoparticles were characterised by several techniques including NTA DLS, ICP-OES and EA. The antibacterial activity of the nanoparticles was also found against *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: antibacteria inhibition, Ca_2EDTA nanoparticles, co-precipitation, polymer support, *Pseudomonas aeruginosa*

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงเพราะได้รับความกรุณาให้การช่วยเหลืออย่างดีจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โรจน์ฤทธิ์ โรจนธเนศ ที่ได้คำแนะนำและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องมาโดยตลอด

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ โสเว่น ที่อนุเคราะห์ polymer support สำหรับใช้ในการสังเคราะห์

ขอขอบคุณบริษัท ซายน์สเปค จำกัด ที่สนับสนุนเครื่อง ICP-OES ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภาค อนุตรศักดิ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สกุลสุข อุ๋นอรุณทัย ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบการวิจัยอีกทั้งตรวจแก้ไขรายงานให้มีความสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ให้ความรู้และประสบการณ์ และขอขอบคุณพี่ๆ ในห้องวิจัยทุกคนที่ได้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับกระบวนการทำงาน จนสามารถดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เพชร สายเชื้อ

ผู้วิจัย

สารบัญ

บทคัดย่อ.....	ค
Abstract.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ.....	1
1.2 การทบทวนวรรณกรรม (Literature review).....	2
1.3 วัตถุประสงค์.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 วิธีการดำเนินงาน	3
1.6 ทฤษฎี	5
1.6.1 Disodium ethylenediaminetetraacetic acid (Na ₂ -EDTA).....	5
1.6.2 หลักการสังเคราะห์อนุภาคนาโน.....	6
1.6.3 การเคลือบอนุภาคนาโนด้วย polymer support.....	6
1.6.4 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).....	8
1.6.5 Dynamic Light Scattering (DLS)	9
1.6.6 Stokes-Einstein equation.....	9
1.6.7 Minimum inhibition concentration (MIC)	10
บทที่ 2 การทดลอง	12
2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	12
2.1.1 เครื่องมือ	12
2.2 สารเคมี	12
2.2.1 สารเคมีสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของEDTA	12

2.3	วิธีการทดลอง.....	13
2.3.1	การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของ calcium EDTA.....	13
2.3.2	ปรับปรุงการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของ EDTA.....	13
2.3.3	การเคลือบอนุภาคนาโนด้วย polymer support.....	14
2.3.4	การเตรียมสารเพื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์.....	16
บทที่ 3 ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลอง.....		17
3.1	การสังเคราะห์อนุภาคนาโน.....	17
3.1.1	การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca ²⁺ ตาม ตารางที่ 2.1.....	17
3.1.2	การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca ²⁺ (1:7).....	18
3.1.3	การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยการปรับเปลี่ยนเวลาในการ เขย่า.....	19
3.2	การเคลือบอนุภาคนาโนด้วย polymer support.....	20
3.2.1	เปรียบเทียบขนาดของอนุภาคนาโนแบบที่เคลือบและไม่เคลือบ polymer ด้วยเทคนิค DLS.....	20
3.2.2	การเคลือบอนุภาคนาโนด้วย polymer support โดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ polymer support.....	21
3.2.3	การเคลือบ polymer support โดยการปรับเปลี่ยนชนิด.....	22
3.3	การศึกษาหาอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca ²⁺ ที่อยู่ในอนุภาคนาโน.....	23
3.3.1	การศึกษาหาปริมาณของ Ca ²⁺ ภายในอนุภาคด้วยเทคนิค Inductive Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) ผ่าน External calibration method.....	23
3.3.2	การศึกษาหาปริมาณของ N ภายในอนุภาคด้วยเทคนิค Elemental analysis ผ่าน CHNS method.....	23
3.3.3	การคำนวณเพื่อหาอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca ²⁺ ภายในอนุภาคนาโน.....	23
3.4	การพิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อเทียบระหว่างอนุภาคนาโนแบบที่มีและไม่มี polymer support ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer.....	25
3.5	ศึกษาผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย.....	28
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง.....		29
เอกสารอ้างอิง.....		30
ภาคผนวก ก.....		33
ประวัติผู้วิจัย.....		35

สารบัญรูป

รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ Na ₂ -EDTA	5
รูปที่ 1.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแบบ top – down และ bottom – up.....	6
รูปที่ 1.3 โครงสร้างของ Carboxymethyl cellulose polymer support.....	7
รูปที่ 1.4 โครงสร้างของ Tween 80	7
รูปที่ 1.5 โครงสร้างของ Polyvinyl alcohol.....	8
รูปที่ 1.6 เทคนิค Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).....	9
รูปที่ 1.7 เทคนิค Dynamic Light Scattering (DLS).....	9
รูปที่ 1.8 resazurin microplate assay	10
รูปที่ 1.9 Minimum inhibition concentration (MIC)	11
รูปที่ 3.1 อัตราส่วนที่ดีที่สุดของ EDTA : Ca ²⁺ ที่ทำได้ คอลลอยด์สีขาวคล้ายนม คืออัตราส่วน 1:6 และ 1:7 ตามลำดับ	17
รูปที่ 3.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้น 6.80, 5.95, 4.42 M ตามลำดับ.....	18
รูปที่ 3.3 เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคนาโนโดยการปรับเปลี่ยนเวลาในการ เขย่า	19
รูปที่ 3.4 เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคนาโนแบบที่เคลือบและไม่เคลือบ polymer support.....	20
รูปที่ 3.5 เส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคนาโนโดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ tween 80 polymer support.....	21
รูปที่ 3.6 เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคนาโนโดยปรับเปลี่ยนชนิดของ polymer support.....	22
รูปที่ 3.7 กราฟ FT-IR ของอนุภาคนาโนชนิดต่างๆและ CMC polymer.....	25
รูปที่ 3.8 กราฟ FT-IR ขยายพิกัดในช่วง C=O stretching.....	26
รูปที่ 3.9 กราฟ FTIR. ของ Tween 80 polymer [30].....	26

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 การปรับเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca²⁺ 13

ตารางที่ 2.2 การปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca²⁺ 1:7..... 14

ตารางที่ 2.3 ปรับเปลี่ยนเวลาในการ เขย่า 14

ตารางที่ 2.4 การเตรียม support polymer โดยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ support polymer 15

ตารางที่ 2.5 การเคลือบ support polymer โดยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ support polymer 15

ตารางที่ 2.6 การเตรียม support polymer โดยการปรับเปลี่ยนชนิดของ support polymer 15

ตารางที่ 3.1 ร้อยละของ Ca²⁺ ภายในอนุภาคด้วยเทคนิค Inductive Coupled Plasma..... 23

ตารางที่ 3.2 ปริมาณของ Nitrogen ภายในอนุภาคด้วยเทคนิค Elemental analysis ผ่าน CHNS method..... 23

ตารางที่ 3.3 ปริมาณของ Ca²⁺ และ EDTA ในอนุภาคนาโนแต่ละแบบ 23

ตารางที่ 3.4 อัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca²⁺ ภายในอนุภาคนาโน 24

ตารางที่ 3.5 การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียระหว่าง EDTA และ อนุภาคนาโนของ EDTA..... 28

ตารางที่ ก.4.1 External calibration curve ของ Ca²⁺ 33

สัญลักษณ์และคำย่อ

°C	องศาเซลเซียส
g	กรัม
M	โมลาร์
mg	มิลลิกรัม
L	ลิตร
mL	มิลลิลิตร
µL	ไมโครลิตร
nm	นาโนเมตร
% w/v	เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร
M.W.	น้ำหนักโมเลกุล
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometer
FT-IR	Fourier-transform infrared spectroscopy
EA	Elemental Analyzer
DLS	Dynamic Light Scattering
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
MIC	Minimum inhibition concentration
CMC	Carboxymethyl cellulose
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
PVA	Polyvinyl alcohol

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

การติดเชื้อในปอดเป็นสาเหตุหลักของการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตในผู้ป่วยโรคปอดเรื้อรัง การติดเชื้อเช่นนี้ทำให้เนื้อเยื่อของผู้ป่วยเสียหายและอาจเสียชีวิตได้ โดยสาเหตุหลักมาจากแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa*[1, 2] การรักษาการติดเชื้อเป็นไปได้ยาก เนื่องจากสารต้านจุลชีพธรรมดาไม่สามารถสามารถกำจัดการติดเชื้อที่สร้างฟิล์มชีวภาพได้ สำหรับเป้าหมายในการต่อต้านการสร้างฟิล์มชีวภาพที่เป็นไปได้ เช่น ทำให้ฟิล์มชีวภาพอ่อนแอลงด้วย quorum-sensing inhibitors หรือ ฆ่าแบคทีเรียด้วยยาปฏิชีวนะ[3] แต่พบว่าตัวแบคทีเรียที่มีกลไกในการสร้างฟิล์มชีวภาพสามารถทนต่อยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นสูงได้หรือที่เรียกว่า “recalcitrance” นำไปสู่การรักษาที่ล้มเหลวและการติดเชื้อซ้ำ[4] การรักษาทางคลินิกโดยใช้ยาปฏิชีวนะมักจะพิจารณาประสิทธิภาพจากความเข้มข้นต่ำที่สุดของการยับยั้งหรือ MIC[5] ดังนั้นในการรักษาเป็นเพียงการให้ความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่สูงขึ้น และ ใช้เวลาในการรักษานานกว่าปกติ ซึ่งบ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการรักษาที่ต่ำ[6]

ยาปฏิชีวนะที่นิยมนำมาใช้รักษาโรคที่เกิดจาก แบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* คือ gentamicin ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้กันทั่วไปในปัจจุบัน แต่มีประสิทธิภาพในการรักษาจะขึ้นกับความสามารถในการดื้อยาของแบคทีเรีย ยิ่งการรักษาโรคที่เกี่ยวกับปอดซึ่งเป็นตำแหน่งที่ยาเข้าถึงได้ค่อนข้างน้อยอาจก่อให้เกิดเกิดการดื้อยาได้ [7] และจากการศึกษายับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียพบว่ายากลุ่มนี้มีค่า MIC ในระดับ $\mu\text{g/ml}$ [8] ถึงแม้จะมีค่า MIC ที่ต่ำแต่การรักษาด้วยยาปฏิชีวนะเสี่ยงต่ออาการดื้อยาจากการกลายพันธุ์โดยการสร้างชั้นฟิล์มชีวภาพของแบคทีเรียในครั้งต่อไป

ในงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะพัฒนายาที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีประสิทธิภาพดีขึ้นและไม่เสี่ยงต่ออาการดื้อยา โดยจากการศึกษาทางวิจัยพบว่า EDTA ได้รับการยอมรับว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยผ่านการทำลายเยื่อหุ้มแบคทีเรีย[9] ค่า MIC ของ EDTA ในระดับ $\mu\text{g/ml}$ [10] และยังมีกรยืนยันว่า EDTA มีความสามารถในการทำลายฟิล์มชีวภาพซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการดื้อยาของแบคทีเรียได้ดีกว่า ยา gentamicin ถึง 1000 เท่า[11] และจากการศึกษาพบว่าขนาดของอนุภาคมีผลต่อพฤติกรรมเมื่ออยู่ภายใน cell โดยยิ่งขนาดเล็กก็มีความสามารถในการแพร่กระจายได้ดีกว่าและยังสามารถถูกกำจัดได้ง่ายกว่า[12] ทางผู้วิจัยจึงคาดว่าอนุภาคนาโนของEDTAจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa*

1.2 การทบทวนวรรณกรรม (Literature review)

ในปี 1976 DALIUS J. BRIEDIS และคณะ[8] ได้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยยา gentamicin กับ แบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* PA01 พบว่าได้ค่า MIC มากกว่า 25 $\mu\text{g/ml}$ จากการศึกษาพบว่า แบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* PA01 สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะอย่าง ยา ciprofloxacin แต่ยังคงมีความเสี่ยงต่อการดื้อยาของแบคทีเรีย

ในปี 2006 Ehad Banin และคณะ[11] ได้ทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่าง EDTA กับ ยาปฏิชีวนะที่ใช้กันทั่วไปอย่างยา gentamicin สำหรับการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* PA01 ที่สามารถสร้างฟิล์มชีวภาพได้ พบว่า EDTA มีความสามารถในการทำลายฟิล์มชีวภาพ ซึ่งเป็นสาเหตุของการดื้อยาของแบคทีเรียชนิดนี้ได้ดีกว่ายา gentamicin ถึง 1000 เท่า

ในปี 2020 Abdel-Rhman SH และคณะ[10] ได้นำ EDTA มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* PA01 พบว่าได้ค่า MIC อยู่ในช่วง 39-12500 $\mu\text{g/ml}$ จากข้อมูลข้างต้นทำให้ EDTA เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับการศึกษาเพื่อพัฒนาต่อสำหรับเป็นยาในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* PA01

ในปี 2011 Neeraj Kumar และคณะ[13] สังเคราะห์อนุภาคนาโนของ EDTA โดยเริ่มจากการ $\text{Ca-Na}_2\text{EDTA}$ จากนั้นใช้ Polyvinyl alcohol (PVA) เป็น polymer support ที่ความเข้มข้น 1% (w/v) และใช้ stirring rate ในช่วง 1200 - 1400 rpm ซึ่งขนาดของอนุภาคนาโนที่ได้เฉลี่ยที่ 300 - 400 nm นำอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ดักจับโลหะในปอด เทียบกับ EDTA เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดไมโครเมตร ซึ่งสามารถบ่งบอกได้ว่าขนาดของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ขึ้นกับความเข้มข้นของ polymer support

ในงานวิจัยนี้จะปรับปรุงวิธีการสังเคราะห์และเพิ่มประสิทธิภาพของอนุภาคนาโน EDTA ด้วยการปรับเปลี่ยนชนิดและความเข้มข้นของ polymer support จากนั้นนำไปศึกษาผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเทียบกับ EDTA ปกติและยาปฏิชีวนะชนิด gentamicin

1.3 วัตถุประสงค์

1. สังเคราะห์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนของ EDTA
2. ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* PA01

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ในด้านความรู้และประสบการณ์ต่อตัวนิสิตเอง

1. มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของ EDTA
2. สามารถหาประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพของการสังเคราะห์ได้จากเทคนิค

ICP-OES และ EA

ความรู้ ความเข้าใจที่จะนำไปสู่การแก้ไขปัญหาของสังคมหรือสภาพแวดล้อม

1. วิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของ EDTA สามารถนำไปต่อยอดในภาคการวิจัยและภาคอุตสาหกรรมได้ในการนำไปใช้ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

1.5 วิธีการดำเนินงาน

ก. แผนการศึกษา

1. ศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.1. ศึกษาข้อมูลคุณสมบัติของสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์

1.2. ศึกษารวบรวมงานวิชาการที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ อนุภาคนาโนของ EDTA

2. สังเคราะห์และปรับปรุงความเสถียรด้วย polymer support ของอนุภาคนาโนของ EDTA โดยใช้ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ เป็นสารตั้งต้น

3. วัดขนาดของอนุภาคนาโนแบบปกติและแบบที่ใส่ polymer support ด้วยเทคนิค NTA และ DLS

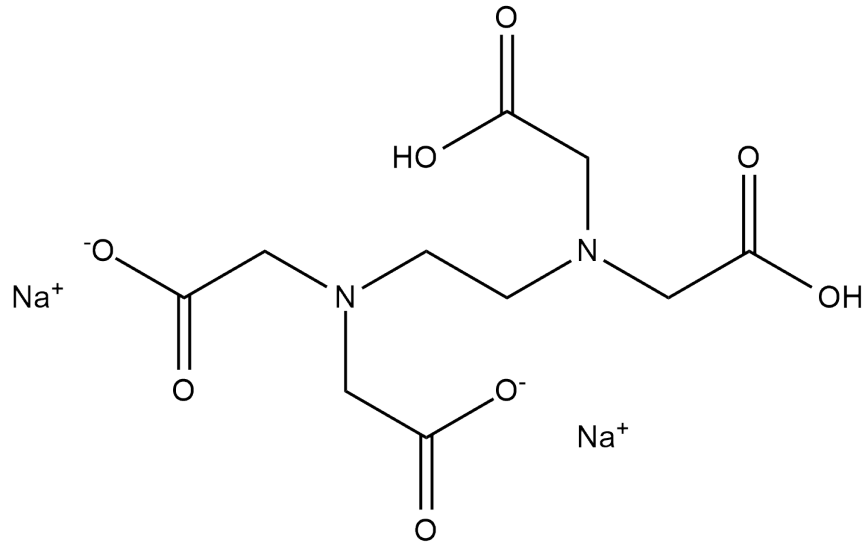
4. พิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคนาโนของ EDTA แบบปกติและแบบที่ใส่ polymer support ด้วยเทคนิค FTIR, ICP-OES, EA, NTA และ DLS

5. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนรายงาน

1.6 ทฤษฎี

1.6.1 Disodium ethylenediaminetetraacetic acid (Na₂-EDTA)

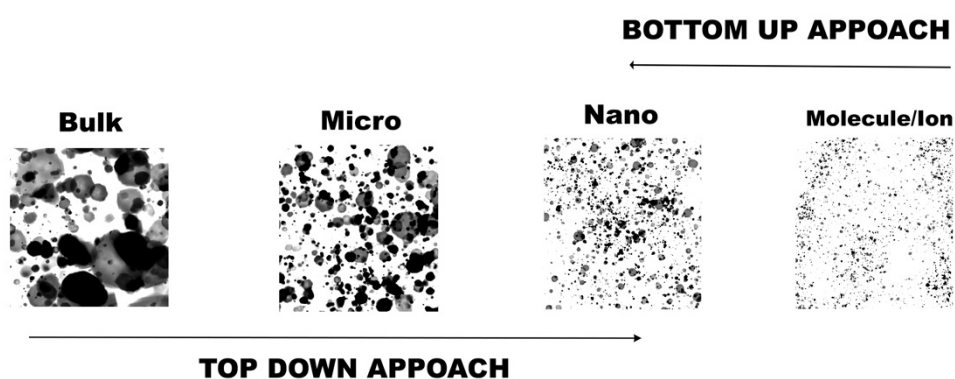
Disodium ethylenediaminetetraacetic acid หรือ C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ เป็นสารประกอบของเกลือโซเดียมที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ซึ่งเป็นสารที่สามารถทำคีเลตกับไอออนของโลหะหนักได้. โดย EDTA จะสร้างพันธะกับโลหะแล้วได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถละลายน้ำได้โดยจะสามารถถูกขับออกได้ทางไต[14]



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ Na₂-EDTA

1.6.2 หลักการสังเคราะห์อนุภาคนาโน

การสังเคราะห์อนุภาคนาโนมี 2 วิธีหลักคือ top - down และ bottom - up โดยในงานวิจัยนี้เลือกสังเคราะห์แบบ bottom - up เนื่องจากวิธี top - down เป็นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนจากวัสดุขนาดใหญ่ โดยใช้กระบวนการทาง physicochemical ซึ่งมีผลให้พื้นผิวของอนุภาคนาโนไม่สม่ำเสมอและส่งผลต่อคุณสมบัติของอนุภาคนาโน แต่การสังเคราะห์แบบ bottom - up เป็นการรวมตัวของ ไอออน อะตอม หรือ โมเลกุล ขนาดเล็กจนใหญ่ขึ้นเป็นระดับนาโนเมตร ทำได้หลากหลายวิธี ในงานวิจัยนี้ได้ใช้การตกตะกอนร่วมระหว่าง carboxylate group ของ EDTA และ Ca^{2+} [15, 16]



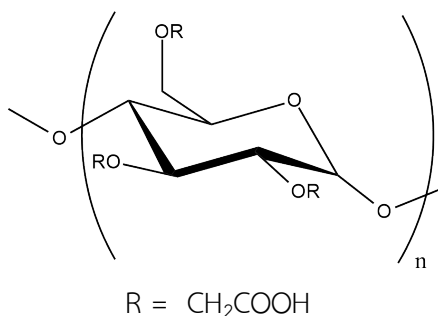
รูปที่ 1.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนแบบ top - down และ bottom - up

1.6.3 การเคลือบอนุภาคนาโนด้วย polymer support

เนื่องจากความสามารถในการรวมตัว (aggregation) ของอนุภาคขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายน้ำของอนุภาค โดยอนุภาคนาโนจะละลายกลับมาอยู่ในสภาพไอออนแล้วจากนั้นจึงค่อยเกิดปฏิกิริยาเคมีกับอนุภาคนาโนข้างเคียงแล้วเกิดเป็นอนุภาคนาโนขนาดใหญ่ขึ้นเปรียบเสมือนการพอกของอนุภาค โดยเมื่อเติม polymer ลงไปเคลือบที่ผิวของอนุภาคนาโนทำให้อนุภาคนาโนมีความเสถียรมากขึ้น ละลายน้ำได้น้อยลง และมีแนวโน้มจะเกิดการรวมตัวน้อยลง [17]

1.6.3.1 Carboxymethyl cellulose (CMC)

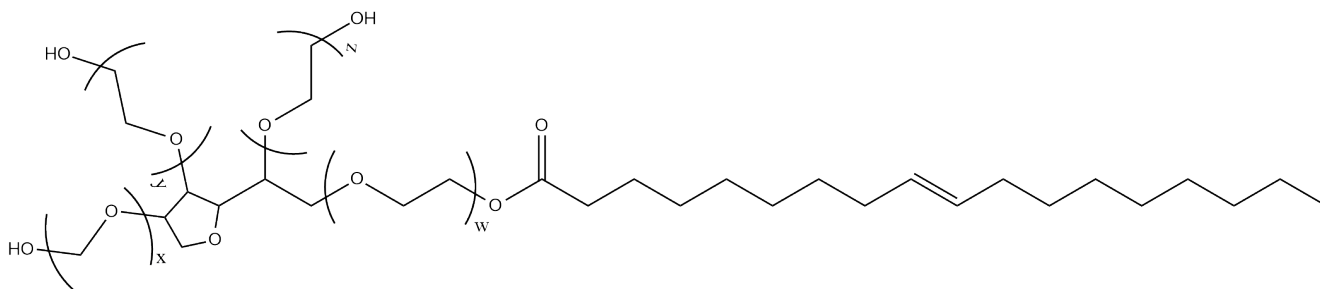
Carboxymethyl cellulose หรือ เป็นสารประกอบในกลุ่ม cellulose สูตรทางเคมีคือ $(C_8H_{16}O_8)_n$ เป็นของแข็งสีขาวขุ่น โดยขนาดของ CMC โดยในงานวิจัยนี้เลือก 2 ขนาดคือมี M.W. ประมาณ 90,000 และ 250,000 เพื่อเปรียบเทียบผลของขนาดพอลิเมอร์ ด้วยโครงสร้างของ Carboxymethyl cellulose เป็นพอลิเมอร์ที่มีหน่วยซ้ำเป็นอนุพันธ์ของ cellulose ซึ่งไม่เป็นพิษและสามารถย่อยสลายได้ด้วยวิธีทางชีวภาพ[18] และจากงานวิจัยพบว่า CMC เป็นตัว stabilizer ที่ดีในการนำมาเคลือบในอนุภาคนาโนที่มีน้ำเป็นตัวกลาง ซึ่งหมู่ carboxylate ของ CMC ในสถานะเบสจะจับกับอนุภาคนาโนด้วย ion - dipole [19]



รูปที่ 1.3 โครงสร้างของ Carboxymethyl cellulose polymer support

1.6.3.2 2-[2-[3,5-Bis(2-hydroxyethoxy)oxolan-2-yl]-2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy]ethyl (E)-octadec-9-enoate (Tween 80)

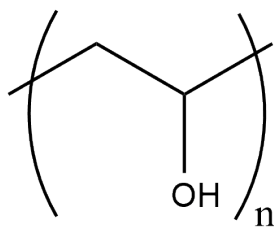
Tween 80 หรือ $(C_{32}H_{60}O_{10})_n$ เป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอำพัน มี pH ระหว่าง 5-7 และมีรสขม จากหลายงานวิจัยพบว่าเมื่อเคลือบ tween 80 ลงบนพื้นผิวของอนุภาคนาโนสามารถรักษาเสถียรภาพของอนุภาคนาโนในสารละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพโดย ซึ่งหมู่ hydroxy ของ Tween 80 ในสถานะเบสจะจับกับอนุภาคนาโนด้วยแรง ion - dipole [20, 21]



รูปที่ 1.4 โครงสร้างของ Tween 80

1.6.3.3 Polyvinyl alcohol (PVA)

Polyvinyl alcohol หรือ $(C_2H_4O)_n$ เป็นของแข็งสีขาวละลายได้ดีในน้ำในช่วง pH ประมาณ 5 – 8 จากหลายงานวิจัยพบว่าเมื่อนำ PVA ไปเคลือบที่ผิวของอนุภาคนาโนจะเพิ่มความเสถียรของอนุภาคและลดการรวมตัวกันของอนุภาคได้ เนื่องจากสาย alkyl ของ PVA ที่เข้าไปล้อมจะสามารถป้องกันการรวมตัวกันของอนุภาคนาโนได้ ซึ่งหมู่ hydroxy ของ Tween 80 ในสภาวะเบสจะจับกับอนุภาคนาโนด้วยแรง ion - dipole [22, 23]

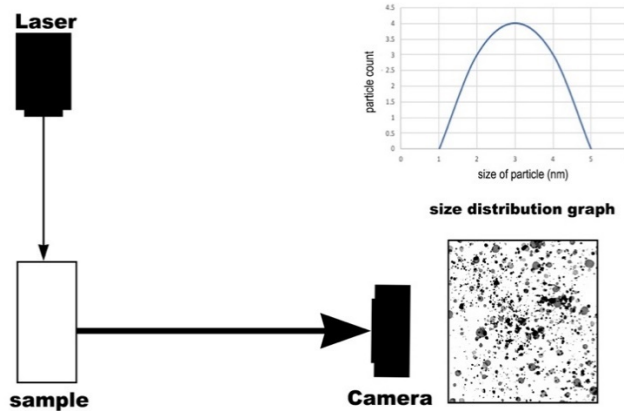


รูปที่ 1.5 โครงสร้างของ Polyvinyl alcohol

1.6.4 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

หลักการวิเคราะห์ของเทคนิค Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

NTA เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวัดขนาดของอนุภาคที่อยู่ในช่วง 10 – 1000 nm โดยหลักการทำงานของ NTA อนุภาคในสารคอลลอยด์ที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายจะถูกเติมลงในภาชนะและถูกยิงด้วยแสงเลเซอร์ แสงเลเซอร์ที่ผ่านอนุภาคจะกระเจิงออกและถูกตรวจวัดได้ด้วยกล้องดิจิทัล ซึ่งจะแสดงข้อมูลเป็นภาพการเคลื่อนที่ของอนุภาคแบบไร้รูปแบบ (Brownian) การเคลื่อนที่ของอนุภาคในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำๆ สามารถคำนวณได้จากความหนืดของตัวกลาง อุณหภูมิ และขนาดของอนุภาค Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) software จะวิเคราะห์จำนวนอนุภาคแต่ละตัวโดยใช้สมการของ Stokes-Einstein ในการคำนวณหา Hydrodynamic Size หรือขนาดของอนุภาคที่ขึ้นอยู่กับพฤติกรรมเมื่ออยู่ในของไหล[24]

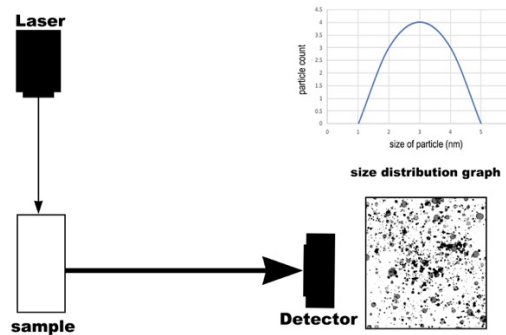


รูปที่ 1.6 เทคนิค Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

1.6.5 Dynamic Light Scattering (DLS)

หลักการวิเคราะห์ของเทคนิค Dynamic Light Scattering (DLS)

DLS เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวัดขนาดของอนุภาคที่อยู่ในช่วง $0.005 - 5 \mu\text{m}$ โดยหลักการทำงานของ DLS วัดขนาดของอนุภาคในสารคอลลอยด์ที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย โดยอาศัยการกระเจิงของแสง อนุภาคที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่อย่างไร้รูปแบบ (Brownian) การเคลื่อนที่ของอนุภาคในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำๆ สามารถคำนวณได้จากความหนืดของตัวกลาง อุณหภูมิ และขนาดของอนุภาค ดังสมการของ Stokes-Einstein ซึ่งขนาดที่ได้จะเป็นจะเป็นการคำนวณผ่าน Hydrodynamic Size หรือขนาดของอนุภาคที่ขึ้นอยู่กับพฤติกรรมของอนุภาคเมื่ออยู่ในของไหล[25, 26]



รูปที่ 1.7 เทคนิค Dynamic Light Scattering (DLS)

1.6.6 Stokes-Einstein equation

ทฤษฎีที่ใช้อธิบายการเคลื่อนที่แบบ Brownian ของอนุภาคคอลลอยด์ โดยการเคลื่อนที่จะถูกอธิบายผ่านการแพร่ของอนุภาคเนื่องจากการเคลื่อนที่แบบ Brownian จะเป็นการเคลื่อนที่แบบสุ่มจากที่ที่มีความเข้มข้นสูงไปต่ำ ซึ่งจะอธิบายผ่านสมการ สมการที่ 1.1

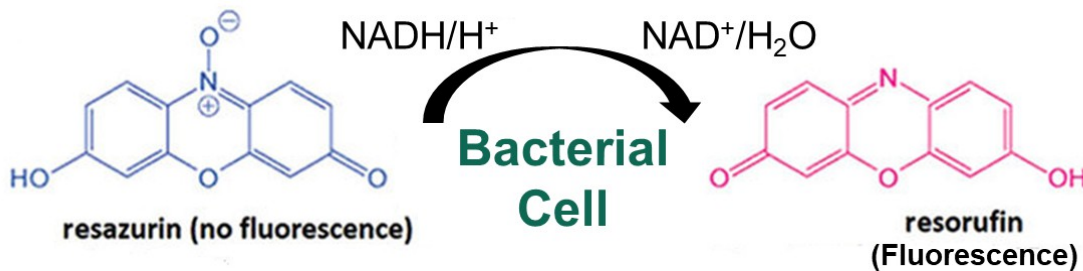
$$D = \frac{kT}{6\pi\eta d_H}$$

สมการที่ 1.1 สมการของ Stokes-Einstein

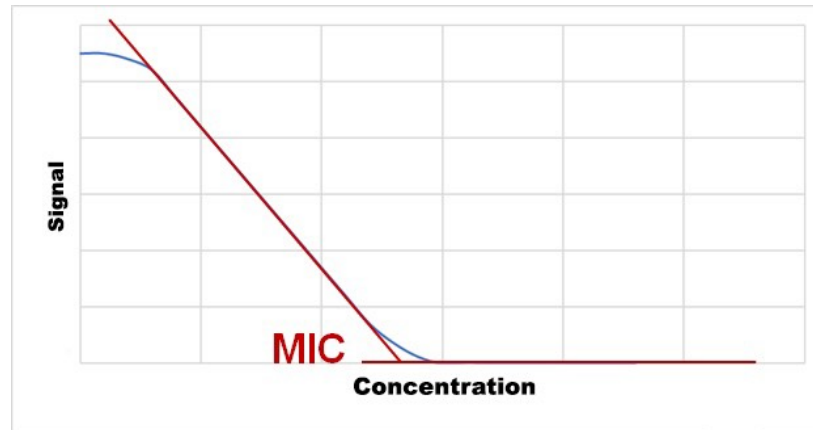
โดย D คือ สัมประสิทธิ์การแพร่ k คือ Boltzmann's constant T คือ อุณหภูมิ d_H คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคที่มีรูปร่างเป็นทรงกลม (Hydrodynamic diameter) η คือ ความหนืดของคอลอยด์[27]

1.6.7 Minimum inhibition concentration (MIC)

ความเข้มข้นของยาที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของยาได้ ถ้ายิ่งค่า MIC ต่ำแสดงว่าประสิทธิภาพของยายิ่งสูง ซึ่งวิธีที่นิยมในการทดสอบมี 2 วิธี Dilution test และ Agar disk diffusion test ในงานวิจัยนี้ใช้วิธี Dilution test เป็นหาค่า MIC จากการเจือจางยาให้มีความเข้มข้นต่างๆนำไปทดสอบกับเชื้อที่กำลังเจริญเติบโต (In vivo) แล้วหาความเข้มข้นยาที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียตายหมด ดังรูปที่ 1.9 [28] โดยใช้เทคนิค fluorometric-based assay ในการตรวจวัด ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยปฏิกิริยาภายในเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิต ยกตัวอย่างเช่น resazurin microplate assay ที่อาศัยปฏิกิริยา reduction ของ resazurin โดยอาศัย $NADH/H^+$ ที่อยู่ภายในแบคทีเรีย ซึ่งหลังจากเกิดปฏิกิริยาจะได้สารที่ให้แสง Fluorescence โดยปริมาณแสงที่วัดได้จะแปรผันตรงกับปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ยังมีชีวิต[29]



รูปที่ 1.8 resazurin microplate assay



รูปที่ 1.9 Minimum inhibition concentration (MIC)

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1 เครื่องมือ

2.1.1.1 Fourier Transform–Infrared spectrometer (Nicolet 6700)

2.1.1.2 Dynamic Light Scattering (Zeta potential malvern)

2.1.1.3 Nanosight ns30

2.1.1.4 Thermo Scientific, iCAP 6500 ICP-OES

2.1.1.5 Elemental Analyzer (Thermo flash 2000)

2.2 สารเคมี

2.2.1 สารเคมีสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของEDTA

2.2.1.1 Na₂-EDTA (Vivantie Inc. USA)

2.2.1.2 CaCl₂·2H₂O (Merck)

2.2.1.3 NaOH (Merck)

2.2.1.4 Tween 80

2.2.1.5 CMC polymer (M.W. 90000)

2.2.1.6 CMC polymer (M.W. 250000)

2.2.1.7 Polyvinyl Alcohol

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของ calcium EDTA

2.3.1.1 การเตรียมสารตั้งต้น

เตรียม NaOH ความเข้มข้น 2.50 M

เตรียม Ca^{2+} ความเข้มข้น 4.42 M

เตรียม Na_2EDTA (ต่อหลอด) ชั่งของแข็ง Na_2EDTA 0.50 g เติมน้ำ 2.00 ml จะได้ของผสม (ตะกอนไม่ละลายน้ำ)

2.3.1.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของ EDTA

นำ Na_2EDTA 0.50g/2ml เติม NaOH 2.50 M 1.00 ml จากนั้น vortex จนละลายเป็นสารละลายใสไม่มีตะกอน จึงนำสารละลายที่ได้ไปเติม Ca^{2+} ความเข้มข้น 4.42 M 2.00 ml (vortex Na_2EDTA ตลอดขณะเติม) จะได้สารละลายใสไม่มีสีไม่มีตะกอน จากนั้น vortex ต่อ 15-20 นาที หลังจาก vortex นำสารละลายที่ได้เขย่าทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 20-48 ชั่วโมง จะได้คอลลอยด์สีขาวขุ่น

2.3.2 ปรับปรุงการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของ EDTA

2.3.2.1 ปรับปรุงการสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca^{2+}

อัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca^{2+} คือ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7 โดยโมล

อัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca^{2+}	mmol EDTA	ปริมาตร NaOH (ml)	mmol Ca^{2+}	ปริมาตรสารละลาย (ml)
1:1	1.34	1.00	1.34	5.00
1:2	1.34	1.00	2.69	5.00
1:3	1.34	1.00	4.03	5.00
1:4	1.34	1.00	5.37	5.00
1:5	1.34	1.00	6.72	5.00
1:6	1.34	1.00	8.06	5.00
1:7	1.34	1.00	9.40	5.00

ตารางที่ 2.1 การปรับเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca^{2+}

2.3.2.2 ปรับปรุงการสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca²⁺ 1:7

อัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca ²⁺	ความเข้มข้น EDTA (g/ml)	ความเข้มข้น Ca ²⁺ (M)
1:7	0.25	4.42
1:7	0.32	5.95
1:7	0.36	6.80
1:7	0.46	8.50

ตารางที่ 2.2 การปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca²⁺ 1:7

2.3.2.3 ปรับปรุงการสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยการปรับเปลี่ยนเวลาในการ เขย่า

อัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca ²⁺	เวลาในการ เขย่า (ชั่วโมง)
1:7	20
1:7	48

ตารางที่ 2.3 ปรับเปลี่ยนเวลาในการ เขย่า

2.3.3 การเคลือบอนุภาคนาโนด้วย polymer support

2.3.3.1 เตรียมสารละลาย polymer support

เตรียมสารละลาย Tween 80 3.00% w/v โดยการชั่ง Tween 80 ของเหลวชนิดสีเหลืองใส 1.20g ละลายในน้ำ 40.00 ml

เตรียมสารละลาย CMC ทั้งตัว 2 ตัวคือมี M.W. เท่ากับ 90,000 และ 250,000 ตามลำดับ 3.00% w/v โดยการชั่ง CMC ของแข็งสีขาวขุ่น 1.20g ละลายในน้ำ 40.00 ml

เตรียมสารละลาย Polyvinyl Alcohol 3.00% w/v โดยการชั่ง Polyvinyl Alcohol ของเหลวชนิดสีเหลืองใส 1.20g ละลายในน้ำ 40.00 ml

จากนั้นนำของผสม polymer ทั้ง 4 อุ่นในเตาอบที่อุณหภูมิประมาณ 60 °C เป็นเวลา 15 นาที จะได้ของผสม polymer จากนั้นนำไป vortex ต่อจนได้สารละลายใสไม่มีตะกอน

2.3.3.2 เคลือบ support polymer บน EDTA Nano particles

นำคอลลอยด์ของ EDTA มา 5.00 ml เติมด้วยสารละลาย polymer ชนิดละ 5.00 ml (ชนิดละหลอด) ความเข้มข้นของ support polymer ดัง**Error! Reference source not found.** จากนั้นนำไป vortex ประมาณ 10 นาที เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

2.3.3.3 การเคลือบ support polymer บน EDTA Nano particles โดยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ support polymer

ความเข้มข้น Polymer ที่ใส่ (% w/v)	Tween 80 (g)	ปริมาตรสารละลาย (ml)
1.00	0.40	40.00
2.00	0.80	40.00
3.00	1.20	40.00

ตารางที่ 2.4 การเตรียม support polymer โดยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ support polymer

ความเข้มข้น Polymer ที่ใส่ (% w/v)	ปริมาตร Polymer (ml)	ปริมาตรคอลลอยด์ ของ EDTA	ความเข้มข้นสุดท้ายของ polymer (% w/v)
1.00	5.00	5.00	0.50
2.00	5.00	5.00	1.00
3.00	5.00	5.00	1.50
4.00	5.00	5.00	2.00

ตารางที่ 2.5 การเคลือบ support polymer โดยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ support polymer

2.3.3.4 การเคลือบ support polymer บน EDTA Nano particles โดยการปรับเปลี่ยนชนิดของ polymer

วิธีการเตรียมและเคลือบ support polymer ทำด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 2.3.3.1 และข้อ 2.3.3.2 โดยจะได้ ความเข้มข้นสุดท้ายของ polymer แต่ละชนิดเป็น 1.50 % (w/v)

ชนิดของ polymer	ความเข้มข้นสุดท้ายของ polymer (% w/v)
Tween 80	1.50
CMC (M.W. 90000)	1.50
CMC (M.W. 250000)	1.50
PVA	1.50

ตารางที่ 2.6 การเตรียม support polymer โดยการปรับเปลี่ยนชนิดของ support polymer

2.3.4 การเตรียมสารเพื่อนำไปพิสูจน์เอกลักษณ์

2.3.4.1 การเตรียมสารเพื่อนำไป freeze dry

นำสารที่ได้จากข้อ 2.3.1 ข้อ 2.3.3 แบ่งเป็น 2 ชุด ชุดแรกนำไป centrifuge แล้วล้างตะกอนก่อน ชุดที่ 2 ไม่ต้องล้างตะกอน จากนั้นนำสารทั้ง 2 ชุดไปแช่ที่ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ $-80.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ จากนั้นจึงนำไป freeze dry เพื่อนำสารไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FT-IR, ICP-OES และ EA. ต่อไป

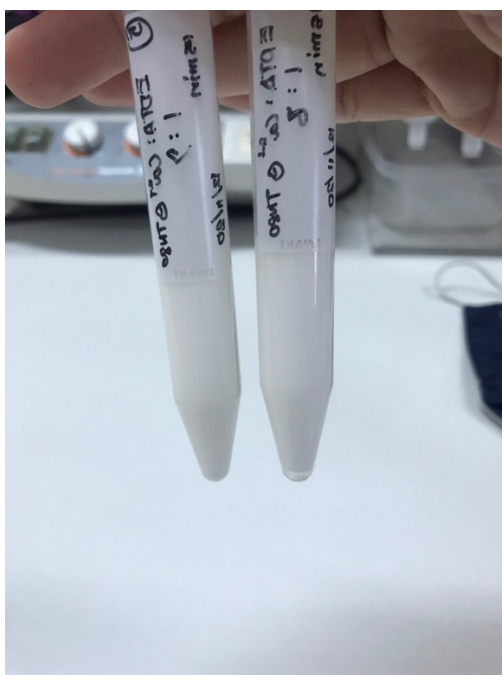
บทที่ 3

ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโน

3.1.1 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca^{2+} ตาม Error! Reference source not found.

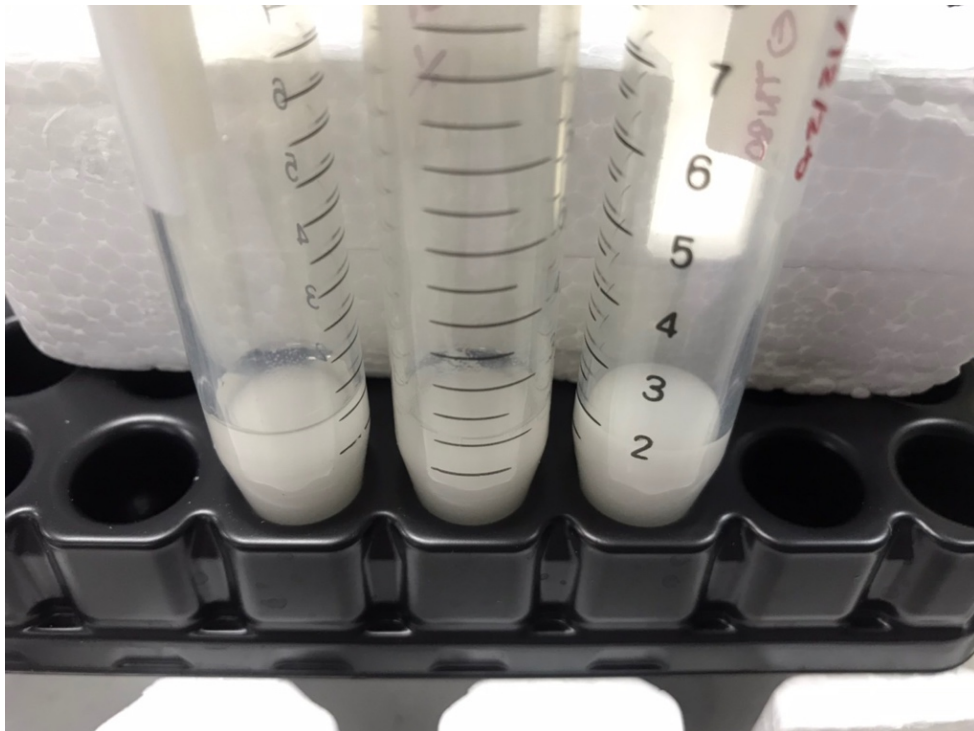
จากการทดลองพบว่าก่อนนำไปเขย่าของผสมทุกหลอดเป็นสารละลายใสเมื่อเขย่าทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าที่อัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca^{2+} ตั้งแต่ 1:1 ถึง 1:6 ยังคงเป็นสารละลายใสไม่มีสี มีเพียงอัตราส่วน 1:7 ที่เปลี่ยนเป็นคอลลอยด์สีขาวขุ่นมัวโดยไม่พบการแยกชั้นหรือตกตะกอนจึงคาดว่าที่อัตราส่วน 1:7 น่าจะเกิดอนุภาคระดับนาโนของ EDTA ขึ้นแล้ว จากนั้นเมื่อเขย่าของผสมต่อไปอีกประมาณ 30 ชั่วโมง พบว่าอัตราส่วน 1:7 ยังคงมีลักษณะเป็นคอลลอยด์สีขาวขุ่นมัวอยู่ และพบว่าที่อัตราส่วน 1:6 เกิดคอลลอยด์สีขาวขุ่นมัวขึ้นเช่นกัน แต่อีก 5 อัตราส่วนที่เหลือยังคงเป็นสารละลายใสไม่มีสีอยู่เช่นเดิม และแม้จะเขย่าทิ้งไว้อีกถึง 24 ชั่วโมง ทั้ง 5 อัตราส่วนก็ยังคงเป็นสารละลายใสไม่มีสีอยู่ จึงสามารถสรุปได้ว่าที่อัตราส่วน EDTA : Ca^{2+} เท่ากับ 1:7 เป็นอัตราส่วนที่ดีที่สุดในการสังเคราะห์อนุภาคนาโน เนื่องจากได้คอลลอยด์ในเวลาที่ดีที่สุดเพียง 20 – 30 ชั่วโมง และมีความเสถียรอยู่ตัวได้นานกว่า 30 ชั่วโมง



รูปที่ 3.1 อัตราส่วนที่ดีที่สุดของ EDTA : Ca^{2+} ที่ทำให้ได้ คอลลอยด์สีขาวขุ่นมัว คืออัตราส่วน 1:6 และ 1:7 ตามลำดับ

3.1.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca²⁺ (1:7)

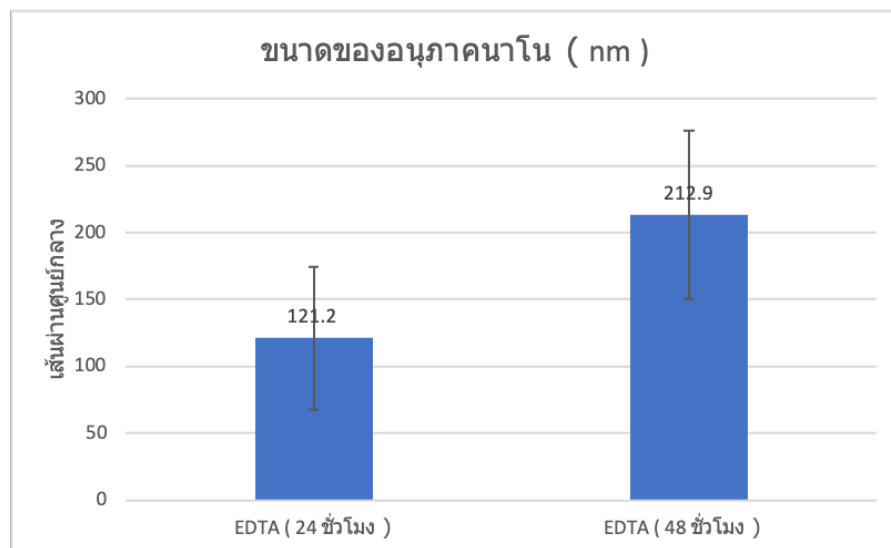
จากการทดลอง 3.1.1 ทำให้เราได้อัตราส่วน EDTA : Ca²⁺ ที่ดีที่สุดเป็น 1:7 แต่ยังใช้เวลาสังเคราะห์นานถึง 20 – 30 ชั่วโมง จึงทดลองเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นเพื่อให้สารสามารถตกตะกอนเร็วขึ้น โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของ EDTA และ Ca²⁺ ตาม ตารางที่ 2.2 และพบว่าที่ความเข้มข้นของ Ca²⁺ เท่ากับ 8.50 M ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ทดลอง เกิดตะกอนทันทีที่นำสารละลาย Ca²⁺ ผสมกับสารละลาย EDTA ส่วนที่ความเข้มข้นต่ำลงเกิดเป็นคอลลอยด์สีขาว คล้ายนมเมื่อเขย่าของผสมทิ้งไว้เป็นระยะเวลาหนึ่ง แต่คอลลอยด์ที่เกิดจาก Ca²⁺ เข้มข้น 5.95 และ 6.80 M พบแยกชั้น และตะกอนขนาดใหญ่จึงไม่เหมาะกับการนำไปใช้ ความเข้มข้นของ Ca²⁺ ที่เหมาะสมจึงเท่ากับ 4.42 M



รูปที่ 3.2 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้น 6.80, 5.95, 4.42 M ตามลำดับ

3.1.3 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนโดยการปรับเปลี่ยนเวลาในการ เช่า

จากการทดลอง 3.1.1 พบว่าอัตราส่วน EDTA : Ca^{2+} ที่ดีที่สุดคือ 1:7 สามารถสร้างคอลลอยด์ได้ในเวลา 24 ชั่วโมงและยังคงรักษาสภาพคอลลอยด์นี้ไว้ได้กว่า 48 ชั่วโมง จึงนำอนุภาคจากการเช่าที่ 24 และ 48 ชั่วโมงมาวัดขนาด เทียบกันเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงขนาดของอนุภาค โดยเมื่อนำคอลลอยด์ไปวิเคราะห์ขนาดด้วยเทคนิค NTA พบว่า อนุภาคที่ได้จากการเช่าที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคนาโนโดยการปรับเปลี่ยนเวลาในการเช่า

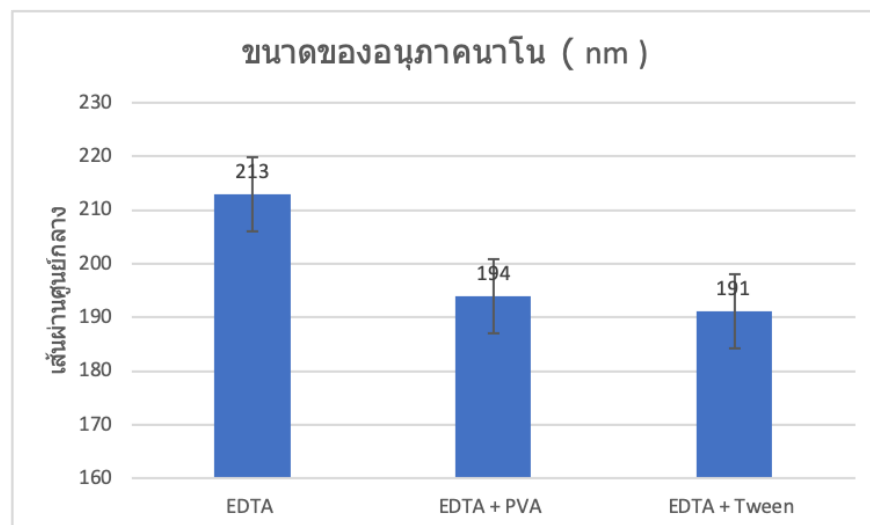
พบว่าทั้ง 2 สภาวะยังคงมีขนาดอยู่ในช่วงนาโนเมตรโดยที่ระยะเวลาสังเคราะห์ 24 ชั่วโมง ได้อนุภาคนาโนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 121.2 ± 53.30 nm และที่ 48 ชั่วโมงมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 212.9 ± 62.90 nm จึงสรุปได้ว่าการตกตะกอนด้วยระยะเวลาที่นานขึ้นทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น

เพื่อแต่ป้องกันไม่ให้อนุภาคเกาะกลุ่มกันจนตกเป็นตะกอน จึงนำอนุภาคนาโนไปเคลือบด้วย polymer ต่อไป เพื่อให้ความเกาะเกาะของสาย polymer ป้องกันไม่ให้อนุภาคเกาะกลุ่มกันจนตกตะกอน [17]

3.2 การเคลือบอนุภาคนาโนด้วย polymer support

3.2.1 เปรียบเทียบขนาดของอนุภาคนาโนแบบที่เคลือบและไม่เคลือบ polymer ด้วยเทคนิค DLS

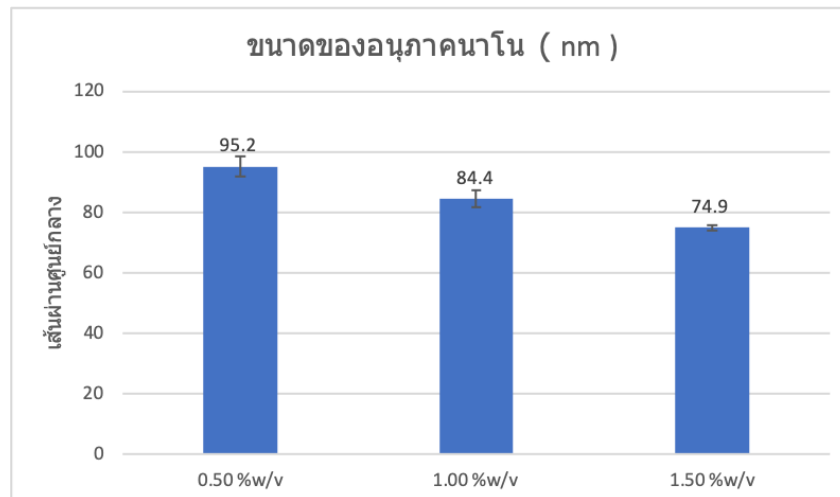
ในการทดลองนี้ polymer ที่ใช้ได้แก่ Tween 80 และ PVA ที่ความเข้มข้น 1.50 %(w/v) จากการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคนาโนได้ผลดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคนาโนแบบที่เคลือบและไม่เคลือบ polymer support

ผลการทดลองพบว่าขนาดของอนุภาคหลังเคลือบด้วย polymer มีขนาดเล็กลง นอกจากนั้นขนาดของอนุภาคนาโนที่เคลือบด้วย Tween 80 มีขนาดเล็กกว่าที่เคลือบด้วย PVA แสดงว่าชนิดของ polymer มีผลต่อขนาดอนุภาค เนื่องจาก polymer เมื่อเข้าไปอยู่ที่พื้นผิวของอนุภาคนาโน polymer จะไปเพิ่มผลของ steric ทำให้อนุภาคนาโนเกิดการรวมตัวกันได้ยากมากขึ้น และ เนื่องจากโครงสร้างของ Tween 80 มีความกะทัดรัดมากกว่าโครงสร้างของ PVA จึงคาดว่าน่าจะทำให้อนุภาคที่เคลือบด้วย Tween 80 มีผลของ steric มากกว่าอนุภาคที่เคลือบด้วย PVA

3.2.2 การเคลือบอนุภาคนาโนด้วย polymer support โดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ polymer support ได้ทดลองเปลี่ยนความเข้มข้นของ polymer ตามตารางที่ 2.4 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ polymer กับขนาดอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค NTA โดยได้ขนาดของอนุภาคดังรูปที่ 3.5

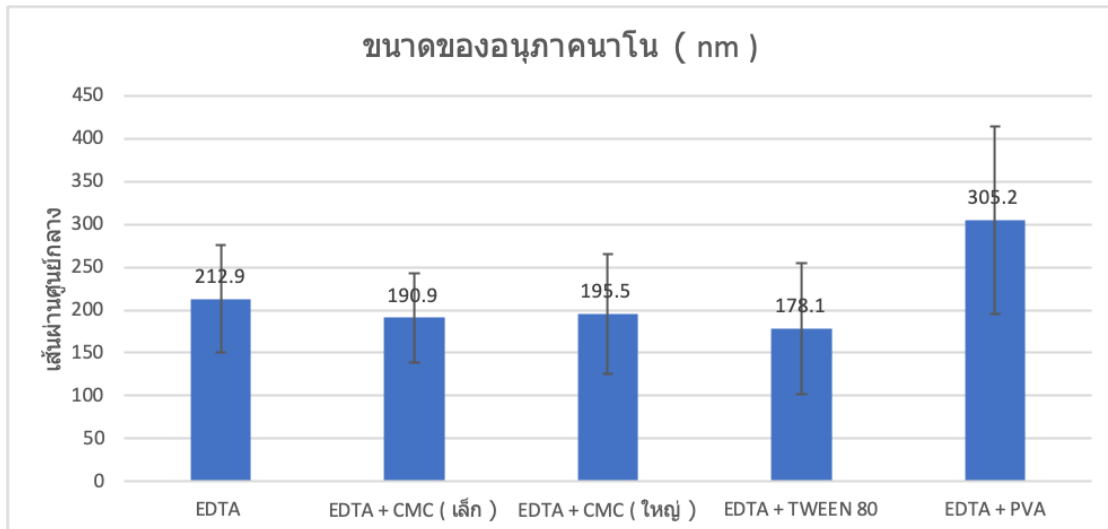


รูปที่ 3.5 เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคนาโนโดยปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ tween 80 polymer support

จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของ polymer เท่ากับ 1.50 %w/v อนุภาคนาโนที่ได้จะมีขนาดเล็กที่สุด จากผลการทดลองพบว่าขนาดของอนุภาคแปรผกผันกับความเข้มข้นของ polymer เนื่องจาก ยิ่งความเข้มข้นของ polymer สูงมากขึ้นยิ่งทำให้สามารถเคลือบ polymer ลงบนผิวของอนุภาคได้มากขึ้น จึงทำให้ผลของ steric สูงขึ้น ซึ่งสามารถขัดขวางการรวมตัวกันของอนุภาคได้มากขึ้น จึงใช้ความเข้มข้นนี้ในการนำไปทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ polymer กับขนาดอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้ ต่อไป

3.2.3 การเคลือบ polymer support โดยการปรับเปลี่ยนชนิด

การทดลองนี้ได้เปลี่ยนชนิด polymer เพื่อหา polymer ที่เหมาะที่สุดในการนำไปใช้ ซึ่งเมื่อวัดขนาดของอนุภาคนาโนด้วยเทคนิค NTA แล้วพบว่า อนุภาคที่เกิดจาก polymer แต่ละชนิดมีเส้นผ่านศูนย์กลางดังรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคนาโนโดยปรับเปลี่ยนชนิดของ polymer support

จากผลการทดลองพบว่า polymer ที่ทำให้ขนาดของอนุภาคนาโนเล็กที่สุดคือ Tween 80 โดยมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 178.0 ± 76.0 nm ส่วนอนุภาคที่เคลือบด้วย CMC (M.W. 90,000) มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 190.0 ± 52.2 nm ซึ่งต่ำกว่าเล็กน้อย เมื่อนำไปเทียบกับอนุภาคที่เคลือบด้วย CMC (M.W. 250,000) และ PVA โดยมีขนาดเฉลี่ยอยู่ที่ 195.5 ± 70.2 nm และ 305.2 ± 109.5 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับอนุภาคนาโนที่เคลือบด้วย Tween 80 และ CMC (M.W. 90,000) พบว่ามีเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคที่ใหญ่กว่าอย่างเห็นได้ชัด จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเคลือบอนุภาคนาโนด้วย Tween80 และ CMC ทำให้อนุภาคนาโนเสถียรและมีขนาดเล็กที่สุด จึงสรุปได้ว่าเราสามารถปรับขนาดของอนุภาคนาโนได้ด้วยการเคลือบ polymer ลงไปบนผิวของอนุภาค โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคจะแปรผกผันกับความเข้มข้นของ polymer ที่ใส่เข้าไป

3.3 การศึกษาหาอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca²⁺ ที่อยู่ในอนุภาคนาโน

3.3.1 การศึกษาหาปริมาณของ Ca²⁺ ภายในอนุภาคด้วยเทคนิค Inductive Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) ผ่าน External calibration method

จากการทดลองพบว่าเมื่อนำสารตัวอย่างไปวัดด้วยเทคนิค ICP และคำนวณจากสมการของ กราฟ calibration ดังตารางที่

4.ก.4.1 พบว่า อนุภาคนาโนแต่ละชนิดที่มีร้อยละของ Ca²⁺ โดยน้ำหนักดังตารางที่ 3.1

อนุภาคนาโน	% Ca ²⁺ (w/w)
No polymer support	20.01
Add Tween 80 polymer support	18.44
Add CMC polymer support	19.03

ตารางที่ 3.1 ร้อยละของ Ca²⁺ ภายในอนุภาคด้วยเทคนิค Inductive Coupled Plasma

3.3.2 การศึกษาหาปริมาณของ N ภายในอนุภาคด้วยเทคนิค Elemental analysis ผ่าน CHNS method

หลังจากการเตรียมสารตัวอย่างอนุภาคนาโนของ EDTA ตามวิธีการทดลองที่ 3.3.2.1 จากนั้นนำไปวัดหาปริมาณ Nitrogen ด้วยเทคนิค Elemental analysis ผ่าน CHNS method ซึ่งจากการทดลองสามารถหาปริมาณของ Nitrogen ภายในอนุภาคนาโนได้ดังตารางที่ 3.2

อนุภาคนาโน	% Nitrogen (w/w)
No polymer support	6.73
Add Tween 80 polymer support	6.38
Add CMC polymer support	6.89

ตารางที่ 3.2 ปริมาณของ Nitrogen ภายในอนุภาคด้วยเทคนิค Elemental analysis ผ่าน CHNS method

3.3.3 การคำนวณเพื่อหาอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca²⁺ ภายในอนุภาคนาโน

จากผลการทดลองทั้ง 2 เทคนิคตามหัวข้อ 3.3.1 และ 3.3.2 สามารถคำนวณหาจำนวน mol ของ Ca²⁺ และ EDTA ในอนุภาคนาโนแต่ละแบบได้ดังตารางที่ 3.3

อนุภาคนาโน	mol Ca ²⁺	mol Nitrogen
No polymer support	0.0050	0.0024
Add Tween 80 polymer support	0.0046	0.0023
Add CMC polymer support	0.0048	0.0025

ตารางที่ 3.3 ปริมาณของ Ca²⁺ และ EDTA ในอนุภาคนาโนแต่ละแบบ

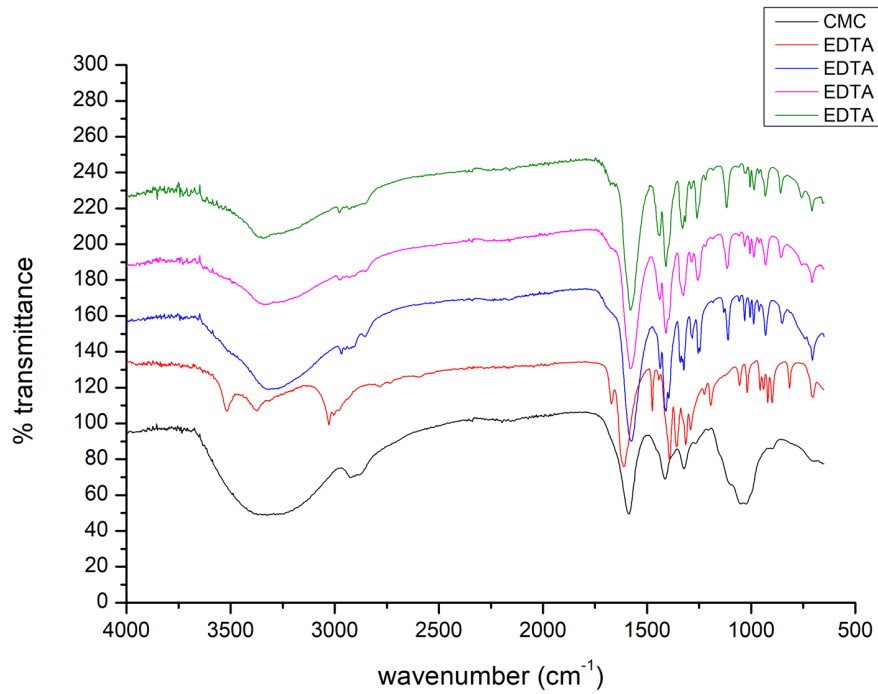
ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณหาอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca^{2+} โดยการนำปริมาณของ EDTA ไปหารด้วยปริมาณของ Ca^{2+} พบว่าแต่ละแบบได้อัตราส่วน EDTA : Ca^{2+} ดังตารางที่ 3.4

ชนิดของอนุภาคนาโน	อัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca^{2+}
No polymer support	1:2.08
Add Tween 80 polymer support	1:2.09
Add CMC polymer support	1:1.84

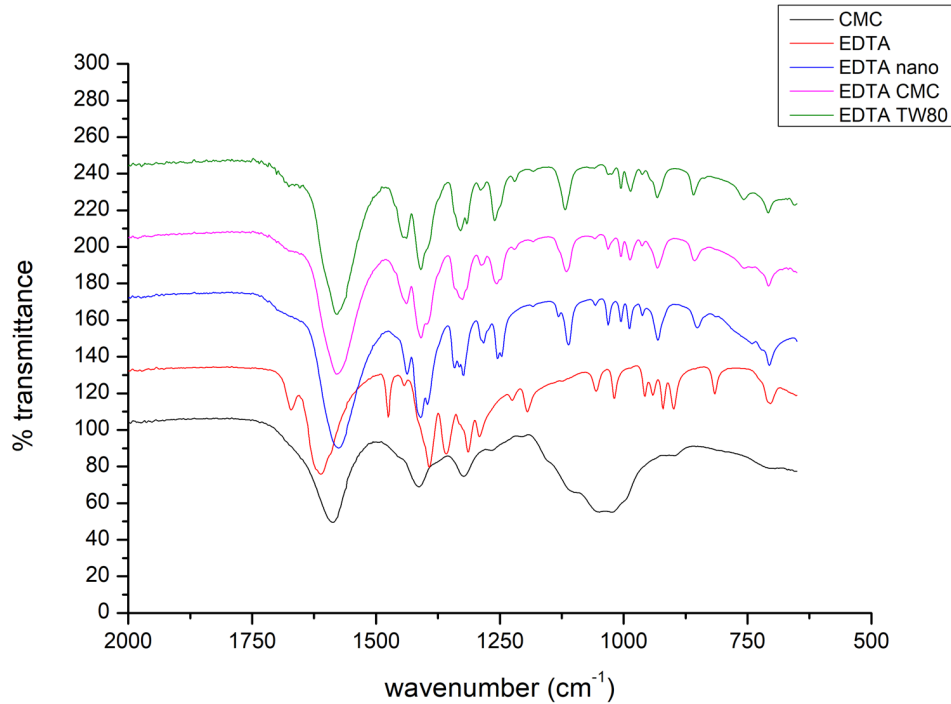
ตารางที่ 3.4 อัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca^{2+} ภายในอนุภาคนาโน

จากผลการคำนวณพบว่าอัตราส่วนของ EDTA : Ca^{2+} เฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 1:2 จึงบอกได้ว่าโครงสร้างของอนุภาคนาโนที่ได้คือ $\text{Ca}_2\text{-EDTA}$

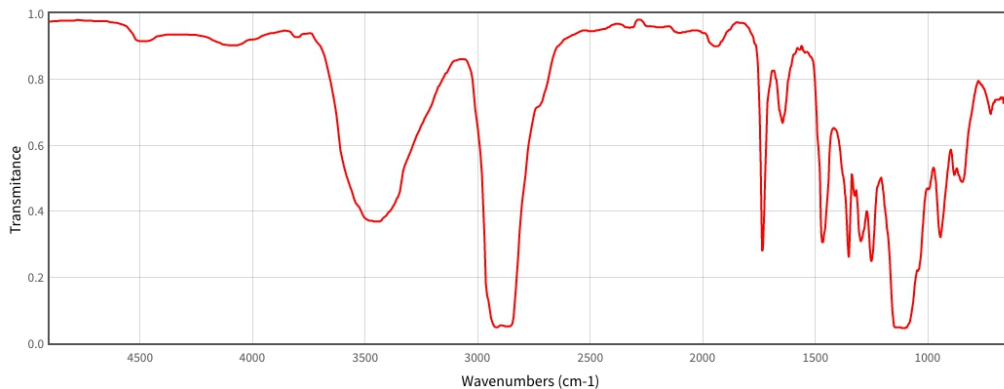
3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อเทียบระหว่างอนุภาคนาโนแบบที่มีและไม่มี polymer support ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectrometer



รูปที่ 3.7 กราฟ FT-IR ของอนุภาคนาโนชนิดต่างๆและ CMC polymer



รูปที่ 3.8 กราฟ FT-IR ขยายพิกัดในช่วง C=O stretching



รูปที่ 3.9 กราฟ FTIR. ของ Tween 80 polymer [30]

จากผลการทดลอง รูปที่ 3.8 กราฟ FT-IR ขยายพิกัดในช่วง C=O stretching รูปที่ 3.7 กราฟ FT-IR ของอนุภาคนาโนชนิดต่างๆและ CMC polymer เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟระหว่าง EDTA ปกติ (เส้นสีแดง) กับ อนุภาคนาโนของ EDTA ทั้ง 3 ตัว (เส้นสี ฟ้า, ชมพู, และ เขียว) พบว่าความถี่ของพีก C=O stretching ช่วง 1600 cm^{-1} ของอนุภาคนาโน Ca_2EDTA ทั้ง 3 ตัวเกิด red shift เมื่อเทียบกับตัว Na_2EDTA เนื่องจากค่าความถี่ของ C=O stretching จะแปรผกผันกับความแข็งแรงของพันธะไอออนิกระหว่าง COO^- และ โลหะ ดังนั้นถ้าโลหะยังมีประจุสูงยิ่งเกิดพันธะไอออนิก ได้ดีค่าความถี่ของ C=O stretching ยิ่งน้อย[31] ซึ่งทำให้ C=O stretching ของอนุภาคนาโน Ca_2EDTA เกิด red shift เมื่อเมื่อเทียบพีกในช่วง

fingerprint ซึ่งมีความเหมือนกันจึงสามารถยืนยันได้ว่า เส้นสีฟ้า, ชมพู, และ เขียว เป็นอนุภาคนาโนของ EDTA จริง เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมระหว่างอนุภาคนาโนที่ไม่เคลือบ polymer เส้นสีฟ้า และอนุภาคนาโนที่เคลือบ CMC และ Tween 80 polymer เส้นสีชมพู และ สีเขียวตามลำดับ พบว่าพิกมีลักษณะเหมือนกันทั้งหมดโดยที่เส้นสี ชมพู และ สีเขียว ซึ่งเป็นของอนุภาคนาโนที่เคลือบด้วย polymer ไม่พบพิกอื่นที่บ่งบอกถึงการเคลือบ polymer ลงบนอนุภาคได้เลย สาเหตุน่าจะมาจากการที่ใส่ปริมาณของ polymer ค่อนข้างน้อยคือเพียง 1.50 % (w/v) และ centrifuge เพื่อล้างตะกอนออกก่อนนำมาศึกษาด้วยเทคนิค FTIR จึงคาดว่าปริมาณของ polymer ที่เหลืออยู่มีน้อยมากจนไม่สามารถสังเกตเห็นพิกได้

สรุปได้ว่าความคลาดเคลื่อนของอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca²⁺ ที่เคลือบด้วย CMC polymer ไม่ได้เกิดจากการเคลือบด้วย polymer คาดว่าจะมาจากการล้างตะกอนก่อนนำไปทำ freeze dry อาจถูกชะ Ca²⁺ บางส่วนหลุดออกไปด้วย

3.5 ศึกษาผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ศึกษาเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียระหว่าง EDTA และ อนุภาคนาโนของ EDTA ที่ทดสอบด้วยเทคนิค fluorometric-based assay microdilution method โดยรายงานผลผ่านค่า MIC ดังตารางที่ 3.5

แบคทีเรีย	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	EDTA	EDTA nanoparticles
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	32	16

ตารางที่ 3.5 การยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียระหว่าง EDTA และ อนุภาคนาโนของ EDTA

จากผลการทดลองพบว่าอนุภาคนาโนของ EDTA เนื่องจากการเคลือบ polymer ความเข้มข้นต่ำเกินไปและถูกชะออกในขั้นตอนการล้างตะกอน และขนาดของอนุภาคนาโนของ Ca_2 -EDTA ทั้งแบบเคลือบและไม่เคลือบ polymer ไม่ได้ต่างกันมาก จึงทำให้ผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเท่ากัน เมื่อนำไปเทียบกับ EDTA ปกติพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ดีกว่า EDTA ปกติ โดยมีค่า MIC น้อยกว่าถึง 2 เท่า

จึงสามารถสรุปได้ว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาค และอนุภาคนาโน EDTA ที่สังเคราะห์ได้มีประสิทธิภาพสูงกว่ายา gentamicin ที่นิยมใช้กันในปัจจุบันซึ่งมีค่า MIC มากกว่า 25 ($\mu\text{g/ml}$)

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของ Ca₂-EDTA พบว่าอัตราส่วนระหว่าง EDTA : Ca²⁺ ที่เหมาะสมที่สุดคือ 1:7 โดยมีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการสังเคราะห์ ของ Ca²⁺ ในรูปสารละลาย และ ของ EDTA ในรูปของผสม เท่ากับ 4.42 M และ 0.25 g/ml ตามลำดับ

การศึกษาเพื่อหาขนาดของอนุภาคพบว่า ขนาดของอนุภาคขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ในการตกตะกอนร่วม โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงได้ขนาดของอนุภาคนาโนเหมาะสมที่สุด และสำหรับการเพิ่มความเสถียรและลดขนาดของอนุภาคโดยการเคลือบด้วย polymer พบว่า Tween 80 และ Carboxymethyl cellulose (M.W. 90,000) ทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้น 1.50 % (w/v) มีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาเคลือบลงบนผิวของอนุภาคนาโนเพื่อให้ได้อนุภาคนาโนที่มีขนาดเล็กที่สุดที่จะนำไปทดสอบในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

การศึกษาเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ สามารถสรุปได้ว่าโครงสร้างของอนุภาคนาโนที่สังเคราะห์ได้คือ Ca₂-EDTA

การศึกษาการการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย พบว่าอนุภาคนาโนของ Ca₂-EDTA มีค่า MIC เท่ากับ 16 (μg/ml)

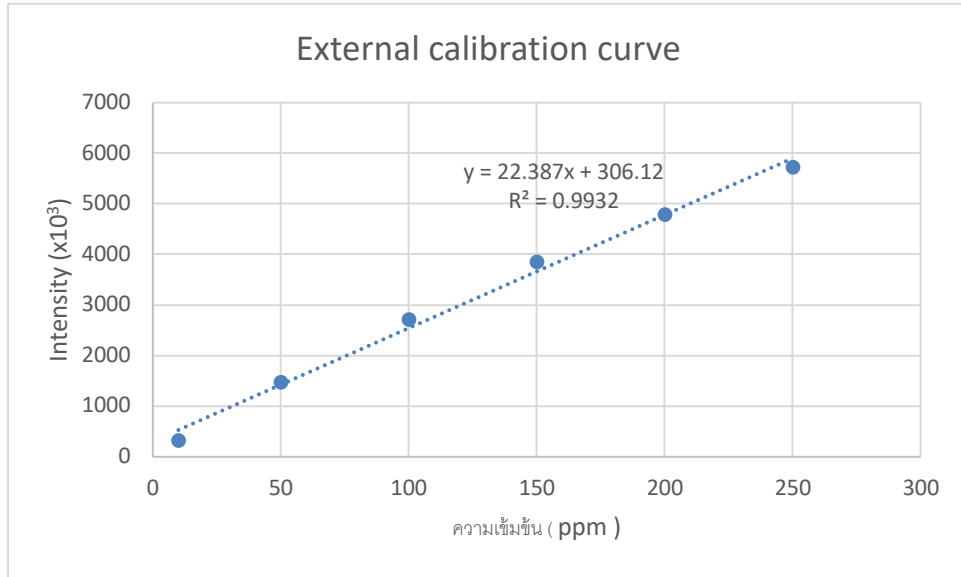
เอกสารอ้างอิง

1. S.L. Gellatly, and R.E.W. Hancock, *Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses*. Pathogens and Disease, 2013. **67**(3): p. 159-173.
2. J.B. Lyczak, C.L. Cannon, and G.B. Pier, *Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist, USA*. Microbes and Infection, 2000. **2**(9): p. 1051-1060.
3. Ciofu, O., et al., *Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2015. **85**: p. 7-23.
4. D. Lebeaux, J.M. Ghigo, and C. Beloin, *Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2014. **78**(3): p. 510-543.
5. A.E. Barsoumian, et al., *Clinical infectious outcomes associated with biofilm-related bacterial infections: a retrospective chart review*. BMC Infectious Diseases, 2015. **15**(1).
6. N. Høiby, et al., *ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014*. Clinical Microbiology and Infection, 2015. **21**: p. S1-S25.
7. ผ.ศ.น.พ.ก.จ. มำล่ำธรรม, หลักการใช้อยาปฏิชีวนะในเวชปฏิบัติทั่วไป. [cited 2021 April 28]; Available from: <https://med.mahidol.ac.th/med/sites/default/files/public/pdf/medicinebook1/Antibiotics%20%20E0%B8%AD%20%E0%B8%81%E0%B8%B3%E0%B8%98%E0%B8%A3.pdf>.
8. D.J. Briedis, and H.G. Robson, *Comparative activity of netilmicin, gentamicin, amikacin, and tobramycin against Pseudomonas aeruginosa and Enterobacteriaceae*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1976. **10**(4): p. 592-597.
9. I. Kubo, S.H. Lee, and T.J. Ha, *Effect of EDTA Alone and in Combination with Polygodial on the Growth of Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(5): p. 1818-1822.
10. S.H. Abdel-Rhman, D.E. Rizk, and E.S. Abdelmegeed, *Effect of Sub-Minimum Inhibitory Concentrations of Tyrosol and EDTA on Quorum Sensing and Virulence of Pseudomonas aeruginosa*. Infection and Drug Resistance, 2020. **13**: p. 3501-3511.
11. E. Banin, K.M. Brady, and E.P. Greenberg, *Chelator-induced dispersal and killing of Pseudomonas aeruginosa cells in a biofilm*. Applied and environmental microbiology, 2006. **72**(3): p. 2064-2069.

12. H.J. Johnston, et al., *A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity*. *Critical Reviews in Toxicology*, 2010. **40**(4): p. 328-346.
13. N. Kumar, et al., *Edetate calcium disodium nanoparticle dry powder inhalation: A novel approach against heavy metal decorporation*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011. **416**(1): p. 376-383.
14. National Center for Biotechnology Information, *Edetate disodium*. 2021; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Edetate-disodium>.
15. P. Khanna, A. Kaur, and D. Goyal, *Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications*. *Journal of Microbiological Methods*, 2019. **163**: p. 105656.
16. T. Satyanarayana, and S. Reddy, *A Review on Chemical and Physical Synthesis Methods of Nanomaterials*. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*, 2018. **6**: p. 2321-9653.
17. N. Visaveliya, and J.M. Köhler, *Control of Shape and Size of Polymer Nanoparticles Aggregates in a Single-Step Microcontinuous Flow Process: A Case of Flower and Spherical Shapes*. *Langmuir*, 2014. **30**(41): p. 12180-12189.
18. C.G. VanGinkel, and S. Gayton, *The biodegradability and nontoxicity of carboxymethyl cellulose (DS 0.7) and intermediates*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1996. **15**(3): p. 270-274.
19. J. Liu, J. Sutton, and C.B. Roberts, *Synthesis and Extraction of Monodisperse Sodium Carboxymethylcellulose-Stabilized Platinum Nanoparticles for the Self-assembly of Ordered Arrays*. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2007. **111**(31): p. 11566-11576.
20. National Center for Biotechnology Information, *Polyoxyethylene sorbitan monooleate*. 2021 [cited 2021 April 14]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Polyoxyethylene-sorbitan-monooleate>.
21. S. Xu, et al., *Rapid Synthesis of Stable and Functional Conjugates of DNA/Gold Nanoparticles Mediated by Tween 80*. *Langmuir*, 2011. **27**(22): p. 13629-13634.
22. P. Sagitha, K. Sarada, and K. Muraleedharan, *One-pot synthesis of poly vinyl alcohol (PVA) supported silver nanoparticles and its efficiency in catalytic reduction of methylene blue*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 2016. **26**(10): p. 2693-2700.
23. National Center for Biotechnology Information, *Polyvinyl alcohol*. 2021 [cited 2021 April 22]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Polyvinyl-alcohol>.

24. Malvern Panalytical Ltd, *Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)*. 2021 [cited 2021 April 23]; Available from: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/nanoparticle-tracking-analysis>.
25. D.R. Shaw, *Dynamic Light Scattering Training*. [cited 2021 April 28]; Available from: <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/DLS%20concept.pdf>.
26. น. เลาจรียกุล, *Dynamic light scattering*. 2557 [cited 2021 April 28]; Available from: https://www.nanotec.or.th/th/wp-content/uploads/2013/12/4_3.pdf.
27. J.T. Edward, *Molecular volumes and the Stokes-Einstein equation*. *Journal of Chemical Education*, 1970. **47**(4): p. 261.
28. ม.น. ลีมีโกคา, การใช้อยาต้านจุลชีพในสัตว์. 2541 [cited 2021 April 28]; Available from: <https://www.pharmatech.co.th/index.php?r=site/article25>.
29. M.D. Rakhmawatie, et al., *Evaluation of crystal violet decolorization assay and resazurin microplate assay for antimycobacterial screening*. *Heliyon*, 2019. **5**(8): p. e02263.
30. National Institute of Standards and Technology, *SORBITAN MONO-OLEATE*. [cited 2021 April 23]; Available from: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=Tween+80&Units=SI&clR=on>.
31. A. Fitch, and S. Dragan, *Infrared Spectroscopy Determination of Lead Binding to Ethylenediaminetetraacetic Acid*. *Journal of Chemical Education*, 1998. **75**(8): p. 1018.

ภาคผนวก ก



ตารางที่ ก.4.1 External calibration curve ของ Ca²⁺

สร้างกราฟ calibration ได้สมการเส้นตรงของกราฟ calibration คือ $y = 22.387x + 306.12$ โดยมีค่า $R^2 = 0.9932$

การคำนวณ ตัวอย่างที่เป็นอนุภาคนาโนของ EDTA แบบไมใส่ polymer support

$$\frac{1 \text{ mol Ca}^{2+}}{40 \text{ g Ca}^{2+}} \times \frac{172.7 \text{ g Ca}^{2+}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{30 \text{ ml}}{0.0258 \text{ g sample}} = \frac{0.0050 \text{ mol Ca}^{2+}}{\text{g sample}}$$

การคำนวณ ตัวอย่างที่เป็นอนุภาคนาโนของ EDTA แบบใส่ Tween 80 polymer support

$$\frac{1 \text{ mol Ca}^{2+}}{40 \text{ g Ca}^{2+}} \times \frac{163.5 \text{ g Ca}^{2+}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{30 \text{ ml}}{0.0266 \text{ g sample}} = \frac{0.0046 \text{ mol Ca}^{2+}}{\text{g sample}}$$

การคำนวณ ตัวอย่างที่เป็นอนุภาคนาโนของ EDTA แบบใส่ CMC polymer support

$$\frac{1 \text{ mol Ca}^{2+}}{40 \text{ g Ca}^{2+}} \times \frac{162.4 \text{ g Ca}^{2+}}{1000 \text{ ml}} \times \frac{30 \text{ ml}}{0.0256 \text{ g sample}} = \frac{0.0048 \text{ mol Ca}^{2+}}{\text{g sample}}$$

การคำนวณจากสารตัวอย่างที่เป็นอนุภาคนาโนของ EDTA แบบไมใส่ polymer support

$$\frac{6.73 \text{ g N}}{100 \text{ g sample}} \times \frac{1 \text{ mol N}}{14 \text{ g N}} \times \frac{1 \text{ mol EDTA}}{2 \text{ mol N}} = \frac{0.0024 \text{ mol EDTA}}{\text{g sample}}$$

การคำนวณจากสารตัวอย่างที่เป็นอนุภาคนาโนของ EDTA แบบใส่ Tween 80 polymer support

$$\frac{6.38 \text{ g N}}{100 \text{ g sample}} \times \frac{1 \text{ mol N}}{14 \text{ g N}} \times \frac{1 \text{ mol EDTA}}{2 \text{ mol N}} = \frac{0.0023 \text{ mol EDTA}}{\text{g sample}}$$

การคำนวณจากสารตัวอย่างที่เป็นอนุภาคนาโนของ EDTA แบบใส่ CMC polymer support

$$\frac{6.89 \text{ g N}}{100 \text{ g sample}} \times \frac{1 \text{ mol N}}{14 \text{ g N}} \times \frac{1 \text{ mol EDTA}}{2 \text{ mol N}} = \frac{0.0025 \text{ mol EDTA}}{\text{g sample}}$$

ประวัติผู้วิจัย

ข้าพเจ้านายเพชร สายเชื้อ เกิดเมื่อวันที่ 5 เดือนเมษายน พ.ศ.2542 ที่จังหวัดร้อยเอ็ด สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัย มุกดาหาร จังหวัดมุกดาหาร เมื่อปีการศึกษา 2559 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2560 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 562 หมู่ 5 ต.สระคู อ.สุวรรณภูมิ จังหวัด ร้อยเอ็ด รหัสไปรษณีย์ 45130 อีเมล Phachara_555@hotmail.com