

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลส จากสาหร่าย Cladophora glomerata The study of properties of nanocellulose from Cladophora glomerata

โดย

นสภ. ภากร	นาคทอง	60210162
นสภ. SAN	BOLAKEO	60210169
นสภ. ธันย์	ประเสริฐไทยเจริญ	60210171

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลส จากสาหร่าย *Cladophora glomerata* The study of properties of nanocellulose from *Cladophora glomerata*

โดย

นสภ. ภากร	นาคทอง	60210162
นสภ. SAN	BOLAKEO	60210169
นสภ. ธันย์	ประเสริฐไทยเจริญ	60210171

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2564 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

รายงานวิจัยเรื่อง การศึกษาคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลส จากสาหร่ายตระกูลคลาโดฟลอรา (The study of properties of nanocellulose form *Cladophora glomerata*) ซึ่งสามารถพบได้มากในช่วงการเกิด ปรากฏการณ์สาหร่ายสะพรั่งที่ทะเลแถบบางแสน จังหวัดชลบุรี และพบว่าในสาหร่าย *Cladophora glomerata* มีโครงสร้างของเซลลูโลสอยู่ ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นสารเพิ่มความหนืดและความคงตัวให้แก่ยา ใช้ในการผลิต อวัยวะเทียมต่าง ๆ อาทิ หลอดเลือดเทียม จึงทำให้ผู้วิจัยเกิดความสนใจในการที่จะนำสาหร่ายชนิดนี้มาสกัดเพื่อนำ นาโนเซลลูโลสออกมาเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

คณะผู้วิจัย

นสภ.ภากร นาคทอง	60210162
นสภ.SAN BOLAKEO	60210169
นสภ.ธันย์ ประเสริฐไทยเจริญ	60210171

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2564

เรื่อง การศึกษาคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลส จากสาหร่าย Cladophora glomerata

ผู้จัดทำโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- 1. นสภ. ภากร นาคทอง รหัส 60210162
- 2. นสภ. SAN BOLAKEO รหัส 60210169
- 3. นสภ. ธันย์ ประเสริฐไทยเจริญ รหัส 60210171

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ภญ.อ.ดร.ธันย์ชนก ศิริรักษ์

บทคัดย่อ

การศึกษาคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลส จากสาหร่าย Cladophora glomerata โดยการนำสาหร่าย Cladophora glomerata มาทำการสกัดเพื่อนำเซลลูโลสออกมา หลังจากที่ได้เซลลูโลสออกมาแล้วจะนำ เซลลูโลสที่ได้ไปทำ acid treatment ด้วย hydrochloric acid เพื่อให้ได้เป็นนาโนเซลลูโลสออกมา และนำนาโน เซลลูโลสที่ได้ไปทดสอบคุณสมบัติ โดยดูลักษณะทั่วไปและรูปร่างของนาโนเซลลูโลส ดูความเป็นผลึกของนาโน เซลลูโลส จำแนกสารอินทรีย์, สารอนินทรีย์และหมู่ฟังก์ชั่นของนาโนเซลลูโลส วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนัก ของสารโดยอาศัยคุณสมบัติทางความร้อนของนาโนเซลลูโลส และการวัดค่าความต่างศักย์บนผิวอนุภาคของนาโน เซลลูโลส

จากการศึกษาพบว่าคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลส จากสาหร่าย *Cladophora glomerata* โดยการวัด ความเป็นผลึก ด้วยเครื่อง X-ray diffraction (XRD) ศึกษาความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์ ด้วยวิธี Thermogravimetric analysis (TGA) และวัดค่า zetapotential ด้วยเครื่อง Zetasizer โดยนาโนเซลลูโลสที่ได้มี ลักษณะเป็นเส้นยาว สานเป็นร่างแห มีความเป็นผลึกที่ดี เป็น cellulose type I_α มีค่า CI มากกว่า 84.5% มี ความสามารถในการทนความร้อนได้สูง ซึ่งจะสลายตัวที่อุณหภูมิ 368.30 และ 372.49 °C มีค่า Zeta potential เฉลี่ยโดยวิธีการ soxhlet extraction อยู่ที่ -50.1 mV และ reflux extraction อยู่ที่ -39.3 mV

อาจารย์ที่ปรึกษา ภญ.อ.ดร.ธันย์ชนก ศิริรักษ์

Senior Project Academic Year 2021

: The study of properties of nanocellulose from Cladophora glomerata

By

1. Mr. Phakorn Nakthong ID 60210162

2. MISS SAN BOLAKEO ID 60210169

3. Mr. Thun Prasertthaicharoen ID 60210171

Advisor:

1. Dr. Thanchanok Sirirak Ph.D

ABSTRACT

The study of properties of nanocellulose from *Cladophora glomerata* which will be extracted as cellulose with soxhlet and reflux extraction, independently then nanocellulose in the last process with acid treatment using 3M hydrochloric acid. Nanocellulose obtains from the following extract and treatment will be tested base on the characteristic properties. The properties include length, width, diameter by scanning electron microscopic (SEM) and transmission electron microscopy (TEM), crystallinity using X-ray diffraction (XRD), organic and inorganic compound differentiate using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, weight changes with heat analysis using thermogravimetric analysis (TGA) and zeta potential using Zetasizer.

Properties by various tests demonstrated that nanocellulose of *Cladophora gomerata* from both methods have the characteristic properties as stated in the review for nanocellulose. Extracted nanocellulose was described as fibril bundle. Nanocellulose exhibited good crystallinity property as cellulose type I_{α} with crystallinity index more than 84.5%. Moreover, nanocellulose appeared to have good thermal stability which had final decomposition at temperature of 368.30 °C and 372.49 °C. Mean zeta potential of nanocellulose from soxhlet extraction was -50.1 mV and -39.3 mV for reflux extraction.

Major advisor: Dr. Thanchanok Sirirak Ph.D

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจาก ภญ.อ.ดร.ธันย์ชนก ศิริรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้คำปรึกษา ช่วยแนะแนวทางในการค้นคว้า คอยแนะนำ ให้ความรู้ ให้ความช่วยเหลือ ให้ กำลังใจและคอยดูแลในการทำโครงงานวิจัย ตรวจสอบแก้ไข ข้อบกพร้องในการเขียนโครงงานวิจัยนี้ให้สำเร็จตาม ความคาดหมาย

ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้เชี่ยวชาญที่ให้คำแนะนำ กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบโครงงานวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ผู้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย ขอขอบพระคุณ ภญ.ผศ.ดร.อาภา เพชรสัมฤทธิ์ และนักวิทยาศาสตร์ที่อนุเคราะห์และช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่คอยให้กำลังใจ ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ คณะเภสัชศาสตร์ และ เพื่อน ๆ รวมถึงผู้ที่เกี่ยวข้องทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจในการทำโครงงานวิจัยนี้ตลอดมา จน ทำให้โครงงานวิจัยนี้สำเร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผูวจย	
นสภ.ภากร นาคทอง	60210162
นสภ.SAN BOLAKEO	60210169
นสภ.ธันย์ ประเสริฐไทยเจริญ	60210171

<u>ນ</u>ລູ ມ

จ

สารบัญ	
0,10,0,0	

เรื่อง	หน้า
คำนำ	ก
บทคัดย่อ	ข
ABSTRACT	ค
กิตติกรรมประกาศ	٩
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	જ
สารบัญภาพ	ଖ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
 ข้อมูลทั่วไปของสาหร่ายตระกูลคลาโดฟลอรา 	4
2. ข้อมูลทั่วไปของเซลลูโลส	6
 การสกัดนาโนเซลลูโลสจากแหล่งธรรมชาติ 	10
 การทดสอบลักษณะของนาโนเซลลูโลส 	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	
1. พืชที่ใช้ในการศึกษา	18
2. เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี	18
3. วิธีวิจัย	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย	23
 การศึกษาลักษณะทั่วไป และรูปร่างของนาโนเซลลูโลส 	23
 การศึกษาคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลส 	27
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	32

เรื่อง	หน้า
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	37
ภาคผนวก (1) การเตรียมสาร	38
ภาคผนวก (2) ผลการทดสอบคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลส	39
ภาคผนวก (3) อักขราวิสุทธิ์	60
ภาคผนวก (4) แบบฟอร์มรายงานการเงิน	62

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1 ความยาว ความกว้าง และ aspect ratio ของนาโนเซลลูโลส	47
ที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction	
ตารางที่ 2 ความยาว ความกว้าง และ aspect ratio ของนาโนเซลลูโลส	48
ที่สกัดโดยวิธี reflux extraction	
ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยความยาว ความกว้าง และ SD ของนาโนเซลลูโลส	49
ที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction	
ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยความยาว ความกว้าง และ SD ของนาโนเซลลูโลส	49
ที่สกัดโดยวิธี reflux extraction	
ตารางที่ 5 ค่า peak ของนาโนเซลลูโลส โดยเครื่อง XRD	54
ตารางที่ 6 ค่าความเปลี่ยนแปลงของน้ำหนัก โดยวิธี TGA	59
ตารางที่ 7 ค่าความต่างศักย์บนผิวอนุภาค	59

เรื่อง	หน้า
รูปที่ 1 แสดงถึงโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส	1
รูปที่ 2 แสดงถึงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสาหร่ายคลาโดฟลอรา	5
รูปที่ 3 แสดงถึงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสาหร่ายคลาโดฟลอรา	5
รูปที่ 4 แสดงถึงลักษณะของสาหร่ายคลาโดฟลอรา	6
รูปที่ 5 แสดงถึงวิธีการสกัดนาโนเซลลูโลส	11
รูปที่ 6 แสดงถึง cellulose nanofibrils ที่ได้จากสาหร่าย Cladophora glomerata จากกล้อง SEM	12
รูปที่ 7 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ของ nanocrystalline cellulose จากสาหร่าย <i>Cladophora</i> sp.	13
รูปที่ 8 แสดงถึงผลการวิเคราะห์ XRD ของ nanocrystalline cellulose จากสาหร่าย <i>Cladophora</i> sp. ที่ความเข้มข้น 2M 3M 5M sulfuric acid	14
รูปที่ 9 แสดงถึง FTIR spectrum ของ cellulose nanofibril จากสาหร่าย <i>Cladophora glomerata</i>	15
รูปที่ 10 แสดงถึง TGA curves ของ cellulose nanofibrils จากสาหร่าย <i>Cladophora glomerata</i>	16
รูปที่ 11 แสดงถึงการศึกษาการวัดค่าความต่างศักย์บนผิวอนุภาค	17
รูปที่ 12 แผนผังขั้นตอนงานวิจัย	19
รูปที่ 13 แสดงถึงลักษณะของตัวอย่างผ่านการสกัดด้วยวิธี soxhlet extraction	23
รูปที่ 14 แสดงถึงลักษณะของตัวอย่างผ่านการสกัดด้วยวิธี reflux extraction	24

เรื่อง	หน้า
รูปที่ 15 ภาพจากกล้อง SEM ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดด้วยวิธี soxhlet extraction	25
รูปที่ 16 ภาพจากกล้อง SEM ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดด้วยวิธี reflux extraction	25
รูปที่ 17 แสดงถึง length-width aspect ratio distribution ของนาโนเซลลูโลส ที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction	26
รูปที่ 18 แสดงถึง length-width aspect ratio distribution ของนาโนเซลลูโลส ที่สกัดโดยวิธี reflux extraction	27
รูปที่ 19 FTIR spectrum ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดด้วยวิธี soxhlet extraction	28
รูปที่ 20 FTIR spectrum ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดด้วยวิธี reflux extraction	28
รูปที่ 21 XRD spectrum ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดด้วยวิธี soxhlet extraction	29
รูปที่ 22 XRD spectrum ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดด้วยวิธี reflux extraction	29
รูปที่ 23 TGA thermogram ของนาโนเซลลูโลส	30
รูปที่ 24 zeta potential spectra ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดด้วยวิธี soxhlet extraction	31
รูปที่ 25 zeta potential spectra ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดด้วยวิธี reflux extraction	31
รูปที่ 26 แสดงถึงภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 100 เท่า ของนาโนเซลลูโลส ที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction	39
รูปที่ 27 แสดงถึงภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 200 เท่าของนาโนเซลลูโลส ที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction	40
รูปที่ 28 แสดงถึงภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 1000 เท่าของนาโนเซลลูโลส ที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction	40
รูปที่ 29 แสดงถึงภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 200 เท่าของนาโนเซลลูโลส ที่สกัดโดยวิธี reflux extraction	41

เรื่อง	หน้า
รูปที่ 30 แสดงถึงภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่าของนาโนเซลลูโลส ที่สกัดโดยวิชี reflux extraction	41
รูปที่ 31 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 8500 เท่าของนาโนเซลลูโลส ที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction	42
รูปที่ 32 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 13000 เท่าของนาโนเซลลูโลส ที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction	42
รูปที่ 33 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 17000 เท่าของนาโนเซลลูโลส ที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction	43
รูปที่ 34 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 25500 เท่าของนาโนเซลลูโลส ที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction	43
รูปที่ 35 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 44000 เท่าของนาโนเซลลูโลส ที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction	44
รูปที่ 36 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 8500 เท่าของนาโนเซลลูโลส ที่สกัดโดยวิชี reflux extraction	44
รูปที่ 37 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 13000 เท่าของนาโนเซลลูโลส ที่สกัดโดยวิชี reflux extraction	45
รูปที่ 38 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 25500 เท่าของนาโนเซลลูโลส ที่สกัดโดยวิธี reflux extraction	45
รูปที่ 39 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 44000 เท่าของนาโนเซลลูโลส ที่สกัดโดยวิธี reflux extraction	46
รูปที่ 40 XRD spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophora glomerata</i>	49

เรื่อง		หน้า
รูปที่ 41 XRD spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophora</i> ด้วยวิธี soxhlet extraction โดยใช้สารละลายเป็น 8!	<i>gomerata</i> หลังการสกัด 5% Ethanol	50
รูปที่ 42 XRD spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophora</i> ด้วยวิธี soxhlet extraction หลังจากการต้มโดย 4%	gomerata หลังการสกัด H ₂ O ₂	50
รูปที่ 43 XRD spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophora</i> ด้วยวิธี soxhlet extraction หลังจากการต้มโดย 5M	<i>gomerata</i> หลังการสกัด NaOH	51
รูปที่ 44 XRD spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophora</i> ด้วยวิธี soxhlet extraction หลังจากการต้มโดย 5%	gomerata หลังการสกัด v/v HCl	51
รูปที่ 45 XRD spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophora</i> ด้วยวิธี reflux extraction โดยใช้สารละลายเป็น 859	<i>gomerata</i> หลังการสกัด 6 Ethanol	52
รูปที่ 46 XRD spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophora</i> ด้วยวิธี reflux extraction หลังจากการต้มโดย 4% H	gomerata หลังการสกัด 1202	52
รูปที่ 47 XRD spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophora</i> ด้วยวิธี reflux extraction หลังจากการต้มโดย 5M N	gomerata หลังการสกัด aOH	53
รูปที่ 48 XRD spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophora</i> ด้วยวิธี reflux extraction หลังจากการต้มโดย 5%v/	<i>gomerata</i> หลังการสกัด v HCl	53
รูปที่ 49 FTIR spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophorc</i>	glomerata	54
รูปที่ 50 FTIR spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophord</i> ด้วยวิธี soxhlet extraction โดยใชสารละลายเป็น 8!	<i>glomerata</i> หลังจากการสกัด 5% Ethanol	55
รูปที่ 51 FTIR spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophorc</i> ด้วยวิธี soxhlet extraction หลังจากการต้มด้วย 4%	glomerata ที่สกัด H ₂ O ₂	55

เรื่อง	หน้า
รูปที่ 52 FTIR spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophora glomerata</i> ที่สกัด ด้วยวิธี soxhlet extraction หลังจากการต้มด้วย 5M NaOH	56
รูปที่ 53 FTIR spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophora glomerata</i> ที่สกัด ด้วยวิธี soxhlet extraction หลังจากการต้มด้วย 5%v/v HCl	56
รูปที่ 54 FTIR spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophora glomerata</i> หลังจากการสกัด ด้วยวิธี reflux extraction โดยใช้สารละลายเป็น 85% ethanol	57
รูปที่ 55 FTIR spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophora glomerata</i> ที่สกัด ด้วยวิธี reflux extraction หลังจากการต้มด้วย 4% H ₂ O ₂	57
รูปที่ 56 FTIR spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophora glomerata</i> ที่สกัด ด้วยวิธี reflux extraction หลังจากการต้มด้วย 5M NaOH	58
รูปที่ 57 FTIR spectrum ของสาหร่าย <i>Cladophora glomerata</i> ที่สกัด ด้วยวิธี reflux extraction หลังจากการต้มด้วย 5%v/v HCl	58

บทที่ 1 บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เซลลูโลส (Cellulose) เป็นสารที่ได้มาจากธรรมชาติและเป็นองค์ประกอบที่มีความสำคัญในการ ทำให้ผนังเซลล์ของพืชชั้นสูง สาหร่ายสีเขียว รา และแบคทีเรียบางชนิดมีความแข็งแรงมากขึ้น นอกจากนี้ ยังสามารถพบเซลลูโลสได้ในสัตว์ทะเลกลุ่ม Urochorata เช่น เพรียงลอย เพรียงสาย เซลลูโลสเป็นสาร ประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของ β-D-glucose ที่เชื่อมกันเป็น สายตรงโดยการเชื่อมกันระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของโมเลกุล เซลลูโลส เป็นพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) โดยเซลลูโลสจะประกอบกันเป็น fibrils อยู่รวมกันเป็นมัด เรียกว่า fibrous bundle ซึ่งจะแบ่งได้เป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่เป็นผลึก (crystalline form) และ ส่วนที่ เป็นอสันฐาน (amorphous form) โดยที่หมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ในส่วนที่เป็นอสันฐานจะมีความไม่เป็น ระเบียบมากกว่าหมู่ไฮดรอกซิลของส่วนที่เป็นผลึก จึงทำให้หมู่ไฮดรอกซิลในบริเวณของส่วนที่เป็น อสันฐานสามารถเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้ดีกว่าหมู่ไฮดรอกซิลของส่วนที่เป็นผลึก ⁽¹⁾



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส

(อ้างอิงภาพ https://www.shutterstock.com/th/image-vector/structuralchemical-formula-cellulose-polymer-2d-187119629)

1

นาโนเซลลูโลส (Nanocellulose) เป็นสารที่ได้จากการสกัดเซลลูโลสออกมาด้วยกระบวนการ ต่าง ๆ ได้ออกมาเป็นเซลลูโลสที่มีขนาดโมเลกุลเล็กระดับนาโน โดยนาโนเซลลูโลสจะสามารถแบ่งออกได้ เป็น 2 ประเภท ได้แก่ เซลลูโลสนาโนคริสตัล (cellulose nanocrystals) และ เซลลูโลสนาโนไฟบริล (cellulose nanofibril) ซึ่งทั้ง 2 ประเภทนี้ จะมีความแตกต่างกันทั้งในเรื่องของ ความเป็นผลึก (crystallinity) เคมีพื้นผิว (surface chemistry) และคุณสมบัติเชิงกล (mechanical property)⁽¹⁾

ปัจจุบันมีการนำผลผลิตที่ได้จากเซลลูโลสมาใช้เพิ่มมากขึ้น เนื่องจาก ไม่มีความเป็นพิษ มีความ แข็งแรงสูง และราคาถูก เมื่อเปรียบเทียบกับ polymer material อื่น ๆ ที่มีอยู่ในท้องตลาด ก่อนหน้านี้ ในอุตสาหกรรมเซลลูโลส ต้องอาศัยแหล่งของเซลลูโลสจากพืชบนบก เช่น ไม้และฝ้าย ซึ่งจะเป็น lignocellulose การนำ lignocellulose ใช้ต้องผ่านกระบวณการกำจัด lignin ออกเพื่อให้ได้เซลลูโลสที่ บริสุทธิ์มากขึ้น โดยกระบวณการกำจัดลิกนินออกนั้นจะต้องอาศัยสารเคมีที่มีความรุนแรง ทำให้เซลลูโลส ที่ได้มาอาจมีการตกค้างของสารเคมีต่าง ๆ ได้ แต่ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับเซลลูโลสจากผนังเซลล์ ของสิ่งมีชีวิตจากทะเล โดยเฉพาะเซลลูโลสจากสาหร่ายที่ได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากการไม่มี ส่วนประกอบของ lignin ในสาหร่าย ทำให้เซลลูโลสที่ได้นั้น มีความบริสุทธิ์มากกว่า เหมาะสมต่อการ นำมาใช้ในทางชีวการแพทย์มากกว่า lignocellulose⁽²⁾

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดเซลลูโลส กระบวนการการทำให้เห็นถึงลักษณะของ เซลลูโลส และการสกัดนาโนเซลลูโลสจากสาหร่ายสีเขียว Ulva lactula ⁽²⁾ นอกจากนี้ยังมีการศึกษา เปรียบเทียบคุณสมบัติของเซลลูโลสที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ เช่น พืช แบคที่เรีย และสาหร่ายทะเลที่เป็น สาหร่ายตระกูลคลาโดฟอร่า และได้นำไปศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมี และ โครงสร้าง ผ่านการทดสอบต่างๆ โดยมีการนำนาโนเซลลูโลสไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น การนำไปใช้ในด้าน ระบบกักเก็บพลังงาน เช่นการทำเป็น แบตเตอรี่ รวมถึงการนำไปใช้ในด้านของสิ่งแวดล้อม และวัสดุ ชีวภาพ ⁽³⁾

จากการเกิดปรากฏการณ์ยูโทรฟิเคชั่น หรือ ปรากฏการณ์สาหร่ายสะพรั่ง บริเวณชายหาดบาง แสน เมื่อเดือนมีนาคม พ.ศ. 2564 ⁽⁴⁾ ซึ่งเกิดจากมลภาวะจากธาตุอาหารพืช โดยมีสาเหตุมาจากการที่ แหล่งน้ำมีปริมาณของธาตุอาหารหลักของสิ่งมีชีวิตกลุ่มออโตโทรป (autotrophs) หรือกลุ่มแพลงก์ตอน พืชและสาหร่ายต่าง ๆ โดยเฉพาะ ไนโตรเจน และ ฟอสฟอรัส ที่มากเกินปริมาณจำเป็น ดังนั้นจึงเป็น ปัจจัยให้ เกิดการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ ⁽⁵⁾ ทำให้พบสาหร่ายคลาโดฟลอราบริเวณ

2

หาดบางแสนเป็นจำนวนมาก จึงได้สนใจนำสาหร่ายดังกล่าวมาศึกษาวิธีการสกัด และศึกษาคุณสมบัติของ นาโนเซลลูโลสต่อไป

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาคุณสมบัตินาโนเซลลูโลสจากสาหร่าย Cladophora glomerata

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงคุณสมบัตินาโนเซลลูโลสออกมาจากสาหร่าย Cladophora glomerata

4. กรอบแนวคิด



5. ขอบเขตงานวิจัย

5.1 สาหร่ายคลาโดฟลอรา (Cladophora glomerata) ที่เก็บได้จากบริเวณชายหาดบางแสน จังหวัด ชลบุรี

5.2 การศึกษามุ่งเน้นการการศึกษาคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลส จากสาหร่ายตระกูลคลาโดฟลอรา

บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1 ข้อมูลทั่วไปของสาหร่ายตระกูลคลาโดฟลอรา

1.1. ข้อมูลพฤกษศาสตร์ (6)

- 1.1.1. ชื่อทางวิทยาศาสตร์ : Cladophora glomerata
- **1.1.2. ตระกูล :** Cladophora
- 1.1.3. ชื่อสามัญ : ไก หรือ สาหร่ายไก, Cladophora algae
- **1.1.4. ชื่อทั่วไป :** ไกเหนียวหรือไกค้าง, ไกเปื้อยหรือไกไหม, ไกต๊ะ, สาหร่ายไก, สาหร่ายไคร,ไกค่าว เตา (ภาคเหนือ)

1.2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ส่วนประกอบ

สาหร่ายตระกูลคลาโดฟลอราประกอบด้วยเส้นใยสีเขียวอ่อน ในตัวของเซลล์ก็จะมี เซลล์พิเศษที่ จำเป็นในการผลิตเม็ดสี (Chromatophore) ที่สามารถพบเจอได้ในเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวทั่วไปเช่น คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี แคโรทีน แซนโทฟิล ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์แสงและเป็นตัวที่ทำให้ สาหร่ายเป็นสีเหลืองอ่อน-เขียวเข้ม ⁽⁷⁾ สาหร่ายตระกูลคลาโดฟลอราจะอยู่แบบพันกันเป็นก้อน (รูปที่ 2) มีการแตกแขนงแบบคู่ หรืออาจแตกออกไปหลายทิศทาง (รูปที่ 3) มีแทลลัส (Thallus) เป็นรูป ทรงกระบอก เรียงตัวเป็นผนังแนวขวาง และเป็นเซลล์แบบหลายนิวเคลียส ⁽⁸⁾ (รูปที่ 4) ในส่วนของผนัง ภายนอกจะมีหน้าที่ช่วยให้สาหร่ายมีความแข็งแรงและทนต่อแรงต้านทานต่าง ๆ ผนังเซลล์ด้านในมี ส่วนประกอบเป็นเซลลูโลสที่จะเชื่อมต่อกับโปรโตพลาสซึม (Protoplasm) ของเซลล์ และข้อสังเกตของ สาหร่ายตระกูลคลาโดฟลอราดเพิ่มเติมคือ ตรงพื้นที่ผิวของตัวสาหร่ายจะมีพื้นสัมผัสแบบเรียบลื่น ไม่ได้มี เมือกปกคลุม จึงจะใช้ในการจำแนกหรือแยกตระกูลคลาโดฟลอราจากสาหร่ายตระกูลอื่นได้ ⁽⁹⁾

1.3. แหล่งที่พบ และประโยชน์ของสาหร่ายตระกูลคลาโดฟลอรา

พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำทะเล ทั้งในสภาพที่เป็นน้ำ ไหลและน้ำนิ่ง มีแสงแดดส่องถึง โดยจะยึดเกาะกับหินหรือสิ่งยึดเกาะอื่น ๆ พบมากในลำน้ำน่านและลำ น้ำโขง มีการนำสาหร่ายไกมาใช้ประโยชน์ในด้านของการประกอบอาหาร ซึ่งพบมากตามภาคเหนือของ ประเทศไทย และยังสามารถนำไปทำเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงปลาบึกในลำน้ำโขง ⁽⁶⁾



รูปที่ 2 แสดงถึงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสาหร่ายคลาโดฟลอรา





รูปที่ 3 แสดงถึงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสาหร่ายคลาโดฟลอรา



รูปที่ 4 แสดงถึงลักษณะของสาหร่ายคลาโดฟลอรา จะเป็นรูปทรงกระบอก เรียงตัวเป็นแนวขวาง และเป็นเซลล์แบบหลายนิวเคลียส

(อ้างอิงภาพที่ 3 และ 4 Coneva V, Chitwood DH. Plant architecture without multicellularity: quandaries over patterning and the soma-germline divide in siphonous algae. Front Plant Sci. 2015;6:287.)

2. ข้อมูลทั่วไปของเซลลูโลส

2.1. แหล่งที่มา

ถึงแม้ว่าแหล่งที่พบมากของเซลลูโลสคือ พืช แต่ในส่วนของแหล่งอื่น ๆ ก็สามารถเจอได้ใน ธรรมชาติจากหลายแหล่งเช่น จากแบคทีเรีย เพรียงลอย เพรียงสาย และสาหร่าย โดยจะมีกระบวนการ ในการสกัดออกมาที่เหมือนหรือแตกต่างกันไปตามลักษณะของแหล่งตัวอย่าง

เซลลูโลสเป็นไบโอโพลีเมอร์ ชนิดหนึ่งที่มีพันธะไฮโดรเจนแบบ cross-link รวมกับออกซิเจน จึง ทำให้โมเลกุลของเซลลูโลสมีความเสถียร และเป็นปัจจัยที่ทำให้เซลลูโลสไม่ละลายในตัวทำละลาย ธรรมชาติ และน้ำ

6

นอกจากนี้พันธะไฮโดรเจนทั้งระหว่างและภายในโมเลกุล ส่งผลทำให้โครงสร้างของเซลลูโลสเป็น ตัวเสริมความแข็งแรงในพืช โดยลักษณะของเส้นใยในพืช หรือโครงสร้างของผนังเซลล์พืช ประกอบด้วย microfibrils ที่มีทั้งส่วนที่เรียกว่า lignin, hemicellulose และเซลลูโลส โดยทั่วไปจะมีความกว้างอยู่ที่ 3 nm และส่วนที่มีปริมาณมากที่สุดประมาณ 35-50% ⁽¹⁰⁾ ของผนังเซลล์พืชก็คือ เซลลูโลส ที่มีโครงสร้าง เป็นพอลิแซ็กคาไรด์เส้นตรง แบบ β-1,4- เชื่อมกับ anhydro-D-glucose unit มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่มีหน้าทีสร้างพันธะไฮโดรเจน และในส่วนของ กลูโคสโมเลคุล ก็จะส่งผลรูปแบบของเซลลูโลสเช่นกัน ⁽¹¹⁾

เมื่อพิจารณาถึงลักษณะของเซลลูโลส เราจะคำนึงถึงโครงสร้างภายใน หรือลักษณะการเรียงตัว ภายใน โดยสามารถแบ่งได้เป็นส่วนที่เรียงตัวเป็นระเบียบ หรือเรียกว่า เรียงตัวในรูปแบบผลึก (crystallinity form) ที่จะเกี่ยวข้องกับความแข็งของเซลลูโลสและส่วนที่ไม่ได้เรียงตัวเป็นระเบียบหรือ เรียงตัวเป็นอสันฐาน (amorphous form) ที่จะมีส่วนช่วยเกี่ยวกับความยืดหยุ่นของเซลลูโลส

โดยทั่วไป นาโนเซลลูโลส (nanocellulose) จะเป็นเซลลูโลสที่มีมิติใดมิติหนึ่งอยู่ในขนาดนาโน ไม่ว่าจะเป็น ความยาว ความกว้าง หรือเส้นผ่านศูนย์กลาง และยังสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด เช่น bacterial nanocellulose (BNC), nanocrystalline cellulose (NCC) แ ล ะ nanofibrillated cellulose (NFC) โดยทั้ง 3 ชนิดจะมีความแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มา เงื่อนไขของกรรมวิธีในการสกัด ^(11, 12) โดยเฉพาะปัจจัยของแหล่งที่มา ที่จะส่งผลต่อลักษณะจำเพาะต่าง ๆ ของเซลลูโลสเช่น ความเป็น ผลึก การทนต่อความร้อน และสัณฐานวิทยาเป็นต้น แต่ก็ยังคงมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) อยู่ในโครงสร้าง ที่ มีความจำเป็นในการปรับเปลี่ยนพื้นผิว เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคต

2.2. ชนิดของเซลลูโลส

ถึงแม้ว่าแหล่งที่พบมากของเซลลูโลสคือ พืช แต่ในส่วนของแหล่งอื่น ๆ เราสามารถแบ่งชนิดของ เซลลูโลสได้ตาม แหล่งที่มา และโครงสร้าง แต่อย่างไรก็ตาม แหล่งที่มาของเซลลูโลสก็ยังเป็นปัจจัยสำคัญ ในการกำหนดลักษณะต่าง ๆ ของเซลลูโลสที่ได้ เช่น ความยาว ความแข็ง ความทนต่อแรงต้านทาน พื้นผิว และการเรียงตัวเป็นต้น

2.2.1. ชนิดของเซลลูโลส ตามแหล่งที่มา

ส่วนของเซลลูโลสที่ได้จากพืชลำต้นขนาดใหญ่ และสัตว์น้ำ เช่น เพรียงทะเล (Tunicate) จะได้ผลิตภัณฑ์เซลลูโลสอยู่ในรูปแบบผลึก I(**β**) ต่างจากเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรีย และ สาหร่าย ที่จะเป็นเซลลูโลสในรูปแบบผลึก I(**α**) มากว่า ⁽¹³⁾

2.2.2. ชนิดของเซลลูโลส ตามโครงสร้าง

- Type I เป็นโครงสร้างสามัญทั่วไปของเซลลูโลส ที่ได้จากธรรมชาติ และมีการเรียงตัวของพันธะ
 ไฮโดรเจนแบบขนาน และจะมี 2 รูปแบบของผลึกคือ เซลลูโลส I(α) และ I(β) โดยรูปแบบ
 ผลึก I(β) จะทนต่อ การเปลี่ยนแปลงแบบอุณหพลศาสตร์มากกว่ารูปแบบผลึกแบบ I(α)
- Type II ได้จากการนำเซลลูโลส type I ไปสกัด โดยนำไปละลายในตัวทำละลาย หรือทำให้พอง ตัวในสารละลายกรดหรือด่าง จึงทำให้การเรียงตัวของพันธะไฮโดรเจนเปลี่ยนแปลงไปจาก type I
- Type III เกิดจากการนำเซลลูโลส type I หรือ type II ไปผ่านการสกัดด้วย ammonia
- Type IV เป็นการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเซลลูโลส type IV โดยผ่านความร้อน 260 ℃ ใน สารละลาย glycerol ^(12, 14)

2.2.3. ชนิดของเซลลูโลส ตามกรรมวิธีในการสกัด

ตามที่กล่าวมาข้างต้น นอกเหนือจากนี้ หลังจากกระบวนการสกัดเพื่อให้ได้เซลลูโลสใน ระดับนาโนเมตร ⁽¹⁰⁾ เรายังสามารทำการจำแนกชนิดของมันด้วยอาศัยแหล่งที่มาอีกแบบคือ อิง จากวิธีการสกัดเพื่อให้ได้โครงสร้างที่ต้องการเช่น bacterial nanocellulose (BNC), nanocrystalline cellulose (NCC) และ nanofibrillated cellulose (NFC) ได้มาจากการทำ defibrillation โดยอาศัยการใช้กระบวนการเชิงกล เช่น การทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน หรือ homogenizing เป็นต้น

2.3. การนำไปใช้

เซลลูโลสสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้อย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะเป็นทั้ง ทาง อุตสาหกรรมพลังงาน อุตสาหกรรมวัสดุก่อสร้าง อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น (15)

2.3.1. การนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมยาและทางการแพทย์

ชีววัสดุ เช่น เซลลูโลสที่ได้จากกระบวนการหมักด้วย Acetobacter xylinum เข้ามามี บทบาททางการแพทย์เป็นอย่างมาก เนื่องด้วยวัสดุชนิดนี้มีความเป็นมิตรต่อร่างกาย และยัง สามารถกระตุ้นการซ่อมแซมเนื้อเยื่อได้ดีกว่าวัสดุที่สังเคราะห์ขึ้นมา จึงมีการนำมาใช้ทางกการ แพทย์และทางเภสัชกรรม เช่น การนำมาใช้เป็นสารเพิ่มความหนืดและความคงตัวให้แก่ยา, การ นำเซลลูโลสมาพัฒนาต่อเพื่อใช้ในการผลิตอวัยวะเทียมต่าง ๆ อาทิ หลอดเลือดเทียม, การนำ เซลลูโลสมาทำวัสดุปิดแผลเพื่อช่วยในการลดความถี่ในการทำแผลและยังช่วยในการรักษาความ ชุ่มชื้นโดยที่ไม่ต้องทายาบ่อยครั้ง ⁽¹⁵⁾

2.3.2. การนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหาร

มีการทดสอบว่าเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรียนั้นมีความบริสุทธิ์สูง จึงได้มีการนำเซลลูโลส ชนิดนี้มาประยุกต์ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร ทั้งที่เป็นวัตถุเจือปนเพื่อช่วยเพิ่มเนื้อสัมผัส และสารช่วยเพิ่มความคงตัว นอกจากนี้เซลลูโลสที่ผลิตมาจากแบคทีเรียยังนิยมนำมาบริโภค เช่นเดียวกันกับการบริโภควุ้น เนื่องจากมีเนื้อสัมผัสที่นิ่ม ผิวหน้าเรียบ มีความฉ่ำน้ำ และไม่มีคลอ เรสเตอรอล ทั้งยังมีปริมาณไขมันที่ต่ำและให้พลังงานต่ำด้วย⁽¹⁵⁾

2.3.3. การนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรม

เซลลูโลสสามารถนำมาดัดแปลงเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของเยื่อเมมเบรนต่าง ๆ อาทิ การนำเซลลูโลสมาทำเป็นส่วนลำโพงและกระดาษที่ต้องการความเหนียวสูง ⁽¹⁵⁾

3. การสกัดนาโนเซลลูโลสจากแหล่งธรรมชาติ

ในส่วนของการสกัดเซลลูโลสจะประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก แบ่งออกเป็น การนำส่วนที่ไม่ใช่ เซลลูโลสออก เช่น ลิกนิน และ เฮมิเซลลูโลส รวมทั้งสารประกอบอื่น ๆ ซึ่งจะเรียกว่า pretreatment โดยใช้สารเคมีเช่น กรดคลอไรท์ หรือ สารละลายด่าง ยกตัวอย่างเช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เพื่อให้ได้เซลลูโลสไฟบริล ⁽¹⁰⁾ ขั้นตอนต่อมาเป็นการสกัดนาโนเซลลูโลสจากเซลลูโลสไฟบริล โดยวิธีการ สกัดอื่น ๆ เช่น acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis และ mechanical process (รูปที่ 5)

3.1. Acid hydrolysis

เป็นหนึ่งในกระบวนการสำคัญในการสกัดนาโนเซลลูโลสจากเซลลูโลสไฟบริล การใช้สารละลาย กรด เพื่อนำส่วนที่เรียกว่า amorphous หรือส่วนที่ไม่ได้เรียงตัวเป็นระเบียบออกจากโครงสร้าง ทำให้ เหลือแค่ส่วนที่เป็นรูปแบบผลึกอย่างเดียว ตัวอย่างของสารละลายกรดที่ใช้ได้เช่น กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid) แต่ก็ต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่น ๆ ที่สามารถส่งผลต่อการสกัดได้เช่น ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด อุณหภูมิ และความเข้มข้นของสารละลายกรด นอกเหนือจากนั้น จะต้องให้ความสำคัญกับการจัดการเกี่ยวกับ acid waste water จากการชะล้างสารละลายกรดออกด้วย เช่น การใช้น้ำตามด้วยการนำเข้าเครื่องหมุน เหวี่ยง การใช้สารละลายด่าง หรือการใช้ TEMPO-mediated oxidation ⁽¹⁰⁾

3.2. Enzymatic hydrolysis

เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่ต้องการใช้เวลามากกว่าเมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ จึงสามารถ แก้ปัญหานี้โดยการใช้รวมกับวิธีอื่น หนึ่งในตัวอย่างของการใช้เอนไซม์ เช่น การสกัดเซลลูโลสจาก wood chip จากการนำไปเพิ่มพื้นที่ผิวโดยใช้ ionic liquid ตามด้วย enzymatic hydrolysis กับ laccase ⁽¹⁶⁾

3.3. Mechanical process

เป็นการสกัดโดยใช้แรงเฉือนเพื่อตัดแยกเอาเซลลูโลสไฟบริลจากเซลลูโลส โดยกระบวนการที่ สามารถเจอได้เช่น การใช้ความดันสูงเพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน (high pressure homogenization) การ ใช้คลื่นเสียงที่มีความถี่สูง (ultrasonication) และ การใช้เครื่องมือลดขนาดแบบลูกบอล (ball mill method) ⁽¹⁰⁾



รูปที่ 5 แสดงถึงวิธีการสกัดนาโนเซลลูโลส

(อ้างอิงภาพ Phanthong P, Reubroycharoen P, Hao X, Xu G, Abudula A, Guan G. Nanocellulose: Extraction and application. Carbon Resources Conversion. 2018;1(1):32-43.)

4. การทดสอบลักษณะของนาโนเซลลูโลส

4.1. การศึกษาลักษณะทั่วไป และรูปร่างของนาโนเซลลูโลส (Length, width, diameter)

4.1.1. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) ใช้ศึกษารายละเอียดของโครงสร้างภายนอกหรือผิวของตัวอย่าง โดยภาพที่ได้จากกล้องจะเป็น ภาพเสมือน 3 มิติที่มีระยะชัดลึกสูง การสร้างภาพทำได้โดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่สะท้อนจาก ผิวหน้าของตัวอย่างที่ทำการส่งตรวจ ทำให้สามารถระบุลักษณะของพื้นผิวตัวอย่างได้อย่าง ชัดเจนกับกำลังขยายสูงสุดประมาณ 10 นาโนเมตร ⁽¹⁷⁾

ในปี 2015 Zhouyang Xiang และคณะ ได้ทำการศึกษา cellulose nanofibrils ที่ได้ จากสาหร่าย *Cladophora glomerata* โดยจากการศึกษาการดูลักษณะทั่วไปและรูปร่างของ นาโนเซลลูโลสด้วยกล้อง scanning electron microscope (SEM) (รูปที่ 6) เป็นภาพที่ได้จาก กล้อง SEM แสดงให้เห็นถึงรายละเอียดของโครงสร้างภายนอกของ cellulose nanofibrils ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 10-40 นาโนเมตร ⁽¹⁸⁾



รูปที่ 6 แสดงถึง cellulose nanofibrils ที่ได้จากสาหร่าย *Cladophora glomerata* จากกล้อง SEM (อ้างอิงภาพ Xiang Z, Gao W, Chen L, Lan W, Zhu JY, Runge T. A comparison of cellulose nanofibrils produced from Cladophora glomerata algae and bleached eucalyptus pulp. Cellulose. 2015;23(1):493-503.)

4.1.2. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopic, TEM) เป็นกล้องที่ใช้ในการศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบภายในของตัวอย่างเช่น ผนังเซลล์ ลักษณะเยื่อหุ้มเซลล์ องค์ประกอบภานในเซลล์เป็นต้น โดยอาศัยการยิงลำอิเล็กตรอนทะลุผ่าน ตัวอย่าง ซึ่งลำอิเล็กตรอนที่ทะลุและเลี้ยวเบนผ่านตัวอย่างจะถูกนำมาสร้างเป็นภาพด้วยการ โฟกัสและขยายด้วยเลนส์แม่เหล็กและฉายลงบนฉากรับภาพกับกำลังขยายสูงสุดประมาณ 0.1 นาโนเมตร⁽¹⁹⁾

ในปี 2021 S. Steven และคณะ ได้ทำการศึกษาลักษณะของ nanocrystalline cellulose จากสาหร่าย *Cladophora* sp. ด้วยกล้อง TEM แสดงให้เห็นถึง นาโนเซลลูโลสมี ลักษณะเป็น rod-like หรือ whisker-like morphology (รูปที่ 7) ซึ่งเกิดจากการนำส่วนที่เป็น amorphous ของเซลลูโลสออกไปในขั้นตอน acid hydrolysis โดยในการศึกษาของ S. Steven ใช้ 5M sulfuric acid (20)



รูปที่ 7 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ของ nanocrystalline cellulose จากสาหร่าย *Cladophora* sp. (อ้างอิงภาพ S. Steven YM et al., Preparation and Characterization of Nanocrystalline Cellulose from Cladophora sp. Algae. Advanced Science Engineering Information Technology. 2021)

4.2.1. เครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์

เครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ X-Ray Diffractometer (XRD) โดยการนำ รังสีเอ็กซ์ (X-ray) มาใช้วิเคราะห์และระบุชนิดสารประกอบ โครงสร้างผลึกของสารประกอบที่มี อยู่ในสารตัวอย่าง ทั้งในเชิงคุณภาพ (Qualitative) และเชิงปริมาณ (Quantitative) การ วิเคราะห์จะอาศัยหลักการของการยิงรังสีเอ็กซ์ไปกระทบที่ตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ ทำให้เกิดการ เลี้ยวเบน และสะท้อนออกมาที่มุมต่าง ๆ กันโดยมีตัววัดสัญญาณ (Detector) เป็นตัวรับข้อมูล องค์ประกอบและโครงสร้างของสารจะมีองศาในการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ ในมุมที่แตกต่างกัน ออกไปขึ้นกับองค์ประกอบ รูปร่าง และลักษณะผลึก ซึ่งผลที่ได้จึงสามารถบ่งชี้ชนิดของ สารประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่างและสามารถนำมาใช้ใช้ศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับโครงสร้าง ของผลึกของสารตัวอย่างนั้น ๆ ได้นอกจากนั้นแล้วยังสามารถศึกษาและวิเคราะห์ ปริมาณความ เป็นผลึก ขนาดของผลึก ความสมบูรณ์ของผลึก และความเค้นของสารประกอบในสารตัวอย่าง⁽²¹⁾

ในปี 2021 S. Steven และคณะ ได้ทำการศึกษาความเป็นผลึกของ nanocrystalline cellulose จากสาหร่าย Cladophora sp. ด้วยเครื่อง XRD ค่าความเป็นผลึกของตัวอย่างจะ คำนวณเป็น ค่า Crystallinity Index (CI) (รูปที่ 8) จากสมการ Segal's method

$$CI = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}}$$

 I_{002} คือ intensity ของ crystalline portion ที่ 2 θ = 22° และ I_{am} คือ intensity ใน ส่วนของ amorphous โดยในการศึกษาของ S. Steven ใช้ sulfuric acid ที่ความเข้มข้น แตกต่างกัน ที่ 2M 3M และ 5M ในขั้นตอน acid hydrolysis เพื่อเตรียมเป็น nanocellulose⁽²⁰⁾



รูปที่ 8 แสดงถึงผลการวิเคราะห์ XRD ของ nanocrystalline cellulose จากสาหร่าย *Cladophora* sp. ที่ความเข้มข้น 2M 3M 5M sulfuric acid (อ้างอิงภาพ S. Steven YM et al., Preparation and Characterization of Nanocrystalline Cellulose from Cladophora sp. Algae. Advanced Science Engineering Information Technology. 2021)

4.3. การศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของนาโนเซลลูโลส

4.3.1. เครื่องฟลูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปคโทรไมโครสโคป

เครื่องฟลูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปคโทรไมโครสโคป Fourier transform Infrared (FTIR Spectroscopy) เป็นเป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ จำแนกประเภทของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์และพันธะเคมีหรือหมู่ฟังก์ชั่นในโมเลกุล ซึ่งสามารถ วิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ทำให้เกิดช่วงกลาง (Middle infrared region) ช่วง ความยาวคลื่น 2.5 - 50 mm, ช่วงเลขคลื่น 4000 – 400 cm ⁻¹ เป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายตัวอย่าง (nondestructive) คือไม่มีการเปลี่ยนแปลง คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของตัวอย่างหลังการ วัด นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่สะดวก ไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาในการวัดสั้น และมีความปลอดภัยสูงสามารถ วัดตัวอย่างได้ทั้งในรูปของแข็งและของเหลว ⁽²²⁾

ในปี 2015 Zhouyang Xiang และคณะ ได้ทำการศึกษา cellulose nanofibrils ที่ได้ จากสาหร่าย *Cladophora glomerata* ได้ทำการวิเคราะห์ด้วย FTIR จากผลการวิเคราะห์ FTIR spectrum (รูปที่ 9) พบ broad peak ที่ 3340cm⁻¹ แสดงถึงการพบ O-H stretching ของ CH₂-OH พบ peak ที่ 2900 cm⁻¹ และ 1372cm⁻¹ แสดงถึงการพบ C-H vibration และ C-H bending ตามลำดับ พบ peak ที่1170 cm⁻¹ และ 1108cm⁻¹ แสดงถึงการพบ glycosidic bonds (C-O-C) และ C-OH ตามลำดับ อีกทั้งยังพบ peak ที่ 1060 cm⁻¹ แสดงถึงการพบ C-C stretching ⁽¹⁸⁾



รูปที่ 9 แสดงถึง FTIR spectrum ของ cellulose nanofibril จากสาหร่าย *Cladophora glomerata* (อ้างอิงภาพ Xiang Z et al., A comparison of cellulose nanofibrils produced from Cladophora glomerata algae and bleached eucalyptus pulp. Cellulose. 2015;23(1):493-503.)

15

4.3.2. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสารโดยอาศัยคุณสมบัติทางความร้อน

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสารโดยอาศัยคุณสมบัติทางความร้อน (Thermogravimetric analysis, TGA) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ความเสถียรของวัสดุโดยเฉพาะ พอลิเมอร์เมื่อได้รับความร้อน โดยการวัดน้ำหนักของวัสดุที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงอุณหภูมิด้วย เครื่องชั่งที่มีความไวสูง ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง ตัวอย่างจะถูกวางอยู่บนจานซึ่งเชื่อมต่อกับ เครื่องชั่งละเอียดที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสูง โดยทั้งหมดจะอยู่ในเตาที่สามารถควบคุม อุณหภูมิและบรรยากาศได้ โดยบรรยากาศภายในสามารถเป็นได้ทั้ง แก๊สเฉื่อย เช่น ไนโตรเจน หรือ แก๊สที่มีความว่องไว เช่น ออกซิเจน โดยน้ำหนักของตัวอย่างที่เปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้นที่ อุณหภูมิเฉพาะของสารแต่ละชนิด โดยน้ำหนักที่หายไปนั้นเกิดจาก การระเหย การย่อยสลาย หรือการเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ⁽²³⁾

ในปี 2015 Zhouyang Xiang และคณะ ได้ทำการศึกษา cellulose nanofibrils ที่ได้ จากสาหร่าย *Cladophora glomerata* ได้ทำการวิเคราะห์ด้วย TGA พบว่า cellulose nanofibrils ที่ได้จากสาหร่าย *Cladophora glomerata* ใน TGA curve (รูปที่ 10) พบการเกิด weight-loss peaks ที่ 390°C เพียงที่เดียว ⁽¹⁸⁾





(อ้างอิงภาพ Xiang Z et al., A comparison of cellulose nanofibrils produced from Cladophora glomerata algae and bleached eucalyptus pulp. Cellulose. 2015;23(1):493-503.)

4.3.3. การวัดค่าความต่างศักย์บนผิวอนุภาค

Zeta potential หมายถึง ศักย์ไฟฟ้าที่อยู่ใน อิเล็กทริคอล ดับเบิ้ล เลเยอร์ (Electrical double layer) ที่ระนาบเฉือน โดยที่ปรากฏการณ์ทางจลนศาสตร์ไฟฟ้าที่ใช้ในการศึกษาระบบ ของสารแขวนลอยด์ คือ อิเล็กโตรโฟริซิส (Electrophoresis) ซึ่งเกิดจากการที่ป้อนศักย์ไฟฟ้า ให้กับอนุภาคที่ลอยอยู่ในน้ำ ถ้าอนุภาคที่กระจายตัวอยู่ในน้ำมีประจุที่ผิวเป็นประจุลบ เมื่อป้อน ศักย์ไฟฟ้าเข้าไปแล้วจะทำให้อิเล็กทริคอล ดับเบิ้ล เลเยอร์เคลื่อนที่เข้าหาขั้วแคโทด (Cathode) ที่มีประจุเป็นบวก ในส่วนของเคาน์เตอร์ไอออน (Counter ion) เคลื่อนที่เข้าหาขั้วแอโนด (Anode) ที่มีประจุเป็นลบ โดยการวัดจลนศาสตร์ไฟฟ้าจะวัดที่ตำแหน่งระหว่างพื้นที่ผิวอนุภาค กับอิเล็กทริคอล ดับเบิ้ล เลเยอร์ชั้นนอก เรียกว่า ระนาบเฉือน ดังนั้นค่า Zeta potential คือ ค่าที่วัดศักย์ไฟฟ้าที่ระนาบเฉือนโดยจะวัดจากความเร็วของอนุภาคที่อยู่ในสนามไฟฟ้า ⁽²⁴⁾ (รูปที่ 11)

ในปี 2017 Xue Yang และคณะได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับวิธีการเตรียมของนาโน เซลลูโลสที่จะสามารถส่งผลต่อสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลสที่ทำการสกัดจาก เปลือกข้าวโพด ที่มีวิธีการเตรียมจาก 3 วิธีที่แตกต่างกัน ได้แก่ acid hydrolysis, TEMPO oxidation method และ high-intensity ultrasonication จนได้นาโนเซลลูโลสที่แตกต่างกัน ออกมา แล้วจึงนำไปทำการตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ รวมถึงการวัดค่าความต่างศักย์บนผิว อนุภาค (zeta potential) ⁽²⁵⁾ (รูปที่ 12)





17

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. พืชที่ใช้ในการศึกษา

สาหร่ายคลาโดฟลอรา (Cladophora glomerata) เก็บด้วยมือจากชายหาดบางแสน ช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2564

2. เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

2.1. สารเคมี

- 2.1.1. Ethanol UNISON SOLUTION A รุ่นที่ผลิต A1XD210823SA
- 2.1.2. Hydrogen peroxide
- 2.1.3. Sodium hydroxide LOBA CHEMIE PVT. LTD. Batch# A321831912
- 2.1.4. Hydrochloric acid QRëC[®]

2.2. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 2.2.1. เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ Sartorius arium[®] 611 UV และ arium[®] 615DI Deionization
 Cartridges order No. 615DI007
- 2.2.2. FTIR Spectrometer รุ่น Nicolet 6700
- **2.2.3.** Zetasizer ยี่ห้อ Malvern
- 2.2.4. เครื่องวิเคราะห์ผลึกด้วยเทคนิคการเลี้ยวเบนรังสีเอ็กซ์ (XRD) ยี่ห้อ Malvern รุ่น AERIS
- 2.2.5. Thermogravimetric Analyzer (TGA) ยี่ห้อ PerkinElmer รุ่น TGA 4000
- **2.2.6.** เครื่องอัลตราโซนิก (High intensity ultrasonic processor with temperature controller) ยี่ห้อ SONIC & Materials.Inc รุ่น SON- VCX-750Z
- **2.2.7.** Micropipette ยี่ห้อ Thermoscientific
- 2.2.8. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารแบบตั้งโต๊ะ (Centrifuge) ยี่ห้อ Sorvall รุ่น Legend X1R
- 2.2.9. Heating matter LabHEAT®

- 2.2.10. pH paper Supelco[®]
- 2.2.11. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง เครื่องที่ 2 ห้อง P20705 SMIMADZU
- 2.2.12. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ห้อง P20603
- 2.2.13. Magnetic stirrer IKA® C-MAG HS 7 ห้อง P20603
- 3. ວີ້ 5ີວີຈັຍ



รูปที่ 12 แผนผังขั้นตอนงานวิจัย

3.1. การเตรียมตัวอย่าง

- 3.1.1. ล้างสาหร่ายคลาโดฟลอราด้วย DI water เพื่อกำจัดสิ่งเจือปนที่ติดมากับสาหร่าย เช่น เศษทราย เศษหิน เป็นต้น
- 3.1.2. นำสาหร่ายคลาโดฟลอราที่ล้างเสร็จแล้วไปตากแห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3.2. การสกัดเซลลูโลส

- 3.2.1. นำตัวอย่างแห้งน้ำหนัก 36.9397 กรัมมาทำการสกัดเซลลูโลส โดยแบ่งตัวอย่างเป็นการสกัดด้วย วิธี soxhlet extraction (26.9321 กรัม) และreflux extraction (10.0076 กรัม) ด้วย 85% v/v ethanol ที่อุณหภูมิ 120 ℃ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัด เม็ดสี (pigment) และ กรดไขมัน (fatty acids)
- 3.2.2. กรองส่วนของสารละลายทิ้งไป แล้วนำส่วนที่ไม่ละลาย (insoluble fraction) ไปอบแห้งด้วย ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 37 ℃ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
- 3.2.3. นำตัวอย่างที่แห้งแล้วนำมาฟอกสีโดยใช้ 4% H₂O₂ 200 ml ต้มด้วยความร้อน 80 °C เป็นเวลา
 16 ชั่วโมง รอให้ตัวอย่างที่ได้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5000 rpm
 เป็นเวลา 15 นาที
- 3.2.4. ทิ้งส่วนสารละลายด้านบนไป แล้วนำส่วนที่ตกตะกอนมาล้างด้วย DI water จนค่า pH ของ DI water ที่นำมาล้างมีค่าเท่ากับ 7
- 3.2.5. นำตัวอย่างมาต้มด้วย 0.5 M NaOH 200 ml ที่อุณหภูมิ 60 ℃ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
- 3.2.6. รอให้ตัวอย่างที่ได้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5000 rpm เป็นเวลา
 15 นาที ทิ้งส่วนสารละลายด้านบนทิ้งไป แล้วนำส่วนที่ตกตะกอนมาล้างด้วย DI water จนค่า pH
 ของ DI water ที่นำมาล้างมีค่าเท่ากับ 7
- 3.2.7. นำตัวอย่างมาต้มด้วย 5% v/v HCl 200 ml จนเดือด จากนั้นปรับอุณหภูมิลงให้อยู่ที่ 30 ℃ และให้คงไว้ที่อุณหภูมินี้เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
- 3.2.8. รอให้ตัวอย่างที่ได้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5000 rpm เป็นเวลา
 15 นาที ทิ้งส่วนสารละลายด้านบนทิ้งไป แล้วนำส่วนที่ตกตะกอนมาล้างด้วย DI water จนค่า pH
 ของ DI water ที่นำมาล้างมีค่าเท่ากับ 7
- 3.2.9. เก็บตัวอย่างที่ได้ แล้วนำไปทำการตากแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

3.3. การสกัดนาโนเซลลูโลส

- 3.3.1. นำตัวอย่างเซลลูโลสที่ได้ 0.5 g มาสกัดด้วย 3 M HCl 100 ml แล้วให้ความร้อนที่ 90 ℃ เป็น
 เวลา 90 นาที
- 3.3.2. รอให้ตัวอย่างที่ได้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5000 rpm เป็นเวลา
 15 นาที ทิ้งส่วนสารละลายด้านบนทิ้งไป แล้วนำส่วนที่ตกตะกอนมาล้างด้วย DI water จนค่า pH
 ของ DI water ที่นำมาล้างมีค่าเท่ากับ 7
- 3.3.3. เก็บตัวอย่างที่ได้ แล้วนำไปทำการอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 37 ℃ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.4. การทดสอบคุณสมบัติ

3.4.1. การศึกษาลักษณะทั่วไป และรูปร่างของนาโนเซลลูโลส

3.4.1.1. SEM (Scanning electron microscopy)

นำตัวอย่างนาโนเซลลูโลสมาทำการเคลือบด้วย gold จากนั้นทำการวิเคราะห์ ตัวอย่างด้วย Field-emission scanning electron microscopy โดยใช้ค่าความต่าง ศักย์ที่ 5kV ทำการวิเคราะห์ลักษณะและรูปร่างด้วยโปรแกรม ImageJ (ImageJ 1.525v software, National Institute of Mental Health, USA)

3.4.1.2. TEM (Transmission electron microscopy)

นำตัวอย่างนาโนเซลลูโลสมาเตรียมเป็น suspensions ที่ ความเข้มข้น 0.1% w/v ด้วยเครื่องอัลตราโซนิก ทำการหยดตัวอย่างลงบน carboncoated copper grid จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย Transmission electron microscopy โดยใช้ค่าความต่างศักย์ที่ 200 kV ทำการวิเคราะห์ความยาว และขนาด เส้นผ่าศูนย์กลางด้วยโปรแกรม ImageJ (ImageJ 1.525v software, National Institute of Mental Health, USA)

3.4.2. Fourier transform-infrared (FTIR) spectroscopy

วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นของตัวอย่างโดยนำตัวอย่างแห้งมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ATR-FTIR Spectrometer รุ่น Nicolet 6700 บันทึกผลด้วย OMNIC FT-IR software ที่หมายเลขคลื่น 500-4500 cm⁻¹

3.4.3. Thermogravimetric analysis (TGA)

วิเคราะห์ thermostability ของตัวอย่างด้วยเครื่อง Thermogravimetric Analyzer (TGA) โดยให้ความร้อนตั้งแต่ช่วง 40 - 800 ℃ โดยมีอัตราการให้ความร้อน 10 ℃ /min ภายใต้สภาวะของแก๊สไนโตรเจน 20 mL/min หลังจากที่ความร้อนสูงถึง 800 ℃ และคงอุณหภูมิไว้ที่ 800 ℃ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการบันทึกผล คำนวณ ค่า %char จากน้ำหนักตัวอย่างที่เหลือหลังจากการเผาใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจนที่ 800 ℃

3.4.4. X-ray diffraction analysis (XRD)

การวิเคราะห์ความเป็นผลึกและดัชนีความเป็นผลึก (crystallinity index) ด้วยเครื่อง XRD diffractometer โดยใช้ monochromatic CuK**α** radiation (**λ** = 1.54060 Å, 40.0 kV, 40.0 mA) วัดที่มุม 5°<2**θ**< 50° สเต็ปละ 0.043466° ด้วย ความเร็ว 2 s/step จากนั้นทำการบันทึกผลด้วย HighScore 5.0 software และ crystallinity index สามารถคำนวณได้จากสมการ (1)

Crystallinity index =
$$\left(\frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}}\right) \times 100$$
 (1)

โดย I₂₀₀ คือค่า intensity ของผลึกที่ 2 θ = 22.8 ° และ I_{am} คือค่า intensity ของ amorphous phase ซึ่งพบที่ประมาณ 2 θ = 18 °

3.4.5. Zeta potential

การวัดค่าความต่างศักย์บนผิวอนุภาคของตัวอย่าง โดยเตรียมตัวอย่างเป็น suspensions ที่ความเข้มข้นของสารละลายเท่ากับ 0.5 % w/v วิเคราะห์ Zeta potential ด้วยเครื่อง Zetasizer ที่อุณหภูมิ 25 ℃ และทำการบันทึกผล
บทที่ 4 ผลการวิจัย

1. การศึกษาลักษณะทั่วไป และรูปร่างของนาโนเซลลูโลส

การสกัดนาโนเซลลูโลสจากสาหร่าย *Cladophora glomerata* ด้วยวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการ soxhlet extraction (รูปที่ 13) และ reflux extraction (รูปที่ 14) เพื่อสกัดสารอินทรีย์ออกจากตัวอย่าง ตัวอย่างหลังการสกัดมีลักษณะเป็นสีเขียวจางลง ฟอกสีตัวอย่างด้วย 4% H₂O₂ ได้ตัวอย่างเป็นสีขาวนวล (รูปที่ 14c, 15c) จากนั้นสกัดด้วย 5M NaOH ตามด้วย 5% HCl และสกัดด้วย 3M HCl ตามลำดับ (รูปที่ 14d-h, 15d-h)



รูปที่ 13 แสดงถึงลักษณะของตัวอย่าง a) สาหร่ายคลาโดฟลอราแห้ง b) ตัวอย่างหลังการสกัดด้วยวิธี soxhlet extraction c) ตัวอย่างหลังการฟอกสีด้วย 4% H₂O₂ d) ตัวอย่างหลังการต้มด้วย 5M NaOH e) ตัวอย่างหลังการต้มด้วย 5% v/v HCl f) ตัวอย่างหลังการนำไปตากแห้งที่อุณหภูมิห้อง g) ตัวอย่าง นาโนเซลลูโลส และ h) ตัวอย่างนาโนเซลลูโลสหลังอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน



รูปที่ 14 แสดงถึงลักษณะของตัวอย่าง a) สาหร่ายคลาโดฟลอราแห้ง b) ตัวอย่างหลังการสกัดด้วยวิธี reflux extraction c) ตัวอย่างหลังการฟอกสีด้วย 4% H₂O₂ d) ตัวอย่างหลังการต้มด้วย 5M NaOH e) ตัวอย่างหลังการต้มด้วย 5% v/v HCl f) ตัวอย่างหลังการนำไปตากแห้งที่อุณหภูมิห้อง g) ตัวอย่างนาโน เซลลูโลส และ h) ตัวอย่างนาโนเซลลูโลสหลังอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน

เมื่อส่องด้วยกล้อง scanning electron microscope และ transmission electron microscope พบว่านาโนเซลลูโลสที่สกัดได้มีลักษณะสานกันเป็นร่างแห (รูปที่ 15) เมื่อนำนาโนเซลลูโลสกระจายตัวในน้ำให้ ได้ความเข้มข้น 0.1% w/v วิเคราะห์ด้วยเทคนิค TEM จะเห็นลักษณะเป็นเส้นยาวสานกันเป็นร่างแหอย่าง ชัดเจน (รูปที่ 16 a-b) พบบางจุดเกิดรอยหักเล็กน้อย (รูปที่ 16c)



รูปที่ 15 แสดงถึงภาพจากกล้อง SEM a) นาโนเซลลูโลสที่สกัดด้วยวิธี soxhlet extraction b) นาโนเซลลูโลสที่ สกัดด้วยวิธี reflux extraction



รูปที่ 16 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM a) และ b) นาโนเซลลูโลสเป็นเส้นยาวสานกันเป็นร่างแหอย่าง ชัดเจน c) การเกิดรอยหักของนาโนเซลลูโลส การศึกษาขนาดของนาโนเซลลูโลสโดยทำการวัดความยาวและความกว้างของนาโนเซลลูโลสด้วย โปรแกรม Image J (N=50) พบว่านาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction มีความยาวเท่ากับ 1505.41 ± 644.68 nm และความกว้างเท่ากับ 21.92 ± 6.70 nm ส่วนของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี reflux extraction พบว่ามีความยาวเท่ากับ 793.18 ± 385.82 nm และความกว้างเท่ากับ 21.12 ± 6.00 nm จากนั้นทำการหา aspect ratio โดยคำนวณจากความยาวหารด้วยความกว้างของนาโนเซลลูโลสแต่ละสาย จากกราฟการกระจาย ของ aspect ratio (length-width aspect ratio distribution) (ดังรูปที่ 17 และ 18) พบว่า aspect ratio ของ นาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction อยู่ในช่วง 61-70 มากที่สุด และในส่วนของนาโนเซลลูโลสที่สกัด โดยวิธี reflux extraction พบ aspect ratio อยู่ในช่วง 41-50 มากที่สุด



รูปที่ 17 แสดงถึง length-width aspect ratio distribution ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction



รูปที่ 18 แสดงถึง length-width aspect ratio distribution ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี reflux extraction

2. การศึกษาคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลส

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของนาโนเซลลูโลสด้วย FTIR (Fourier transform-infrared spectroscopy)

FTIR spectra ของนาโนเซลลูโลสที่เตรียมตัวอย่างจากวิธี soxhlet (รูปที่ 19) และ reflux (รูปที่ 20) ปรากฏสัญญาณ ที่เด่นซัดที่ 3341 cm⁻¹ และ 3342 cm⁻¹ บ่งบอกถึง O-H stretching พบ peak ที่ 2899 cm⁻¹ และ 2897 cm⁻¹ บ่งบอกถึง C-H stretching ของหมู่ alkane และพบ peak ที่ 1372 ซึ่ง เป็นสัญญาณของ C-H bending พบ peak ที่ 1161 cm⁻¹ เป็น peak ของ C-O-C ที่เป็นพันธะ glycosidic ซึ่งตรงกับหมู่ฟังก์ชันของโครงสร้างนาโนเซลลูโลส ส่วนที่สัญญาณ 1109 cm⁻¹ และ 1108 cm⁻¹ เป็น peak ของ C-OH, 1055 cm⁻¹ และ 1057 cm⁻¹ เป็น peak ของ C-C stretching

เมื่อเปรียบเทียบ FTIR spectra จากการเตรียมตัวอย่างจากทั้ง 2 วิธีนี้พบว่าไม่ได้มีความแตกต่าง กัน ซึ่งบ่งบอกได้ว่ามีลักษณะของนาโนเซลลูโลสที่เหมือนกัน



รูปที่ 20 FTIR spectrum ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดด้วยวิธี reflux extraction

2.2. คุณสมบัติความเป็นผลึกของนาโนเซลลูโลสด้วยเทคนิค X-ray Diffraction (XRD)

จากผลการตรวจสอบความเป็นผลึกของ นาโนเซลลูโลสด้วยเครื่อง X-ray Diffraction พบว่า นาโน เซลลูโลสที่เตรียมด้วยวิธี soxhlet และ reflux แสดงคุณสมบัติเป็นผลึกที่ดี จาก XRD spectra (ดังรูปที่ 21 และ 22) พบสัญญาณที่ 2**0** 22.3776 ° และ 22.5949 ° ซึ่งบ่งบอกลักษณะของเซลลูโลสชนิด I**a** ⁽²⁰⁾

ค่าดัชนีความเป็นผลึก crystallinity index (CI) ของตัวอย่างที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยวิธี soxhlet และ reflux จะคำนวณตามสมการ Segal's method มีค่าเท่ากับ 85.17% และ 84.92% ตามลำดับ จึงสรุป ได้ว่านาโนเซลลูโลสของทั้ง 2 วิธีดังกล่าว มีลักษณะของนาโนเซลลูโลสในรูปแบบผลึกที่ไม่แตกต่างกัน







รูปที่ 22 XRD spectrum ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดด้วยวิธี reflux extraction

2.3. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสารโดยอาศัยคุณสมบัติทางความร้อน (Thermogravimetric analysis, TGA)

จากรูปที่ 23 ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสารสกัดที่ผ่านกระบวนการ acid treatment โดยอาศัยคุณสมบัติทางความร้อนด้วยเครื่อง Thermogravimetric Analyzer (TGA) พบว่า ที่ช่วงอุณหภูมิ 40-100 ℃ ตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธีการ soxhlet มีน้ำหนักลดลง 15% การลดลง ของน้ำหนักนี้เป็นเนื่องมาจากการระเหยของน้ำที่มีการดูดซับอยู่ในตัวอย่าง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิพบว่า ตัวอย่างที่เตรียมด้วย reflux และ soxhlet เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักที่เด่นชัดที่อุณหภูมิ T_o 321℃ และ 339℃ ตามลำดับ และเกิดการสลายตัวสูงสุดที่อุณหภูมิ T_{max} อยู่ที่ 368.30℃ และ 372.49℃ ตามลำดับ ทำให้สรุปได้ว่า ตัวอย่างทั้งสองสามารถทนต่ออุณหภูมิความร้อน ก่อนที่จะสลายตัว ที่ใกล้เคียงกัน ทำให้สอดคล้องกับคุณสมบัติในการเป็นผลึกที่คล้ายกัน จากที่ได้กล่าวในการทดสอบความ เป็นผลึกของทั้ง 2 ตัวอย่าง และเมื่อนำไปคำนวณ %char จากน้ำหนักตัวอย่างที่เหลือหลังจากการเผาใต้ สภาวะแก๊สไนโตรเจน มีค่าเท่ากับ 6.113% และ 7.396% ตามลำดับ



รูปที่ 23 TGA thermogram ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดด้วยทั้ง 2 วิธี; (a): reflux, (b): soxhlet เส้นสีน้ำเงิน: % Derivative weight เส้นสีแดง: % Nanocellulose weight

2.4. การวัดค่าความต่างศักย์บนผิวอนุภาค

การวัดค่า zeta potential ด้วยเครื่อง Zetasizer โดยนำนาโนเซลลูโลสมากระจายตัวใน DI water ด้วยการใช้ ultrasonicator จนได้ความเข้มข้น 0.5% w/v จึงนำไปวัดค่า zeta potential คัว อย่างละ 3 ครั้ง พบว่า นาโนเซลลูโลสที่สกัดออกมาด้วยวิธี soxhlet extraction มีค่าเท่ากับ -48.6 mV , -50.1 mV และ -51.6 mV คิดเป็นค่าเฉลี่ยได้เท่ากับ -50.1 mV ในส่วนของนาโนเซลลูโลสที่สกัด ออกมาด้วยวิธี reflux extraction มีค่าเท่ากับ -42.6 mV , -34.2 mV และ -41.0 mV คิดเป็นค่าเฉลี่ย ได้เท่ากับ -39.3 mV



รูปที่ 24 zeta potential spectra ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดด้วยวิธี soxhlet extraction



รูปที่ 25 zeta potential spectra ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดด้วยวิธี reflux extraction

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การสกัดนาโนเซลลูโลสในการศึกษานี้ใช้กระบวนการวิธีการฟอกสี ต้มด้วยด่าง และกรด ตามลำดับ โดย ทำการเตรียมตัวอย่างก่อนกระบวนการสกัดเซลลูโลสด้วยวิธี soxhlet extraction และ reflux extraction เพื่อ กำจัดสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่าง จากนั้นจึงนำไปต้มด้วย 4% H₂O₂ เพื่อกำจัด pigment ออก แล้ว นำไปต้มด้วย 0.5 M NaOH แล้วต้มด้วย 5%v/v HCl เพื่อกำจัดโปรตีนออก จากนั้นจึงนำไปทำการ acid treatment ด้วย 3 M HCl เพื่อทำการสกัดนาโนเซลลูโลสออกมา ⁽²⁾ เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค FTIR พบว่า นาโนเซลลูโลสที่เตรียมจากทั้ง 2 วิธีเป็นเซลลูโลสชนิดเดียวกัน นอกจากนี้ยังใช้เทคนิค FTIR ติดตามคุณสมบัติของ ตัวอย่างในแต่ละขั้นตอนของการสกัด พบว่าหลังจากกระบวนการสกัดด้วยวิธีการ soxhlet extraction และ reflux extraction นั้น ตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะ FTIR spectrum ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นกระบวนการเตรียม ตัวอย่างก่อนการสกัดไม่มีผลต่อการสกัดนาโนเซลลูโลส

จากการศึกษาลักษณะทั่วไปและรูปร่างของนาโนเซลลูโลสจากสาหร่ายคลาโดฟลอราพบว่าลักษณะ ภายนอกของตัวอย่างที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction และ reflux extraction เป็นของแข็งสีขาว ไม่มีความ แตกต่างกันเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เมื่อทำการศึกษาด้วยกล้อง scanning electron microscope พบว่านาโน เซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นยาว สานกันเป็นร่างแห และจากการศึกษาขนาดของนาโนเซลลูโลสด้วยกล้อง transmission electron microscope พบว่านาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction มีความยาว มากกว่าวิธี reflux extraction และมีความกว้างที่ไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้ความยาวของนาโนเซลลูโลสที่แตกต่างกัน อาจเกิดจากการแตกหักอันเนื่องมาจากกระบวนการเตรียมตัวอย่างโดยการ sonicate ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย TEM ⁽²⁶⁾ แต่อย่างไรก็ตามนาโนเซลลูโลสที่สกัดได้จากทั้ง 2 วิธีมีขนาดและความยาวอยู่ในช่วงเดียวกันกับนาโน เซลลูโลสที่สกัดจาก *Cladophora glomerata* ตามรายงานโดย Xiang. Z., et al 2016 ⁽¹⁸⁾ เมื่อเปรียบเทียบ aspect ratio พบว่าวิธี soxhlet extraction มีค่า aspect ratio ที่สูงกว่าวิธี reflux extraction แต่ทั้ง 2 วิธีก็ถือ ว่าได้ค่า aspect ratio ที่สูง ซึ่งแสดงถึงการมีพื้นที่ผิวที่มาก

จากการวิเคราะห์ความเป็นผลึกของนาโนเซลลูโลสด้วยเครื่อง XRD พบว่านาโนเซลลูโลสที่ได้จากวิธีการ สกัดทั้ง 2 วิธีให้ลักษณะของความเป็นผลึกที่ดี จัดเป็น cellulose type I_α มีความเป็นผลึกสูงโดยมีค่าดัชนีความ

32

เป็นผลึก crystallinity index (CI) มากกว่า 84.5 % นาโนเซลลูโลสที่เตรียมได้จากทั้ง 2 วิธีมีความสามารถในการ ทนความร้อนได้สูง โดยสลายตัวที่อุณหภูมิ 368.30 และ 372.49 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นอกจากนี้ TGA profile พบการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเพียงครั้งเดียว ซึ่งบ่งบอกถึงคุณสมบัติการเป็นผลึกที่ดีและมีความบริสุทธิ์ สูง

จากการวิเคราะห์ค่าความต่างศักย์บนพื้นผิวอนุภาคด้วยเครื่อง Zetasizer พบว่า ค่า zeta potential ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction และ reflux extraction มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ -50.1 mV และ -39.3 mV ตามลำดับ ซึ่งไม่ได้อยู่ในช่วง +30 mV ถึง -30 mV บ่งบอกถึงความสามารถในการหักล้างต่อกัน ระหว่างอนุภาคของนาโนเซลลูโลสภายในสารละลาย ทำให้เกิดเสถียรภาพในการกระจายตัว ไม่จับกันเป็นก้อน หรือตกตะกอนเป็นของแข็ง หลังจากที่มีการกระจายตัวไปแล้ว จึงสรุปได้ว่าระบบคอลลอยด์ของนาโนเซลลูโลสที่ สกัดด้วยวิธี soxhlet extraction และ reflux extraction มีเสถียรภาพในการกระจายตัวที่ดีในน้ำที่เป็นตัวทำ ละลาย

จากคุณสมบัตินาโนเซลลูโลสที่สกัดได้จากสาหร่ายสีเขียว Cladophora glomerata แสดงให้เห็นว่า สาหร่ายชนิดนี้มีศักยภาพในการเป็นแหล่งของนาโนเซลลูโลสที่มีคุณสมบัติสามารถนำไปใช้ต่อยอดทางทางวัสดุ ศาสตร์ และการประยุกต์ใช้ทางเภสัชกรรมได้ในอนาคต

ในด้านของเรื่องวิธีการสกัดนาโนเซลลูโลสด้วย soxhlet extraction และ reflux extraction ให้ผลของ นาโนเซลลูโลสออกมาไม่มีความแตกต่างกัน แต่ในด้านของการใช้สารละลายในการทำการสกัด วิธี soxhlet extraction จะใช้ปริมาณสารละลายที่น้อยกว่าวิธี reflux extraction จึงแนะนำให้ทำการสกัดด้วยวิธี soxhlet extraction มากกว่าวิธี reflux extraction

เอกสารอ้างอิง

 ธัญญ์นลิน วิญญูประสิทธิ์ ยส, น้ำผึ้งรุ่งเรือง. นาโนเซลลูโลส: การประยุกต์ใช้ในอาหารและความปลอดภัย อาหาร. วารสารพิษวิทยาไทย. 2560;32(1):67-79.

2. Wahlström N EU, Pavia H, Toth G, Jaworski A, Pell AJ, et al. Cellulose from the green macroalgae Ulva lactuca: isolation, characterization, optotracing, and production of cellulose nanofibrils. Cellulose. 2020;27:3707-25.

3. Onbnews. ทช.ลงพื้นที่สำรวจก้อนสาหร่ายเขียวสะพรั่ง เกลื่อนชายหาดบางแสน 2564 [cited 2564 16 สิงหาคม]. Available from: <u>https://www.onbnews.today/post/50766</u>.

4. เกิดเป้า ข. ยูโทรฟิเคชั่น (Eutrophication). 2554.

5. Zhou S NL, Stromme M, Wang Z. Cladophora Cellulose: Unique Biopolymer Nanofibrils for Emerging Energy, Environmental, and Life Science Applications. Accounts of Chemical Research. 2019;52(8).

6. กัญญา สุจริตวงศานนท์. ท่านรู้จัก ไก สาหร่ายล้ำคุณค่าของคนไทยภาคเหนือแล้วหรือยัง. อาหาร.
2549;36:273-9.

 โครงการความร่วมมือด้านงานวิจัยระหว่างมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (มก.) สถาบันเทคโนโลยีพระจอม เกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) และศูนย์วิจัยวิทยาศาสตร์การเกษตรนานาชาติแห่งประเทศญี่ปุ่น.
Cladophora sp.1: jircas.affrc; 2564 [cited 2564 16 ส.ค.]. Available from:

https://www.jircas.affrc.go.jp/project/aquacult_Thailand/th/data/cladophora_sp1.html.

8. Lee RE. Phycology. 4 ed. New York: Cambridge Univ Press; 2008. 1-645 p.

9. Guiry MD. C. VAN DEN HOEK, D. G. MANN and H. M. JAHNS. Algae. An Introduction to Phycology. Cambridge University Press, Cambridge. 1995, pp. xiv+623. ISBN: 0 521 30419 9 (hardback); 0 051 31687 1 (paperback). Price: £70.00 (hard); £24.95 (soft). European Journal of Phycology. 1997;32(2):203-5.

10. Phanthong P, Reubroycharoen P, Hao X, Xu G, Abudula A, Guan G. Nanocellulose: Extraction and application. Carbon Resources Conversion. 2018;1(1):32-43.

11. Moon RJ, Martini A, Nairn J, Simonsen J, Youngblood J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. Chem Soc Rev. 2011;40(7):3941-94.

12. Lavoine N, Desloges I, Dufresne A, Bras J. Microfibrillated cellulose - its barrier properties and applications in cellulosic materials: a review. Carbohydr Polym. 2012;90(2):735-64.

13. Thomas P, Duolikun T, Rumjit NP, Moosavi S, Lai CW, Bin Johan MR, et al. Comprehensive review on nanocellulose: Recent developments, challenges and future prospects. J Mech Behav Biomed Mater. 2020;110:103884.

14. Youssef Habibi LAL, and Orlando J. Rojas. Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications. Chem Rev. 2010:3479–500.

 จุฬาลักษณ์ เขมาชีวกุล. การผลิตแบคทีเรียเซลลูโลสสายพันธุ์ Acetobacter xylinum และการ ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม. 2559.

16. Moniruzzaman M, Ono T. Separation and characterization of cellulose fibers from cypress wood treated with ionic liquid prior to laccase treatment. Bioresour Technol. 2013;127:132-7.

17. อัจฉราพร ศรีอ่อน. หลักการทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนนิง. Materials Characterization. 2559.

18. Xiang Z, Gao W, Chen L, Lan W, Zhu JY, Runge T. A comparison of cellulose nanofibrils produced from Cladophora glomerata algae and bleached eucalyptus pulp. Cellulose. 2015;23(1):493-503.

19. ยอดศรี. ว. การทำงานของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิสชัน. วารสารเทคโนโลยีวัสดุ.
2557;75:67 - 72.

20. S. Steven YM, Silvia Maratus Shoimah, Raden Reza Rizkiansyah, Sigit Puji Santosa, Rochim Suratman. Preparation and Characterization of Nanocrystalline Cellulose from *Cladophora sp. Algae*. Advanced Science Engineering Information Technology. 2021;11(2021).

21. สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน. เครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์ [cited 2564 16 สิงหาคม]. Available from: <u>https://www.slri.or.th/bdd/th/22-</u>

<u>%E0%B8%9A%E0%B8%A3%E0%B8%B4%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B9%80%E0</u> <u>%B8%84%E0%B8%A3%E0%B8%B7%E0%B9%88%E0%B8%AD%E0%B8%87%E0%B8%A1%E0%B8</u> <u>%B7%E0%B8%AD%E0%B8%A7%E0%B8%B4%E0%B8%97%E0%B8%A2%E0%B8%B2%E0%B8%A8</u> <u>%E0%B8%B2%E0%B8%AA%E0%B8%95%E0%B8%A3%E0%B9%8C/71-x-ray-diffractometer-</u> <u>xrd.html</u>. 22. สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน. เครื่องฟลูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรดสเปคโทรไมโครสโคป [cited 2564 16 สิงหาคม]. Available from: <u>https://www.slri.or.th/bdd/th/22-</u>

<u>%E0%B8%9A%E0%B8%A3%E0%B8%B4%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B9%80%E0</u> <u>%B8%84%E0%B8%A3%E0%B8%B7%E0%B9%88%E0%B8%AD%E0%B8%87%E0%B8%A1%E0%B8</u> <u>%B7%E0%B8%AD%E0%B8%A7%E0%B8%B4%E0%B8%97%E0%B8%A2%E0%B8%B2%E0%B8%A8</u> <u>%E0%B8%B2%E0%B8%AA%E0%B8%95%E0%B8%A3%E0%B9%8C/66-ftir-micro-</u>

spectrometer.html.

23. ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ. Thermogravimetric Analysis (TGA) [cited 2564 16 สิงหาคม]. Available from:

https://www.nanotec.or.th/th/%E0%B8%87%E0%B8%B2%E0%B8%99%E0%B8%9A%E0%B8%A3 %E0%B8%B4%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3/%E0%B8%AB%E0%B9%89%E0%B8%AD%E 0%B8%87%E0%B8%9B%E0%B8%8F%E0%B8%B4%E0%B8%9A%E0%B8%B1%E0%B8%95%E0%B 8%B4%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%A7%E0%B8%B4%E0%B9%80%E0%B8%8 4%E0%B8%A3%E0%B8%B2%E0%B8%B0%E0%B8%AB/thermogravimetric-analysis-tga.

24. สวรรณสังข์ ก. การเตรียมเม็ดอิตเทรียสเตบิไลซ์เซอร์โคเนียโดยเทคนิคพ่นแห้ง. 2552.

25. Yang X HF, Xu C, Jiang S, Huang L, Liu L, et al. Effects of preparation methods on the morphology and properties of nanocellulose (NC) extracted from corn husk. Industrial Crops and Products. 2017;109:241 - 7.

26. Nystrom G, Arcari M, Adamcik J, Usov I, Mezzenga R. Nanocellulose Fragmentation Mechanisms and Inversion of Chirality from the Single Particle to the Cholesteric Phase. ACS Nano. 2018;12(6):5141-8.

ภาคผนวก

ภาคผนวก (1) การเตรียมสาร ภาคผนวก (2) ผลการทดสอบคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลส ภาคผนวก (3) อักขราวิสุทธิ์ ภาคผนวก (4) แบบฟอร์มรายงานการเงิน

ภาคผนวก (1) การเตรียมสาร

- 1. การเตรียม 85% ethanol ปริมาตร 1000 ml
 - 1.1. ตวง 98.8 % ethanol ปริมาตร 860 ml ใส่ใน reagent bottle
 - 1.2. เติม DI water ปริมาตร 140 ml ลงไป
 - 1.3. ผสมสารละลายให้เข้ากัน
- 1. การเตรียม 4 % H₂O₂ ปริมาตร 500 ml
 - 1.1. ตวง 50 % H_2O_2 ปริมาตร 40 ml ใส่ใน reagent bottle
 - 1.2. เติม DI water ปริมาตร 460 ml ลงไป
 - 1.3. ผสมสารละลายให้เข้ากัน
- 2. การเตรียม 0.5 M NaOH ปริมาตร 620 ml
 - 2.1. ซั่ง NaOH มา 12.4 g
 - 2.2. ละลายด้วย DI water ปริมาตร 500 ml แล้วเทใส่กระบอกตวงขนาด 1000 ml
 - 2.3. เติม DI water จนปริมาตรครบ 620 ml
 - 2.4. เทสารละลายใส่ใน reagent bottle
 - 2.5. ผสมสารละลายให้เข้ากัน
- 3. เตรียม 5 %v/v HCl ปริมาตร 500 ml
 - 3.1. ตวง 0.1 N HCl มา 11.23 ml ใส่ในกระบอกตวง
 - 3.2. เติม DI water จนปริมาตรครบ 500 ml
 - 3.3. เทสารละลายใส่ใน reagent bottle
 - 3.4. ผสมสารละลายให้เข้ากัน
- 4. เตรียม 3 M HCl ปริมาตร 250 ml
 - 4.1. ตวง conc. HCl ปริมาตร 62.5 ml ใส่ใน beaker
 - 4.2. เติม DI water 187.5 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วเทสารละลายที่ได้ใส่ reagent bottle

ภาคผนวก (2) ผลการทดสอบคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลส

1. การดูลักษณะทั่วไป และรูปร่างของนาโนเซลลูโลส

Scanning electron microscope (SEM)



รูปที่ 26 แสดงถึงภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 100 เท่า ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction



รูปที่ 27 แสดงถึงภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 200 เท่า ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction



รูปที่ 28 แสดงถึงภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 1000 เท่า ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction



รูปที่ 29 แสดงถึงภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 200 เท่า ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี reflux extraction



รูปที่ 30 แสดงถึงภาพจากกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 500 เท่า ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี reflux extraction



Transmission electron microscope (TEM)

รูปที่ 31 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 8500 เท่า ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction



รูปที่ 32 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 13000 เท่า ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction



รูปที่ 33 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 17000 เท่า ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction



รูปที่ 34 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 25500 เท่า ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction



รูปที่ 35 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 44000 เท่า ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction



รูปที่ 36 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 8500 เท่า ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี reflux extraction



รูปที่ 37 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 13000 เท่า ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี reflux extraction



รูปที่ 38 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 25500 เท่า ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี reflux extraction



รูปที่ 39 แสดงถึงภาพจากกล้อง TEM ที่กำลังขยาย 44000 เท่า ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี reflux extraction

Length (nm)	Width (nm)	Aspect ratio
957.730	15.122	63.334
809.125	15.396	52.554
354.114	14.683	24.117
685.065	9.607	71.309
1084.157	24.641	43.998
1144.431	19.938	57.399
1864.124	24.185	77.078
1753.464	50.633	34.631
1308.572	22.234	58.855
1861.555	27.604	67.438
1075.986	15.455	69.621
1110.449	24.784	44.805
885.049	21.439	41.282
2817.012	22.212	126.824
1978.259	23.627	83.729
878.598	20.437	42.991
2898.351	20.482	141.507
878.028	20.561	42.704
2349.500	14.370	163.500
1314.637	17.111	76.830
1367.847	16.755	81.638
988.487	20.347	48.581
2029.097	20.730	97.882
1328.073	14.962	88.763

Length (nm)	Width (nm)	Aspect ratio
989.503	28.179	35.115
1049.653	26.681	39.341
1247.526	27.878	44.749
1902.019	13.231	143.755
1744.551	23.952	72.835
2344.689	17.772	131.932
1036.429	14.254	72.711
1175.787	18.936	62.093
706.688	23.055	30.652
2508.303	18.714	134.034
871.351	19.247	45.272
905.173	22.318	40.558
702.755	29.477	23.841
1490.325	28.848	51.661
2443.805	34.565	70.702
2005.349	22.590	88.772
1788.097	23.523	76.015
2016.777	17.810	113.238
1594.911	22.385	71.249
842.200	30.481	27.630
1501.141	28.253	53.132
2183.438	18.602	117.377
2014.898	20.869	96.550
2318.936	31.100	74.564
2911.859	19.909	146.258
1252.517	16.034	78.116

ตารางที่ 1 ความยาว ความกว้าง และ aspect ratio ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction

	-	
Length (nm)	Width (nm)	Aspect ratio
532.461	23.284	22.868
745.320	22.078	33.758
2273.749	24.968	91.067
714.148	26.857	26.591
417.693	22.485	18.577
462.905	27.095	17.085
893.609	24.039	37.173
1067.737	21.362	49.983
194.049	13.805	14.056
817.960	21.337	38.335
955.038	18.564	51.446
1519.733	17.039	89.191
754.713	11.957	63.119
932.159	31.929	29.195
1145.319	26.938	42.517
650.792	17.935	36.286
464.102	14.807	31.343
516.738	11.993	43.087
544.608	21.324	25.540
394.462	28.935	13.633
321.205	21.914	14.658
421.129	22.559	18.668
1270.073	15.697	80.912
367.903	21.910	16.792

Length (nm)	Width (nm)	Aspect ratio
461.721	16.165	28.563
548.462	19.794	27.708
766.260	23.207	33.018
460.680	12.989	35.467
994.328	8.325	119.439
1097.300	33.121	33.130
564.291	18.434	30.611
1060.205	27.070	39.165
1140.149	25.209	45.228
928.446	25.908	35.836
925.486	10.409	88.912
294.054	21.340	13.779
438.288	30.737	14.259
1700.571	16.695	101.861
867.835	24.707	35.125
967.225	21.763	44.444
1080.182	35.227	30.663
929.281	28.607	32.484
462.739	13.557	34.133
644.687	17.444	36.958
956.432	23.476	40.741
538.972	22.023	24.473
1023.512	17.156	59.659
871.012	19.053	45.715
529.358	14.941	35.430
1029.781	17.700	58.180

ตารางที่ 2 ความยาว ความกว้าง และ aspect ratio ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี reflux extraction

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยความยาว ความกว้าง และ SD ของนาโนเซลลูโลสที่สกัดโดยวิธี soxhlet extraction

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยความยาว ความกว้าง และ SD ของนาโนเซลลุโลสที่สกัดโดยวิธี reflux extraction

Length (average)	793.18	SD	385.82
Width (average)	21.12	SD	6.00

2. การศึกษาความเป็นผลึกของนาโนเซลลูโลส

X-ray diffraction (XRD)



รูปที่ 40 XRD spectrum ของสาหร่าย *Cladophora glomerata*



รูปที่ 41 XRD spectrum ของสาหร่าย *Cladophora gomerata* หลังการสกัดด้วยวิธี soxhlet extraction โดยใช้สารละลายเป็น 85% Ethanol



รูปที่ 42 XRD spectrum ของสาหร่าย *Cladophora gomerata* หลังการสกัดด้วยวิธี soxhlet extraction หลังจากการต้มโดย 4% H₂O₂



รูปที่ 43 XRD spectrum ของสาหร่าย *Cladophora gomerata* หลังการสกัดด้วยวิธี soxhlet

extraction หลังจากการต้มโดย 5M NaOH



รูปที่ 44 XRD spectrum ของสาหร่าย *Cladophora gomerata* หลังการสกัดด้วยวิธี soxhlet extraction หลังจากการต้มโดย 5%v/v HCl



รูปที่ 45 XRD spectrum ของสาหร่าย *Cladophora gomerata* หลังการสกัดด้วยวิธี reflux extraction โดยใช้สารละลายเป็น 85% Ethanol



รูปที่ 46 XRD spectrum ของสาหร่าย *Cladophora gomerata* หลังการสกัดด้วยวิธี reflux extraction หลังจากการต้มโดย 4% H₂O₂



รูปที่ 47 XRD spectrum ของสาหร่าย *Cladophora gomerata* หลังการสกัดด้วยวิธี reflux extraction หลังจากการต้มโดย 5M NaOH



รูปที่ 48 XRD spectrum ของสาหร่าย *Cladophora gomerata* หลังการสกัดด้วยวิธี reflux extraction หลังจากการต้มโดย 5%v/v HCl

นาโนเซลลูโลส	Intensity	2 0 °	Crystallinity index (%)	
Soxhlet	3836	18.0310	85.17	
	25876	22.3776	05.11	
Reflux	4141	18.0310	84.92	
	27465	22.5949	04.72	

ตารางที่ 5 ค่า peak ของนาโนเซลลูโลส โดยเครื่อง XRD

Fourier transform-infrared spectroscopy (FTIR)



รูปที่ 49 FTIR spectrum ของสาหร่าย *Cladophora glomerata*



รูปที่ 50 FTIR spectrum ของสาหร่าย *Cladophora glomerata* หลังจากการสกัดด้วยวิธี

soxhlet extraction โดยใช้สารละลายเป็น 85% Ethanol



รูปที่ 51 FTIR spectrum ของสาหร่าย *Cladophora glomerata* ที่สกัดด้วยวิธี

soxhlet extraction หลังจากการต้มด้วย 4% H_2O_2



รูปที่ 52 FTIR spectrum ของสาหร่าย Cladophora glomerata ที่สกัดด้วยวิธี

soxhlet extraction หลังจากการต้มด้วย 5M NaOH



รูปที่ 53 FTIR spectrum ของสาหร่าย *Cladophora glomerata* ที่สกัดด้วยวิธี

soxhlet extraction หลังจากการต้มด้วย 5%v/v HCl



รูปที่ 54 FTIR spectrum ของสาหร่าย *Cladophora glomerata* หลังจากการสกัดด้วยวิธี



reflux extraction โดยใช้สารละลายเป็น 85% Ethanol

รูปที่ 55 FTIR spectrum ของสาหร่าย *Cladophora glomerata* ที่สกัดด้วยวิธี

reflux extraction หลังจากการต้มด้วย 4% H_2O_2



รูปที่ 56 FTIR spectrum ของสาหร่าย *Cladophora glomerata* ที่สกัดด้วยวิธี



reflux extraction หลังจากการต้มด้วย 5M NaOH

รูปที่ 57 FTIR spectrum ของสาหร่าย *Cladophora glomerata* ที่สกัดด้วยวิธี

reflux extraction หลังจากการต้มด้วย 5%v/v HCl
3. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสารโดยอาศัยคุณสมบัติทางความร้อน (Thermogravimetric analysis, TGA)

นาโนเซลลูโลส	T ₀ (℃)	T _{max} (℃)	% Char content at 800°C
Soxhlet	339	372.49	7.396
Reflux	321	368.30	6.113

ตารางที่ 6 ค่าความเปลี่ยนแปลงของน้ำหนัก โดยวิธี TGA

4. การวัดค่าความต่างศักย์บนผิวอนุภาค (zeta potential)

ตารางที่ 7 ค่าความต่างศักย์บนผิวอนุภาค

นาโนเซลลูโลส	ค่าความต่า	งศักย์ (zeta pote	ntial: mV)	ค่าเฉลี่ย (mV)
Soxhlet	-48.6	-50.1	-51.6	-50.1
Reflux	-42.6	-34.2	-41.0	-39.3

ภาคผนวก (3) อักขราวิสุทธิ์

Plagiarism Checking Report Created on Apr 12, 2022 at 10:05 AM

Submission Information

ID	SUBMISSION DATE	SUBMITTED BY		ORGANIZATION	FILENAME	STATUS	SIMILARITY INDEX
2502365	Apr 12, 2022 at 10:05 AM	60210162@go.b	uu.ac.th	มหาวิทยาลัย บูรพา	SeniorProject sວນເລ່ນ (1).pdf	Completed	0.86 %
Match Overvi	iew						
NO.	TITLE		AUTHO	DR(S)	SOURCE	SIMILA	RITY INDEX
1	Nanocellulose: Food / Food Safety Aspects	Application and	Winupra	sith, Thunnalin	วารสารพิษวิทยาไ:	ทย	0.86 %

Match Details

TEXT FROM SUBMITTED DOCUMENT

TEXT FROM SOURCE DOCUMENT(S)

1 บทที่ 1 บทน่า 1 ความสาคัญและที่มาของบัญหาเซลลุโลส Cellulose เป็น สารที่ได้มาจากธรรมชาติและเป็นองค์ประกอบที่มีความสาคัญในการทาให้ผนัง เซลล์ของพืชขั้นสูงสาหร่ายสีเขียวราและแบคทีเรียบางชนิดมีความแข็งแรงมาก ขั้นนอกจากนี้ยังสามารถพบเซลลูโลสได้ในสัตว์ทะเลกลุ่ม Urochorata เช่น เพรียงลอยเพรียงสายเซลลูโลสเป็นสารประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ polysaccharides ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของ Dglucose ที่เชื่อมกันเป็นสาย ตรงโดยการเชื่อมกันระหว่างคาร์บอนตาแหน่งที่ 1 be safe towards humans However more information on toxicity of this material is needed to answer safety issue case by case Keywords Nanocellulose Food application Food safety Corresponding author Dr Thunnalin Winuprasith Institute of Nutrition Mahidol University Salaya Phutthamonthon Nakhon Pathom 73170 Email thunnalinwin mahidolacth วารสารพิษวิทยาไทย 2560 32 1 6779 69 1 บทนาเซลลูโลส Cellulose จัดเป็นสารชีวมวล Biomass ที่มีความสาคัญมากซึ่งจะเห็นได้จากอัตรากาลังการผลิตเซลลูโลส และอนพันธ์ของเซลลุโลสทั่วโลกที่มีมากถึงประมาณ 10101011 ตันต่อปี 1 เชลลโลสเป็นสารจากธรรมชาติและเป็นองค์ประกอบที่สาคัญของผนังเชลล์ ของพืชชั้นสูงสาหร่ายสีเขียวราแบคทีเรียบางชนิดเช่น Acetobacterxylinum สัตว์ทะเลในกลุ่ม Urochordata เช่นเพรียงลอยเพรียงสายเพรียงหัวหอมชึง เป็นสัตว์เพียงกลุ่มเดียวที่สร้างเชลลูโลสได้ 2 เชลลูโลสเป็นประเภทสารพอลิ แซ็กคาไรด์ Polysaccharide ที่ประกอบไปด้วยโมเลกุลของกลุโคส Glucose ชนิด Dglucose มาเชื่อมกันต่อเป็นสายโช่ตรงด้วยพันธะไกลโคชิดิก Glycosidic bond ที่คาร์บอนตาแหน่งที่ 1 และตาแหน่งที่ 4 ของโมเลกุล กลุโคสโดยมีสูตรโมเลกุลคือ C 6 H 10 O 5 n เซลลุโลสมีค่าอันดับการพอลิ เมอไรเซชัน Degree of polymerization DP ประมาณ 10 00015 0003 ประกอบกันเป็น Fibrils อย่รวมกันเป็นกลุ่มหรือมัดที่เรียกว่า Fibrous bundle ซึ่งมีส่วนประกอบ 2 ส่วนคือส่วนผลึก Crystalline region และส่วนอสัณฐาน Amorphous region

2 นาโนเซลลุโลส Nanocellulose เป็นสารที่ได้จากการสกัดเซลลุโลสออกมา ด้วยกระบวนการต่างๆได้ออกมาเป็นเซลลุโลสท์มีขนาดโมเลกุลเล็กระดับนาโน โดยนาโนเซลลุโลสจะสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทได้แก่เซลลุโลสนาโน คริสตัล cellulose nanocrystals และเซลลุโลสนาโนไฟบริล cellulose nanofibril ซึ่งทั้ง 2 ประเภทนี้จะมีความแตกต่างกันทั้งในเรื่องของความเป็น ผลึก crystallinity เคมีพื้นผิว surface chemistry และคุณสมบัติเชิงกล mechanical property 1 ปัจจุบันมีการนาผลผลิตที่ได้จากเซลลุโลส

นั้นเป็นสารที่ได้จากการสกัดเซลลูโลสโดยผ่านกระบวนการต่างๆทั้งเคมีและ กายภาพนาโนเซลลูโลสที่ได้จะมีโครงสร้างขนาดเล็กในระดับนาโนสามารถแบ่ง ได้เป็น 2 ประเภทได้แก่เชลลโลสนาโนคริสตัลหรือผลึกนาโนเชลลโลส Cellulose nanocrystals CNCs และเชลลูโลสมาโมไฟบริล Cellulose nanofibril CNFs นาโนเซลลูโลสทั้ง 2 ประเภทนี้มีความแตกต่างกันใน กระบวนการสกัดและการเตรียมทาให้มีความ<mark>เป็นผลึก</mark> Crystallinity เคมีพื้นผิว Surface Chemistry และคุณสมบัติทางกล Mechanical property ที่แตก ต่างกัน 4 เนื่องจากนาโนเซลลูโลส<mark>ม</mark>ีขนาดของเส่นใยอยู่ในระดับนาโนและมี การนามาประยุกต์ใช้ในอาหารเป็นจานวนมากในปัจจุบันจึงมีความตระหนักเกี่ยว กับความปลอดภัย<mark>ที่เ</mark>กี่ยวเนื่องกับคณสมบัติของสารที่อย่ในระดับนาโนเช่นการมี พื้นที่ผิว Specific surface area สูงและความสามารถในการเกิดปฏิกิริยา Reactivity เป็นต้น 5 นักวิจัยจานวนมากให้ความสนใจถึงการทดสอบความพิษ ของนาโน<mark>เซลลูโลส</mark>ทั้งในระดับเซลล์และในสิ่งมีชีวิต 6 7 8 เพื่อยืนยันว่านาโน เซลลโลสมีความปลอดภัยสาหรับการบามาใช้ในอาหารดังนั้นในเอกสารทบทวน วรรณกรรมฉบับนี้มุ่งเน้นถึงการประยุกต์ใช้นาโนเซลลูโลสในอาหารเช่นการใช้ เป็นสารให้ความคงตัวสารทดแทนไขมันเส้นใยอาหารและบรรจุภัณฑ์อาหารรวม ทั้งยังม่งเน้นในเรื่องการทดสอบความปลอดภัยอาหารอีกด้วย 2 นาโนเซลลโลส การทดลองสกัดและเตรียมนาโนเซลลูโลสมีขึ้นเป็นครั้งแรกในปีคริสต์ศักราช 1983 วารสารพิษวิทยาไทย 2560 32 1 6779 70 โดยนักวิจัยชื่อ Turbak และ คณะโดยได้นาเอาเยื่อไม้ Wood pulp มาเป็นวัตถุดิบดั่งต้น 9 หลังจากนั้น เป็นต้นมางานวิจัยเกี่ยว

ภาคผนวก (4)

แบบฟอร์มรายงานการเงิน

รายงานสรุปการเงิน

โครงงานวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การศึกษาคุณสมบัติของนาโนเซลลูโลส จากสาหร่าย Cladophora glomerata

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร. ธันย์ชนก ศิริรักษ์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 10 กรกฎาคม 2564 ถึงวันที่ (วัน/เดือน/ปี) 24 มีนาคม 2565

ระยะเวลาดำเนินการ 7 เดือน ตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี) 10 กรกฎาคม 2564

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 15,000 บาท เมื่อวันที่ 18 มกราคม พ.ศ. 2565

<u>รายจ่าย</u>

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้ (บาท)	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าวัสดุและสารเคมี	10,500	10,500	0
2. ค่าใช้สอย	4,500	4,500	0
รวม	15,000	15,000	0

(ภญ.ดร.ธันย์ชนก ศิริรักษ์) อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิจัย