

## แบบรายงานความก้าวหน้า

## 1. รายละเอียดเกี่ยวกับแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การพัฒนาแผ่นเส้นใยนาโนผสมแอลฟาแมงโกสตินสำหรับต้านจุลชีพในช่องปาก

(ภาษาอังกฤษ) Development of oral antimicrobial nanofiber mats containing  $\alpha$ -mangostin

ชื่อผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร.ธีรศักดิ์ โจรจนาธา

Assoc. Prof. Theerasak Rojanarata, Ph.D.

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

เลขที่ 6 ถ. ราชพรรคาใน อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

โทรศัพท์ 0-3425-5800 โทรสาร 0-3425-5801

Email: rojanarata\_t@su.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย

1. รศ.ดร.ปราณีตโอปนนะโสภิต

Assoc. Prof. PRANEET OPANASOPIT

ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

เลขที่ 6 ถ. ราชพรรคาใน อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

โทรศัพท์ 0-3425-5800 โทรสาร 0-3425-5801

Email: [opanasopit\\_p@su.ac.th](mailto:opanasopit_p@su.ac.th)

2. ผศ.ดร.มนฤดี สุขมา

Assist. Prof. Monrudee Sukma

ภาควิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

เลขที่ 6 ถ. ราชพรรคาใน อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

โทรศัพท์ 0-3425-5800 โทรสาร 0-3425-5801

Email: SUKMA\_M@su.ac.th

ได้รับอนุมัติงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

งบประมาณที่ได้รับ 874,900 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี

เริ่มทำการวิจัยเมื่อ มีนาคม 2558- พฤศจิกายน 2558 (9 เดือน)

## 2. รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

## 2.1 วัตถุประสงค์ของแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย (โดยสรุป)

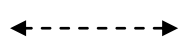
1. เพื่อพัฒนาเส้นใยนาโนที่เตรียมจากไคโตซานและบรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดและสารแอลฟาแมงโกสติน เพื่อพัฒนาเป็นแผ่นฟิล์มที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลชีพในช่องปาก
2. ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของแผ่นปิดฟิล์มที่เตรียมได้
3. ศึกษาฤทธิ์ฆ่าเชื้อ รวมทั้งความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้

2.2 แสดงตารางเปรียบเทียบผลการดำเนินงานตามแผนการดำเนินงานวิจัยที่ได้เสนอไว้กับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการจริง ในรูปของแผนการดำเนินงานตลอดแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย ว่ามีกิจกรรม / ขั้นตอน ปฏิบัติตามลำดับอย่างไร

รายละเอียดกิจกรรม	ความก้าวหน้าของโครงการ / เดือน											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. รวบรวมข้อมูลและจัดซื้อสารเคมี	←-----→											
2. ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการขึ้นรูปเส้นใย	←-----→											
3. เตรียมสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ขึ้นรูปเส้นใยโพลีเอสเตอร์สปีน	←-----→											
4. วิเคราะห์หา % yield และ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ	←-----→											
5. ศึกษาการปลดปล่อยสารจากแผ่นเส้นใย	←-----→											
6. ทดสอบความเป็นพิษ	←-----→											
7. ศึกษาความคงตัว	←-----→											
8. รวบรวมผลและจัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์	←-----→											



แผนงานทั้งโครงการที่วางไว้



ผลการดำเนินงานจนถึงปัจจุบัน

และการดำเนินโครงการทั้งหมดที่ได้ดำเนินการมาแล้วจนถึงปัจจุบัน คิดเป็นร้อยละ 60 ของแผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

2.3 แสดงรายละเอียดของผลการดำเนินงาน พร้อมสรุปและวิเคราะห์ผลที่ได้ดำเนินการไปแล้ว [ทั้งนี้ ให้แนบบทความ ผลงานความก้าวหน้าทางวิชาการของแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย ระหว่างที่ทำการวิจัย ที่เคยพิมพ์ในวารสารทางวิชาการแล้วหรือบทความที่จะนำไปเผยแพร่ทางสื่อมวลชนได้ (ถ้ามี)]

### วิธีการวิจัย

1. ทบทวนวรรณกรรม
2. การสกัดเปลือกมังคุด

ล้างทำความสะอาดเปลือกมังคุด ตัดให้มีขนาดเล็กและทำให้แห้งด้วย hot air oven ที่ 50 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นบดเปลือกมังคุดให้เป็นผงละเอียดด้วย blender และหมักเปลือกมังคุดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ 70 % อะซิโตน และ 95 % เอทานอล เมื่อสกัดเสร็จแล้วทำการกรองด้วยกระดาษกรองภายใต้สภาวะสุญญากาศ และระเหยตัวทำละลายออกด้วย vacuum rotary evaporator จนได้สารสกัดหยาบของเปลือกมังคุดด้วยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด

### 3. การปริมาณสารสำคัญของสารสกัดจากเปลือกมังคุด

#### - ปริมาณแอลฟาแมงโกสติน

หาปริมาณแอลฟาแมงโกสตินโดยใช้เครื่อง HPLC คอลัมน์ VertiSep<sup>®</sup> AQS C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm particle size) และการ์ดคอลัมน์ ตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็นระบบ gradient solvent ของ acetonitrile (A) และ 0.1 % ortho phosphoric acid (B) ด้วยอัตราเร็ว 1 mL/min (Pothitirat et al., 2009) ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ตัวทำละลาย 70 % A เป็นเวลา 15 นาที 70 % A ถึง 75 % A เป็นเวลา 3 นาที 75 % A ถึง 80 % A เป็นเวลา 1 นาที 80 % A เป็นเวลา 6 นาที และ 80 % A ถึง 70 % A เป็นเวลา 1 นาที และมี detector ที่ความยาวคลื่น 320 nm วิเคราะห์เตรียมละลายสารสกัดจากเปลือกมังคุดในเมทานอล 1000 μg/mL คำนวณหาปริมาณแอลฟาแมงโกสตินเทียบกับกราฟมาตรฐานในหน่วย mg/g extract

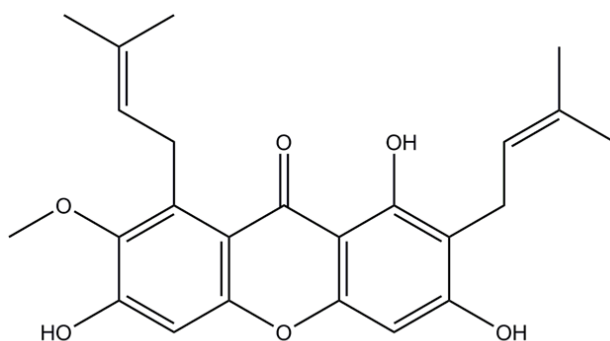
#### - ปริมาณสารประเภท phenolic

วิเคราะห์หาปริมาณสารประเภท phenolic ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer, and Lamuela-Raventós, 1999) โดยเตรียมสารละลายของสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่ความเข้มข้น 0.5 mg/mL นำสารละลายดังกล่าว 25 μL ผสมกับ 10 % Folin-Ciocalteu reagent 1.25 mL และ 7.5 % w/v sodium bicarbonate solution 1 mL และบ่มที่ 45 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารผสมที่ความยาวคลื่น 765 nm คำนวณหาปริมาณสารประเภท phenolic เทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid ในหน่วย milligrams ของ gallic acid equivalents (GAE) ต่อกรัมของสารสกัดจากเปลือกมังคุด

#### - ปริมาณสารประเภท tannin

วิเคราะห์หาสารประเภท tannin ด้วยวิธีตกตะกอนโปรตีน (Silber and Fellman, 2006) Bovine serum albumin ปริมาณ 2 กรัม ผสมกับ 5 mg/mL สารละลายสารสกัดจากเปลือกมังคุด 1 mL เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น centrifuge ที่ 10000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนออก ละลายตะกอนด้วย 4 mL sodium dodecylsulfate และ triethanolamine 4 mL และ 10 mM ferric chloride 1 mL และผสมเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารผสมที่ความยาวคลื่น 510 nm คำนวณหาปริมาณสารประเภท tannin เทียบกับกราฟมาตรฐานของ tannic acid ในหน่วย milligrams ของ tannic acid equivalents (TAE) ต่อกรัมของสารสกัดจากเปลือกมังคุด

ผลการสกัดเปลือกมังคุดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดที่มีค่า dielectric constant แตกต่างกัน คือ 70 % อะซิโตนมีค่า 38.04 ในขณะที่ 95 % เอทานอลมีค่า 27.01 พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วแตกต่างกันไม่ส่งผลต่อผลิตผลของสารสกัดที่ได้ โดยการสกัดด้วย 70 % อะซิโตน และ 95 % เอทานอล ได้ผลิตผล  $19.02 \pm 2.05$  และ  $18.97 \pm 2.69$  % ตามลำดับ สารสกัดที่ได้ประกอบไปด้วยสารประเภท xanthenes ที่มีโครงสร้างเป็น xanthene-9-one ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยมีสารแอลฟาแมงโกสตินเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งใช้เป็น marker ดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่ามีโครงสร้างหลักเป็นวงแหวนอะโรมาติก 3 วงที่แสดงถึงคุณสมบัติความไม่มีขั้ว ดังนั้นแอลฟาแมงโกสตินจึงละลายได้น้อยในน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว นอกจากนี้สารสกัดยังประกอบด้วยสารประเภท phenolic และ tannins



รูปที่ 1 โครงสร้างของแอลฟาแมงโกสติน

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณของแอลฟาแมงโกสตินสารประเภท phenolic และ tannins ในสารสกัดด้วยทำ ทำละลายทั้ง 2 ชนิด พบว่าสารสกัดด้วย 95 % เอทานอลมีปริมาณแอลฟาแมงโกสตินมากกว่าสารสกัดจาก 70 % อะซิโตน 4 เท่า เนื่องจาก 95 % เอทานอลมีค่า dielectric constant น้อยกว่า 70 % อะซิโตน ซึ่งละลาย แอลฟาแมงโกสตินได้มากกว่า นอกจากนั้นแล้วเอทานอลยังช่วยในการทำลายผนังเซลล์ของพืชทำให้สกัด สารสำคัญได้มากขึ้นอีกด้วย ปริมาณสารประเภท phenolic ให้ผลสอดคล้องกับแอลฟาแมงโกสตินโดยพบว่ามี สารสกัดด้วย 95 % เอทานอลมีปริมาณสารประเภท phenolic มากกว่าสารสกัดจาก 70 % อะซิโตน แต่ อย่างไรก็ตามสารประเภท tannins ของสารสกัดด้วย 95 % เอทานอลน้อยกว่าสารสกัดจาก 70 % อะซิโตน ซึ่งเป็นผลมาจากปริมาณน้ำในตัวทำละลาย ปริมาณน้ำของ 70 % อะซิโตน (30 %) มากกว่า 95 % เอทานอล (5 %) ดังนั้นจึงสามารถสกัดสารประเภท tannins ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้มากกว่า

ตารางที่ 1 ปริมาณของแอลฟาแมงโกสตินสารประเภท phenolic และ tannins

Extraction solvent	$\alpha$ -Mangostin (mg/g extracts)	Total phenolic compounds (mg GAE/g extracts)	Total tannins (mg TAE/g extracts)
70 % acetone	36.02 $\pm$ 0.20	437.17 $\pm$ 16.58	226.45 $\pm$ 14.19
95 % ethanol	131.52 $\pm$ 0.65	481.19 $\pm$ 5.51	158.77 $\pm$ 1.08

#### 4. ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

##### 4.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารเดี่ยว

ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* และ *S. sanguinis* ของโคโคโตซาน อิติทีเอ และโคโคโตซาน-อิติทีเอ ด้วยเทคนิค broth dilution เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นที่ต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ละลายสารสกัดจากเปลือกมังคุด โคโคโตซาน อิติทีเอ ใน DMSO 0.5 % acetic acid และ น้ำกลั่น ตามลำดับ ส่วนโคโคโตซาน-อิติทีเอ เตรียมโดยละลายโคโคโตซานและอิติทีเอใน น้ำกลั่นในอัตราส่วน 2:1 โดยน้ำหนัก เจือจางสารละลายดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI ในลักษณะ two fold dilutions จากนั้นเติมสารแขวนตะกอนของเชื้อในปริมาณ  $1-2 \times 10^6$  colony-forming units

(CFU)/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบันทึกค่า MIC หาค่า MBC ด้วยการ spread 100 µL ของสารละลายที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และบ่มอีก 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ลดจำนวนเชื้อลงได้ 99.9 % (Hindler, 2000) บันทึกเป็นค่า MBC การศึกษานี้มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI กับตัวทำละลายเป็น negative control และ ใช้ 0.2 % w/v chlorhexidine เป็น positive control

#### 4.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารผสม

ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารผสมระหว่างโคโตซานกับอีดีทีเอ และโคโตซาน-อีดีทีเอกับสารสกัดจากเปลือกมังคุด ด้วย checkerboard assay (White et al., 1996) โดยผสมสารผสมให้เข้ากันตั้งแต่ความเข้มข้น 1/32 ถึง 4 เท่าของค่า MIC ใน 96 well plates จากนั้นเติมสารแขวนตะกอนของเชื้อในปริมาณ 1–2 × 10<sup>6</sup> CFU/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์เจริญของเชื้อ และคำนวณค่า fractional inhibitory concentration (FIC) ตามสมการที่ 1

$$FIC = FIC_A + FIC_B = \frac{MIC_{A}^{comb}}{MIC_{A}^{alone}} + \frac{MIC_{B}^{comb}}{MIC_{B}^{alone}} \quad \text{Eq. 1}$$

เมื่อ MIC<sub>A</sub><sup>alone</sup> และ MIC<sub>B</sub><sup>alone</sup> คือ ค่า MIC ของ A และ B เมื่อออกฤทธิ์สารเดี่ยวตามลำดับ และ MIC<sub>A</sub><sup>comb</sup> และ MIC<sub>B</sub><sup>comb</sup> คือ ค่า MIC ของ A และ B เมื่อออกฤทธิ์สารผสมตามลำดับ ค่า FIC ≤ 0.5 แสดงว่าเสริมฤทธิ์กัน FIC > 0.5 แสดงว่าต้านฤทธิ์กัน และ FIC อยู่ในช่วง 0.5 ถึง 4 แสดงว่าสารทั้ง 2 ชนิดไม่มีผลต่อกัน

ตารางที่ 2 แสดงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด โคโตซาน EDTA และโคโตซาน-EDTA ต่อเชื้อ *S. mutans* และ *S. sanguinis* แสดงว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ค่า MBC ของสารต่างๆมีค่ามากกว่า MIC 2-4 เท่า แสดงว่าสารมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำ และมีฤทธิ์ต้านฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นสูง สารสกัดจาก 95 % เอทานอลมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด และสามารถเรียงลำดับฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดังนี้ สารสกัดเปลือกมังคุดจาก 95 % เอทานอล > สารสกัดเปลือกมังคุดจาก 70 % อะซิโตน > โคโตซาน-EDTA > EDTA > โคโตซาน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดเปลือกมังคุดจากตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด พบว่า สารสกัดจาก 95 % เอทานอลมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียมากกว่า เนื่องจากมีสาร แอลฟาแมงโกสทินและสารประเภท phenolic มากกว่าสารสกัดจาก 70 % อะซิโตน จึงเลือกใช้สารสกัดจากเปลือกมังคุดด้วยตัวทำละลาย 95 % เอทานอลในการเตรียมเป็นแผ่นเส้นใยนาโนต่อไป กลไกในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นไปได้ของแอลฟาแมงโกสทินคือ ทำลายโครงสร้างของเซลล์เมมเบรนและสารภายในเซลล์รั่วออกมา สารประเภท phenolic รบกวนโครงสร้างของเซลล์เมมเบรนหรือเป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งรบกวนบริเวณส่วนรอยต่อของไขมัน-โปรตีน สารประเภท tannins มีคุณสมบัติฝาดสมานและตกตะกอนโปรตีน ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีน เอนไซม์ และไอออนของโลหะ ซึ่งยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียผ่านขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA และกระบวนการแบ่งเซลล์

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารต่างๆ

Active substances	Susceptibility of active substances to bacteria			
	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )		MBC ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>
70 % acetone GM extract	6.25	3.12	25	12.5
95 % ethanol GM extract	1.56	1.56	6.25	6.25
CS	310	310	1250	625
EDTA	250	250	500	250
CS-EDTA	156	78	310	156

สารผสมระหว่างไคโตซานและ EDTA (ไคโตซาน-EDTA) มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียลำดับที่ 2 โดย EDTA จะมีหมู่ carboxyl ในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไคโตซาน จึงเพิ่มค่าการละลายของไคโตซานในน้ำ นอกจากนั้นแล้ว EDTA ยังเพิ่มฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของไคโตซานโดยลดค่า MIC และ MBC ดังแสดงใน **ตารางที่ 2** ไคโตซานมีประจุบวกจากหมู่อะมิโนซึ่งรบกวนส่วนที่มีประจุลบของเซลล์แบคทีเรีย เช่น N-acetylmuramic acid, sialic acid และ neuraminic acid นอกจากนั้นไคโตซานยังรบกวนการซึมผ่านของสาร และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะ EDTA ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ต้องการไอออนของโลหะ เช่น  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  และ  $\text{Fe}^{2+}$  สารผสมระหว่างไคโตซานและ EDTA มีฤทธิ์เสริมกันต้านเชื้อแบคทีเรียต่อเชื้อ *S. mutans* และ *S. sanguinis* โดยมีค่า FIC น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 (**ตารางที่ 3**) นอกจากนั้นสารผสมระหว่างสารสกัดเปลือกมังคุดจาก 95 % เอทานอลและไคโตซาน-EDTA ยังมีฤทธิ์เสริมกันต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งสอง

ตารางที่ 3 ค่า FIC ของสารผสมในการต้านเชื้อแบคทีเรีย

Antibacterial combination	Bacteria	FIC index	Combination effect
CS + EDTA	<i>S. mutans</i>	0.3	synergy
CS + EDTA	<i>S. sanguinis</i>	0.5	synergy
CS-EDTA + GM extract	<i>S. mutans</i>	0.5	synergy
CS-EDTA + GM extract	<i>S. sanguinis</i>	0.5	synergy

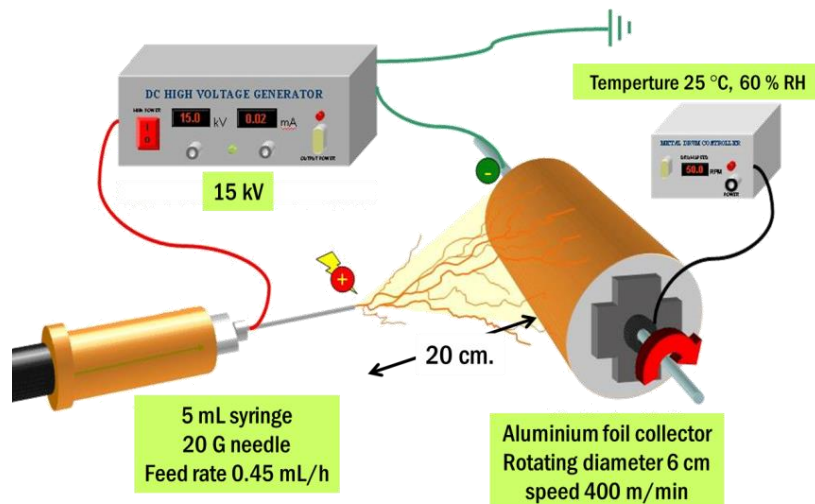
### 5. การสังเคราะห์ไทโอเลตไคโตซาน

สังเคราะห์ไทโอเลตไคโตซานด้วยวิธีตามการสังเคราะห์ chitosan-N-acetyl cysteine conjugate (Schmitz, 2008) โดยละลายไคโตซาน 500 mg ในสารละลาย 1 % v/v HCl และปรับให้มีค่า pH 5 ด้วย 2 N NaOH จากนั้นเติมสารละลาย 4 g ของ cysteine ในน้ำ 50 mL ที่มีการกระตุ้นหมู่ carboxylic acid ด้วย 150 mM EDAC เป็นเวลา 20 นาทีลงในสารละลายไคโตซาน ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 4-5 และผสมกับเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาทำการ dialysis ด้วย 1 mM HCl และ 1 % w/w NaCl เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำให้แห้งด้วย freeze dryer ที่อุณหภูมิ  $-49^{\circ}\text{C}$  และความดัน 0.07-0.09 bar

วิเคราะห์หาปริมาณหมู่ไทออลของไทโอเลตโคโตซานด้วย ellman's reagent ซึ่งเตรียมโดยละลาย DTNB 4 mg ใน 1 mL ของ phosphate buffer pH 8 และ 1 mM EDTA จากนั้นผสม ellman's reagent 50  $\mu$ L, 2.5 mL 0.1 M phosphate buffer pH 8 และ 1 mM EDTA กับสารละลายมาตรฐาน cysteine หรือไทโอเลตโคโตซาน 250  $\mu$ L ผสมสารผสมต่างๆเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm คำนวณหาปริมาณหมู่ไทออลเทียบกับกราฟมาตรฐานของ cysteine

#### 6. การเตรียมแผ่นเส้นใยนาโนผสมสารสกัดจากเปลือกมังคุดและแอสฟาแมงโกสทิน

เตรียมสารละลาย 2 % w/v โคโตซานและไทโอเลตโคโตซาน โดยละลายกับ EDTA ในอัตราส่วน 2:1 โดยน้ำหนักระหว่างโคโตซานและไทโอเลตโคโตซานต่อ EDTA และเตรียมสารละลาย 10 % PVA โดยละลาย PVA ในน้ำที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นผสมสารละลาย 2 % w/v โคโตซานหรือไทโอเลตโคโตซาน กับสารละลาย 10 % PVA ในอัตราส่วน 30:70 โดยน้ำหนัก เติมสารสกัดจากเปลือกมังคุดและแอสฟาแมงโกสทินลงในสารละลายโคโตซาน/PVA หรือไทโอเลตโคโตซาน/PVA ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยผสมกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ประเมินความหนืด ค่าการนำไฟฟ้า และแรงตึงผิว ก่อนเตรียมเป็นเส้นใยนาโนด้วยกระบวนการ electrospinning



บรรจุสารละลาย electrospinning ลงในกระบอกฉีดยา 5 mL ที่เชื่อมต่อกับเข็มฉีดยาเบอร์ 20 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 0.9 mm และภายใน 0.6 mm ให้ศักย์ไฟฟ้า 15 kV โดยหัวบวกอยู่ที่บริเวณปลายเข็ม และหัวลบที่ส่วนรองรับที่หุ้มด้วยฟอยล์อะลูมิเนียม ส่วนรองรับมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 cm และหมุนด้วยความเร็ว 400 m/min ระยะห่างระหว่างปลายเข็มถึงส่วนรองรับ 20 cm และให้สารละลายเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็ว 0.45 mL/h ในขณะที่เตรียมเส้นใยนาโนควบคุมให้มีอุณหภูมิ 25 °C และความชื้น 60 %RH

#### 7. ศึกษาคุณลักษณะของแผ่นเส้นใยนาโนผสมสารสกัดจากเปลือกมังคุดและแอสฟาแมงโกสทิน

ศึกษาลักษณะรูปร่างของแผ่นเส้นใยนาโนด้วย SEM โดยตัดแผ่นเส้นใยให้มีขนาดเล็ก ติดบนแผ่นอะลูมิเนียม จากนั้นเคลือบทองและส่องด้วยกล้อง SEM วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยที่เตรียมได้โดยใช้โปรแกรม image analysis software ทำการวัด 50 ครั้ง

โคโตซาน ไทโอเลตโคโตซาน และ PVA มีคุณสมบัติยึดติดเมื่อเปียก จึงนำมาใช้เตรียมเป็นแผ่นเส้นใยนาโน ไทโอเลตโคโตซานที่ได้จากการสังเคราะห์มีหมู่ไทออล  $469.75 \pm 2.82 \mu\text{mol}$  ต่อกรัมของพอลิเมอร์

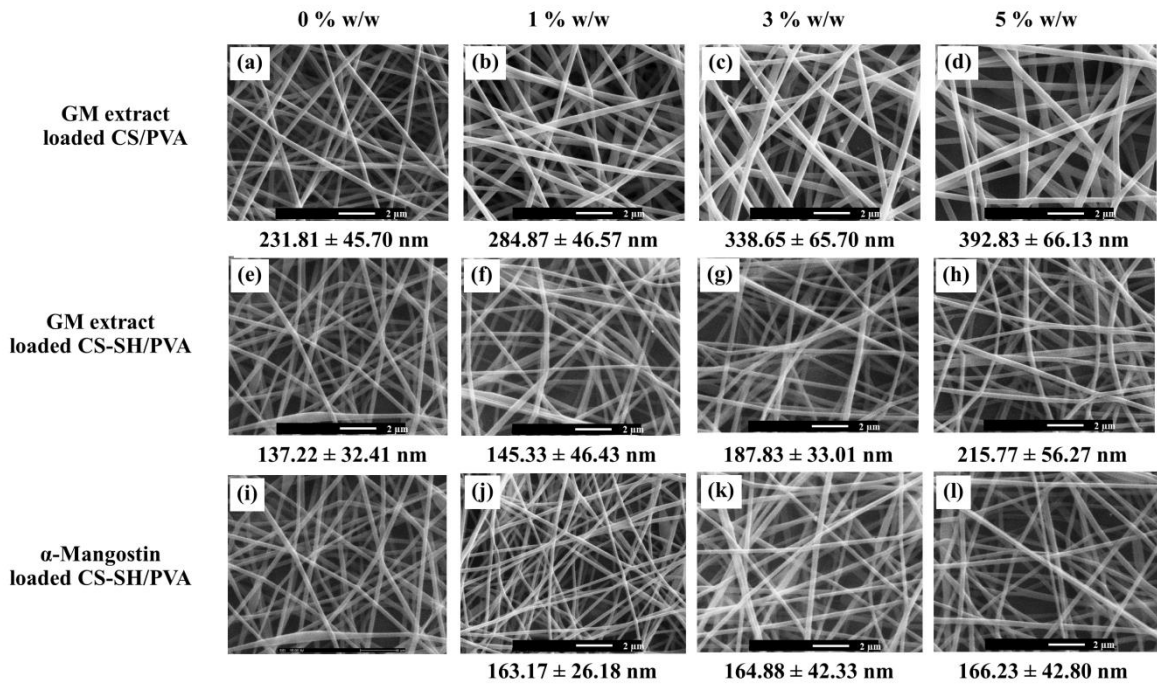
สารละลายไคโตซาน/PVA และไทโอเลตไคโตซาน/PVA เมื่อเติมสารสกัดจากเปลือกมังคุดหรือแอลฟาแมงโกสตินที่มีปริมาณแอลฟาแมงโกสตินที่ 0, 1, 3 และ 5 % w/w แอลฟาแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์ มีคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ ความหนืด ค่าการนำไฟฟ้า และแรงตึงผิว ดังแสดง**ตารางที่ 4**

**ตารางที่ 4** ค่าความหนืด ค่าการนำไฟฟ้า และแรงตึงผิวของสารละลายไคโตซาน/PVA และไทโอเลตไคโตซาน/PVA เมื่อเติมสารสกัดจากเปลือกมังคุดหรือแอลฟาแมงโกสติน

Solution (%w/w $\alpha$ - mangostin)	Viscosity (mPas)			Conductivity ( $\mu$ S/cm)			Surface tension (mN/m)		
	GM extract		$\alpha$ -mangostin	GM extract		$\alpha$ -mangostin	GM extract		$\alpha$ -mangostin
	CS/PVA	CS-SH/PVA	CS-SH/PVA	CS/PVA	CS-SH/PVA	CS-SH/PVA	CS/PVA	CS-SH/PVA	CS-SH/PVA
0	164.5 $\pm$ 1.6	230.4 $\pm$ 0.7	230.4 $\pm$ 0.7	867.3 $\pm$ 52.3	2363.2 $\pm$ 55.1	2363.3 $\pm$ 55.1	55.2 $\pm$ 0.9	54.5 $\pm$ 1.2	54.5 $\pm$ 1.2
1	181.3 $\pm$ 1.2	232.1 $\pm$ 3.2	242.3 $\pm$ 0.6	779.0 $\pm$ 20.1	1933.0 $\pm$ 16.5	2260.0 $\pm$ 20.0	54.3 $\pm$ 0.6	49.4 $\pm$ 0.1	57.2 $\pm$ 0.6
3	191.9 $\pm$ 4.6	253.2 $\pm$ 0.7	252.9 $\pm$ 3.2	798.7 $\pm$ 38.2	1855.3 $\pm$ 24.4	2220.0 $\pm$ 43.6	47.1 $\pm$ 1.9	46.6 $\pm$ 0.1	58.4 $\pm$ 0.1
5	190.3 $\pm$ 0.5	267.1 $\pm$ 0.7	265.9 $\pm$ 3.3	811.3 $\pm$ 7.6	1773.0 $\pm$ 9.5	1998.0 $\pm$ 149.3	45.0 $\pm$ 0.8	44.5 $\pm$ 0.1	58.3 $\pm$ 0.1

ไทโอเลตไคโตซานมีความหนืดและค่าการนำไฟฟ้ามากกว่าไคโตซาน ทำให้ค่าดังกล่าวของสารละลายไทโอเลตไคโตซาน/PVA มากกว่าสารละลายไคโตซาน/PVA โดยที่ค่าแรงตึงผิวไม่แตกต่างกัน ความหนืดและค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายส่งผลต่อรูปร่างและขนาดของแผ่นเส้นใยนาโน ดังแสดงใน**รูปที่ 2** สารละลายไทโอเลตไคโตซาน/PVA มีค่าการนำไฟฟ้าและความหนืดมากกว่าสารละลายไคโตซาน/PVA 3 และ 2 เท่า ตามลำดับ ดังนั้นผลของค่าการนำไฟฟ้าจึงเด่นกว่าความหนืด พบว่าแผ่นเส้นใยนาโนเปล่าของไทโอเลตไคโตซาน/PVA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าแผ่นเส้นใยนาโนเปล่าของไคโตซาน/PVA (รูปที่ 2 (a) และ (e)) เมื่อเติมสารสกัดจากเปลือกมังคุดและแอลฟาแมงโกสตินลงในสารละลายไคโตซาน/PVA และไทโอเลตไคโตซาน/PVA ทำให้ความหนืดเพิ่มขึ้นและค่าการนำไฟฟ้าลดลง จึงส่งผลให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโนใหญ่ขึ้นเมื่อเติมสารสกัดจากเปลือกมังคุดและแอลฟาแมงโกสตินเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามแผ่นเส้นใยนาโนที่เตรียมได้ยังคงมีเส้นใยขนาดใหญ่ขนาดเล็กและอยู่ในช่วงนาโนเมตร โดยไม่มีผลึกของสารสกัดจากเปลือกมังคุดหรือแอลฟาแมงโกสตินในแผ่นเส้นใยดังกล่าว

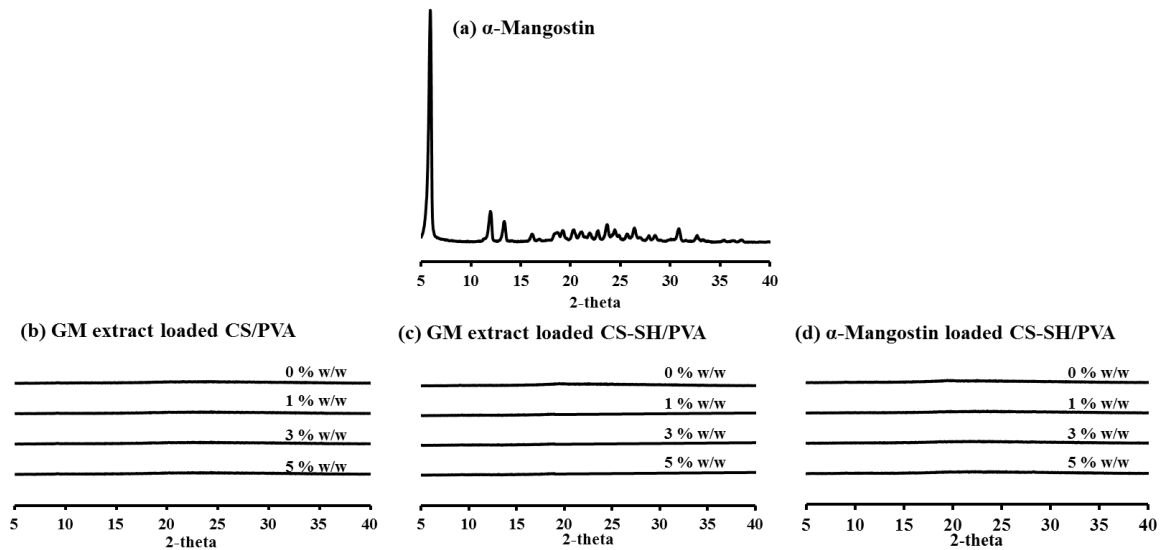




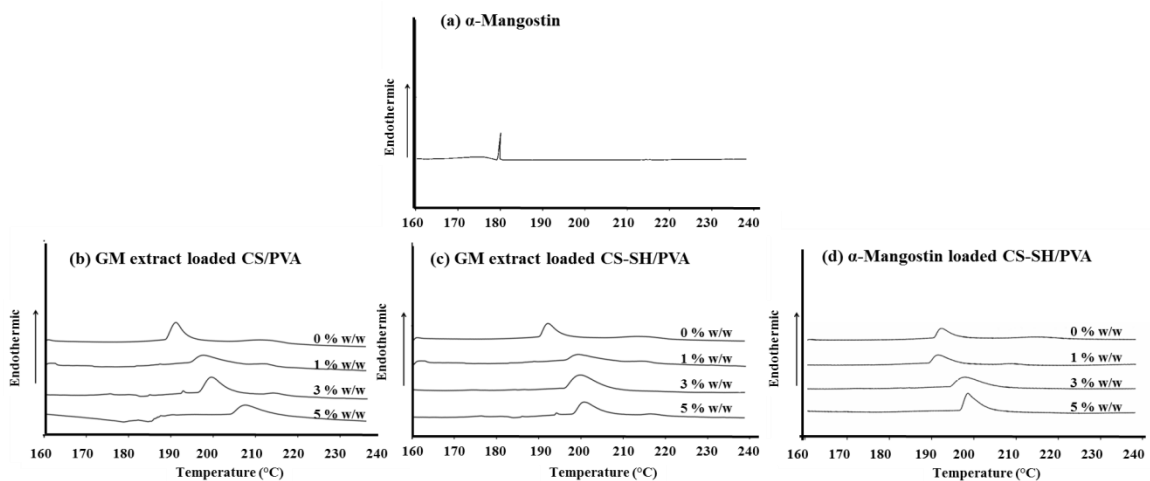
รูปที่ 2 รูปร่างลักษณะจาก SEM (5000x) และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นเส้นใยนาโนที่มีปริมาณแอลฟาแมงโกสตินที่ 0, 1, 3 และ 5 % w/w

รูปที่ 3 แสดงการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของแอลฟาแมงโกสตินและแผ่นเส้นใยนาโน แอลฟาแมงโกสติน มีพีคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์จำนวนมาก ซึ่งบ่งบอกถึงการจัดเรียงตัวแบบผลึกของสาร แผ่นเส้นใยนาโนเปล่ามีการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์แบบ halo ซึ่งแสดงถึงการจัดเรียงตัวรูปอสัณฐานของแผ่นเส้นใยนาโน นอกจากนั้นแล้วแผ่นเส้นใยนาโนที่เติมแอลฟาแมงโกสตินปริมาณต่างๆ ยังมีการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์แบบ halo โดยไม่พบพีคการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของแอลฟาแมงโกสติน ซึ่งแสดงถึงการจัดเรียงตัวรูปอสัณฐานของแอลฟาแมงโกสตินในแผ่นเส้นใยนาโน แอลฟาแมงโกสตินเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวจากรูปผลึกไปเป็นอสัณฐาน

การศึกษาคุณสมบัติการเปลี่ยนแปลงความร้อน หรือ DSC ช่วยสนับสนุนผลของการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ รูปที่ 3 แสดงคุณสมบัติการเปลี่ยนแปลงความร้อนของแอลฟาแมงโกสตินและแผ่นเส้นใยนาโน แอลฟาแมงโกสตินและแผ่นเส้นใยนาโนเปล่าดูดความร้อนที่อุณหภูมิ 180 และ 192 °C ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงจุดหลอมเหลวของสาร เมื่อเติมแอลฟาแมงโกสตินลงในแผ่นเส้นใยนาโน ทำให้จุดหลอมเหลวของแผ่นเส้นใยนาโนเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณของแอลฟาแมงโกสตินที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 192 ถึง 209 °C เนื่องมาจากการเกิดอันตรกิริยาระหว่างแอลฟาแมงโกสตินและพอลิเมอร์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจุดหลอมเหลว แต่อย่างไรก็ตามแผ่นเส้นใยนาโนดังกล่าวปราศจากจุดหลอมเหลวของแอลฟาแมงโกสติน ซึ่งบ่งบอกว่าแอลฟาแมงโกสตินในแผ่นเส้นใยนาโนเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวจากรูปผลึกไปเป็นอสัณฐาน ซึ่งให้ผลการทดลองสอดคล้องกับผลการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์



รูปที่ 3 การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของแอลฟาแมงโกสตินและแผ่นเส้นใยนาโนที่มีปริมาณแอลฟาแมงโกสตินที่ 0, 1, 3 และ 5 % w/w



รูปที่ 4 คุณสมบัติการเปลี่ยนแปลงความร้อนของแอลฟาแมงโกสตินและแผ่นเส้นใยนาโนที่มีปริมาณแอลฟาแมงโกสตินที่ 0, 1, 3 และ 5 % w/w

ค่า tensile strength ของแผ่นเส้นใยนาโนแสดงถึงคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นเส้นใยนาโน (ตารางที่ 5) โดยอยู่ในช่วง 4.24 ถึง 5.22 MPa การเติมหมู่ cysteine ให้โคโตซานจะลดคุณสมบัติเชิงกล ทำให้แผ่นเส้นใยนาโนของแผ่นไทโอเลตโคโตซาน/PVA มีค่า tensile strength น้อยกว่าแผ่นเส้นใยนาโนของโคโตซาน/PVA นอกจากนี้แล้วการเติมสารสกัดจากเปลือกมังคุดหรือแอลฟาแมงโกสตินทำให้ค่า tensile strength ลดลง เนื่องจากรบกวนสารของพอลิเมอร์ในแผ่นเส้นใยนาโน แต่อย่างไรก็ตามค่า tensile strength เพียงพอต่อการเก็บรักษาและการขนส่งแผ่นเส้นใยนาโน

ตารางที่ 5 tensile strength ของแผ่นเส้นใยนาโนที่มีแอลฟาแมงโกสติน 0, 1, 3 และ 5 % w/w

nanofiber mats (% w/w α-mangostin)	Tensile strength (MPa)		
	GM extract-loaded CS/PVA	GM extract-loaded CS- SH/PVA	α-Mangostin-loaded CS- SH/PVA
0	5.22 ± 0.72	4.60 ± 0.36	4.60 ± 0.36
1	5.21 ± 0.47	4.26 ± 0.24	4.60 ± 0.34
3	4.93 ± 0.56	4.44 ± 0.31	4.24 ± 0.26
5	4.42 ± 0.53	4.32 ± 0.23	4.30 ± 0.41

8. ประเมินแผ่นเส้นใยนาโนผสมสารสกัดจากเปลือกมังคุดและแอลฟาแมงโกสติน

8.1 ปริมาณสารสกัดจากเปลือกมังคุด

ละลายแผ่นเส้นใยนาโน 1 mg ใน 1 mL ของเมทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาแมงโกสตินในแผ่นเส้นใยนาโนด้วย HPLC และคำนวณหาค่า loading efficacy (%) และ loading capacity (%) ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด ดังสมการที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

$$\text{Loading efficacy (\%)} = \left( \frac{L_a}{L_t} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

$$\text{Loading capacity (\%)} = \left( \frac{L_a}{W} \right) \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

เมื่อ  $L_a$  คือ ปริมาณแอลฟาแมงโกสตินที่มีในแผ่นเส้นใยนาโนที่วิเคราะห์ได้  $L_t$  คือ ปริมาณ แอลฟาแมงโกสตินที่มีในแผ่นเส้นใยนาโนตามทฤษฎี  $W$  คือ น้ำหนักของแผ่นเส้นใยนาโน

ปริมาณสารสกัดจากเปลือกมังคุดและแอลฟาแมงโกสตินในแผ่นเส้นใยนาโนแต่ละชนิดแสดงในปริมาณของแอลฟาแมงโกสติน ซึ่งใช้เป็น marker ตารางที่ 6 แสดงค่า loading efficiency (%) และ loading capacity (%) ของแอลฟาแมงโกสตินในแผ่นเส้นใยนาโนชนิดต่างๆ loading efficiency ของแอลฟาแมงโกสตินอยู่ในช่วง 60 ถึง 80 % เนื่องจากแอลฟาแมงโกสตินและสารประเภท phenolic ละลายได้น้อยในน้ำ อาจตกตะกอนระหว่างกระบวนการ electrospinning อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณสารสกัดจากเปลือกมังคุดและแอลฟาแมงโกสตินทำให้ปริมาณแอลฟาแมงโกสตินในแผ่นเส้นใยนาโนเพิ่มขึ้น จากผลการทดลองระบุได้ว่า สารสกัดจากเปลือกมังคุดและแอลฟาแมงโกสตินมีความคงตัวหลังจากกระบวนการ electrospinning ภายใต้อากาศไฟฟ้าสูง loading capacity ของแอลฟาแมงโกสตินในแผ่นเส้นใยนาโนอยู่ในช่วง 0.65 ถึง 3.65 %

ตารางที่ 6 loading efficiency และ loading capacity ของแอลฟาแมงโกสตินในแผ่นเส้นใยนาโนที่มีแอลฟาแมงโกสติน 0, 1, 3 และ 5 % w/w

nanofiber mats (% w/w $\alpha$ -mangostin)	Loading efficiency (%)			Loading capacity (%)		
	GM extract-loaded CS/PVA	GM extract-loaded CS-SH/PVA	$\alpha$ -Mangostin-loaded CS-SH/PVA	GM extract-loaded CS/PVA	GM extract-loaded CS-SH/PVA	$\alpha$ -Mangostin-loaded CS-SH/PVA
1	70.27 $\pm$ 1.38	69.75 $\pm$ 0.76	65.97 $\pm$ 0.16	0.65 $\pm$ 0.01	0.65 $\pm$ 0.01	0.65 $\pm$ 0.01
3	74.94 $\pm$ 0.03	61.86 $\pm$ 0.05	61.76 $\pm$ 0.03	1.83 $\pm$ 0.01	1.51 $\pm$ 0.01	1.80 $\pm$ 0.01
5	79.68 $\pm$ 0.13	73.10 $\pm$ 0.50	76.72 $\pm$ 0.17	2.89 $\pm$ 0.01	2.65 $\pm$ 0.02	3.65 $\pm$ 0.01

## 8.2 การพองตัว

แช่แผ่นเส้นใยนาโนลงในสารละลายน้ำลายเทียม pH 6.8 ที่ประกอบด้วย 2.38 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.19 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  และ 8.0 g NaCl ละลายในน้ำ 1 ลิตร ที่ปรับให้มี pH 6.8 ด้วย phosphoric acid ปริมาตร 2 mL ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหาร้อยละการพองตัวของแผ่นเส้นใยนาโนตามสมการที่ 4

$$\text{Degree of swelling (\%)} = \frac{(M - M_d)}{M_d} \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

เมื่อ M คือ น้ำหนักของแผ่นเส้นใยนาโนหลังจากศึกษาการพองตัว และ  $M_d$  คือ น้ำหนักของแผ่นเส้นใยนาโนก่อนจากการพองตัว

## 8.3 การยึดติดเยื่อเมือก

ตัดแผ่นเส้นใยนาโนขนาด 10 × 10 mm ติดบน probe ของเครื่อง texture analyzer จากนั้นทดสอบการยึดติดเยื่อเมือกกระพุ้งแก้มหนู ซึ่งแช่อยู่ใน Kreb's buffer (1.8 g glucose, 0.0468 g  $\text{MgCl}_2$ , 0.34 g KCl, 7.0 g NaCl, 0.1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  และ 0.18 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ละลายในน้ำ 1 ลิตร ก่อนทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 37  $\pm$  0.5 °C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อทำการทดสอบวางกระพุ้งแก้มหนูบน holder และเติมสารละลายน้ำลายเทียม 500  $\mu\text{L}$  เป็นเวลา 1 นาที probe ที่ติดกับแผ่นเส้นใยนาโนจะเคลื่อนที่ลงมาและสัมผัสกับกระพุ้งแก้มหนูด้วยแรง 3 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นดึง probe และแผ่นเส้นใยนาโนออก วัดแรงดึงดังกล่าวให้เป็นแรงในการยึดติดเยื่อเมือก

การพองตัวเป็นคุณสมบัติที่สำคัญสำหรับการยึดติดเยื่อเมือก โดยแผ่นเส้นใยนาโนจะเปียก แตกตัวพองตัวที่เยื่อเมือก และยึดติดเยื่อเมือก ตารางที่ 7 แสดงการพองตัวของแผ่นเส้นใยนาโนที่มีแอลฟาแมงโกสติน 0, 1, 3 และ 5 % w/w แผ่นเส้นใยนาโนเปล่าให้การพองตัวสูงกว่าแผ่นเส้นใยนาโนที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกมังคุดและแอลฟาแมงโกสติน โดยเมื่อเติมสารสกัดจากเปลือกมังคุดและแอลฟาแมงโกสตินมากขึ้นการพองตัวจะลดลง สาเหตุจากไคโตซาน ไทโอเลตไคโตซาน และ PVA เป็นพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ ซึ่งพองตัวอย่างรวดเร็วทำให้การพองตัวสูง นอกจากนั้นแผ่นเส้นใยนาโนเปล่าของไทโอเลตไคโตซาน/PVA พองตัวมากกว่าแผ่นเส้นใยนาโนเปล่าของไคโตซาน/PVA แสดงว่าการเติมหมู่ cysteine ของไคโตซาน เพิ่มคุณสมบัติการพองตัวของพอลิเมอร์ การเติมสารสกัดจากเปลือกมังคุดและแอลฟาแมงโกสตินซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำทำให้คุณสมบัติไม่ชอบ

น้ำของแผ่นเส้นใยนาโนเพิ่มขึ้น จึงทำให้การพองตัวลดลง อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาคุณสมบัติการยึดติดเยื่อเมือกไม่แปรผันกับการพองตัว คุณสมบัติการยึดติดเยื่อเมือกขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิเมอร์ แรงยึดติดเยื่อเมือกของแผ่นเส้นใยนาโนของไทโอเลตโคโตซาน/PVA (22 กรัม) มากกว่าแผ่นเส้นใยนาโนของโคโตซาน/PVA (11 กรัม) (ตารางที่ 7) เนื่องจากคุณสมบัติการยึดติดเยื่อเมือกของไทโอเลตโคโตซานมากกว่าโคโตซาน โดยไทโอเลตโคโตซานมีหมู่ไทออลที่เกิด disulphide bonds กับ หมู่ cysteine ของ mucus glycoprotein ในการยึดติดเยื่อเมือก พันธะโควาเลนต์นี้มีแรงยึดติดเยื่อเมือกมากกว่าพันธะที่ไม่ใช่โควาเลนต์ของโคโตซาน และ PVA โดยทั่วไปโคโตซาน และ PVA มีพันธะไฮโดรเจน และแรงทางไฟฟ้าสถิต ในการยึดติดเยื่อเมือก ดังนั้น ไทโอเลตโคโตซานจึงมีประโยชน์ในการยึดติดเยื่อเมือก นอกจากนี้การบรรจุสารสกัดจากเปลือกมังคุดและแอลฟาแมงโกสทินไม่ลดแรงยึดติดเยื่อเมือก โดยมีแรงยึดติดเยื่อเมือกคงที่ เมื่อเติมสารสกัดจากเปลือกมังคุดและแอลฟาแมงโกสทินตั้งแต่ 1 ถึง 5 % w/w

**ตารางที่ 7** การพองตัวและการยึดติดเยื่อเมือกของแผ่นเส้นใยนาโนที่มีแอลฟาแมงโกสทิน 0, 1, 3 และ 5 % w/w

nanofiber mats (% w/w $\alpha$ -mangostin)	Degree of swelling (%)			Mucoadhesive force (g)		
	GM extract-loaded CS/PVA	GM extract-loaded CS-SH/PVA	$\alpha$ -Mangostin-loaded CS-SH/PVA	GM extract-loaded CS/PVA	GM extract-loaded CS-SH/PVA	$\alpha$ -Mangostin-loaded CS-SH/PVA
0	124.4 ± 25.7	195.7 ± 11.9	195.7 ± 11.9	11.58 ± 0.28	22.62 ± 0.04	22.62 ± 0.04
1	105.0 ± 7.0	76.3 ± 9.4	160.3 ± 18.4	11.52 ± 0.15	22.49 ± 0.11	22.45 ± 0.21
3	90.4 ± 16.9	67.2 ± 12.6	80.1 ± 29.6	11.56 ± 0.08	22.55 ± 0.07	22.49 ± 0.14
5	53.9 ± 24.4	54.5 ± 7.0	69.5 ± 21.4	11.54 ± 0.03	22.56 ± 0.04	22.49 0.07

#### 8.4 การปลดปล่อยสารสกัดจากเปลือกมังคุด

ทดสอบการปลดปล่อยสารสกัดจากเปลือกมังคุดออกจากแผ่นเส้นใยนาโนในตัวทำละลายผสมระหว่างสารละลายน้ำลายเทียมและเมทานอล 50:50 โดยตัดแผ่นให้มีน้ำหนัก 10 mg และทำการทดสอบการปลดปล่อยในตัวกลาง 10 mL ที่อุณหภูมิ 37 ± 0.5 °C และแรงเขย่า 150 rpm สุ่มสารละลายที่เวลาต่างๆ และวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาแมงโกสทินด้วย HPLC

กำลังทำการทดลอง

#### 8.5 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

หาค่า MIC และ MBC ของแผ่นเส้นใยนาโนต่อเชื้อ *S. mutans* และ *S. sanguinis* โดยชั่งน้ำหนักแผ่นตั้งแต่ 0.1 ถึง 5 mg/mL เติมลงในสารแขวนตะกอนของเชื้อแบคทีเรีย ทำการทดสอบตามหัวข้อ 4

ศึกษาอัตราเร็วในการต้านเชื้อแบคทีเรียของแผ่นเส้นใยนาโนโดย time kill assay ในสารแขวนตะกอนของเชื้อแบคทีเรีย 1–2 × 10<sup>6</sup> CFU/mL โดยตัดแผ่นเส้นใยนาโนให้มีน้ำหนักเท่ากับค่า MBC ของแผ่นเส้นใยนาโนเปล่าและเติมลงในสารแขวนตะกอนของเชื้อแบคทีเรีย สุ่มสารแขวนตะกอนของเชื้อที่เวลา 0, 30, 60, 120, 180 และ 240 นาที เจือจาง และ spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BHI บ่มอุณหภูมิ 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาปริมาณของเชื้อที่ลดลงเมื่อมีแผ่นเส้นใยนาโนที่เวลาต่างๆ

กำลังทำการทดลอง

## 8.6 ความเป็นพิษต่อเซลล์

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากเปลือกแอลฟาแมงโกสตินและแผ่นเส้นใยนาโนต่อเซลล์ HGF และ HaCaT เซลล์ทั้งสองชนิดเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ร่วมกับ 10 % FBS, 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin และ 5 µg/mL amphotericin B ที่ 37 °C และ 5 % CO<sub>2</sub> ขณะที่สารสกัดจากเปลือกมังคุด แอลฟาแมงโกสตินและแผ่นเส้นใยนาโนทำให้ปราศจากเชื้อภายใต้แสง UV เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายสารสกัดจากเปลือกมังคุด และแอลฟาแมงโกสตินลงในเซลล์ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 1 µg/mL บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนแผ่นเส้นใยนาโนบ่มเป็นระยะเวลา 15, 30, 60, 120 และ 240 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว วัดความมีชีวิตของเซลล์โดย MTT assay ซึ่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ความมีชีวิตของเซลล์เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติซึ่งคิดเป็น 100 % นอกจากนี้แล้วทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ระยะยาวของแผ่นเส้นใยนาโน โดยเมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer pH 7.4 จากนั้นเติม serum free medium ทำการบ่มอีกเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และหาค่าความมีชีวิตของเซลล์ ณ เวลาดังกล่าว

กำลังทำการทดลอง

2.4 ระบุรายละเอียดที่ได้แก้ไขปรับปรุงตามข้อเสนอแนะของผู้ประเมิน (ถ้ามี) –

2.5 งานตามแผนงานวิจัย / โครงการวิจัยที่จะทำต่อไป

ทำได้ตามแผนงานวิจัย

งานที่จะทำต่อคือ

- ทดสอบความเป็นพิษ
- ศึกษาความคงตัว

2.6 คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหาและหรืออุปสรรค (ถ้ามี) เนื่องจากยังเหลืองานวิจัยอีก 40 % จึงขอขยายเวลาออกไปอีก 6 เดือน

(ลงชื่อ) .....

(รศ.ดร.ธีรศักดิ์ โรจนราธา)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 25 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2558

## ผลการประเมินรายงานความก้าวหน้าของแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย

### สรุปความเห็นของการประเมิน

เห็นควรสนับสนุนให้ดำเนินการต่อไป

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม .....

.....

(ลายเซ็น)

(.....)

หัวหน้าส่วนราชการ

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

หมายเหตุ : แบบฟอร์มนี้ใช้สำหรับข้อเสนอการวิจัยทั้งแผนงานวิจัยและโครงการวิจัย