รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาเจลไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกมังคุด สำหรับแผลในปาก

Development of thermosensitive gel containing hull of mangosteen fruit extract for mouth ulcer

ภก.ผศ.ดร.ณัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒

รหัสโครงการ 23416
สัญญาเลขที่ ๑๐/๒๕๖๒

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการ การพัฒนาเจลไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกมังคุด สำหรับแผลในปาก
Development of thermosensitive gel containing hull of mangosteen fruit extract for mouth ulcer

ภก.ผศ.ดร.ณัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยนี้ และสนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย รวมทั้งสถานที่ทำการวิจัย ขอขอบคุณ นางสาว อารีรัตน์ ศรีพัฒนพร ที่ช่วยทำวิจัยในส่วนของฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและความเป็นพิษต่อเซลล์ ขอขอบคุณ นาย กฤตภัค ธัญญามโนรถ นาย อภิชาต มนัสเกษมศักดิ์ และนางสาว ณัฐพร ถาวรคุณ ที่มาช่วยงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่เอื้อเฟื้อ อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัยในครั้งนี้

ผู้ทำวิจัย

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ข้าพเจ้า ภก.ผศ.ดร. ณัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย
จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล
(งบประมาณแผ่นดิน)
มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง
(ภาษาไทย) การพัฒนาเจลไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกมังคุดสำหรับแผลในปาก
(ภาษาอังกฤษ) Development of thermosensitive gel containing hull of mangosteen fruit extract for mouth ulcer
รหัสโครงการ .... 23416..... / สัญญาเลขที่...10/2562.....ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 606,200 บาท
(หกแสนหกพันสองร้อยบาทถ้วน)
ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี 6 เดือน
ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2561 ถึง 31 มีนาคม 2563

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย การพัฒนาเจลไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกมังคุดสำหรับแผลในปาก

หัวหน้าผู้วิจัย ภก.ผศ.ดร.ณัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์

ระยะเวลาโครงการ 1 ปี 6 เดือน

บทคัดย่อ

สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 สามารถใช้รักษาภาวะติดเชื้อ *Candida albicans* ในช่องปาก ซึ่งวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการพัฒนาสูตรตำรับเจลไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลโดยใช้พอลิเมอร์ที่สามารถก่อเจลที่อุณหภูมิในช่องปากได้คือ poloxamer 407 (PLX407) พอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติช่วยในการยึดติดเนื้อเยื่อในตำรับเช่น ไคโตซาน (CS) และ สารสกัดจากเปลือกมังคุด (EX) การเตรียมตำรับมีส่วนประกอบไปด้วย PLX407 ร้อยละ 18 และ CS ร้อยละ 2 ในอัตราส่วน 9:1 และ EX 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ประเมินคุณสมบัติของตำรับเจลประกอบไปด้วย การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในการก่อเจล คุณสมบัติทางกายภาพ การปลดปล่อยสารสำคัญ ความหนืด คุณสมบัติในการยึดติดเนื้อเยื่อ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และ ฤทธิ์การฆ่าเชื้อ *Candida albicans* โดยตำรับที่เตรียมได้มีค่า pH อยู่ในช่วง 3.44 ถึง 6.87 อุณหภูมิในการก่อเจลอยู่ในช่วง 35.5-37.5 องศาเซลเซียส คุณสมบัติในการปลดปล่อยของตำรับใกล้เคียงกับปฏิกิริยาอันดับศูนย์ (zero order kinetics) ของสูตร PLX : EX (R^2 = 0.9365) และปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง (first order kinetic) ของสูตร PLX : CS : EX (R^2 = 0.9863) และตำรับเจลยังคงมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ตำรับเจลมีความปลอดภัยต่อเซลล์ไฟโบบลาสในช่องปากที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้ตำรับเจลยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Candida albican* แต่อย่างไรก็ตามตำรับเจลไม่สามารถฆ่า *Candida albican* ได้ ดังนั้นสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด สามารถใช้เตรียมตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิบรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่มีคุณสมบัติยึดเกาะเนื้อเยื่อ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Candida albicans* ได้

กุญแจคำ เจลไวต่ออุณหภูมิ สารสกัดจากเปลือกมังคุด แผลในปาก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Research title Development of thermosensitive gel containing hull of mangosteen fruit extract for mouth ulcer

Investigator Assistant professor Dr. Natthan Charernsriwilaiwat

Project period 1 year 6 months

Abstract

This research aimed to formulate a thermo sensitive gel using poloxamer 407 (PLX407) and chitosan-ethylenediaminetetra acetic acid (CS) loading extract from fruit hull of Garcinia mangostana (EX). 18% W/W of PLX was mixed with 2% W/W of CS at the ratio of 9:1 (PLX:CS). The PLX and PLX:CS were loaded with 1, 2.5 and 5 % W/W EX (PLX:EX and PLX:CS:EX). The physical properties of all formulation including appearance, pH, gelation temperature and viscosity were characterized. The release profile, antioxidant, cytotoxicity and antifungal properties were evaluated. The pH of PLX:CS:EX formulation were in the range of 3.35 to 6.87. The gelation of these formulation occurred around 35.5 - 37.5 °C. The release profile of PLX:EX fitted the Zero order (R^2 = 0.9365) and PLX:CS:EX fitted First order (R^2 = 0.9863). The antioxidant property of gel formulation still exhibited. The gel was non tocixicity to human gingival fibroblast when the concentration was lawer than 200 mg/ml. Furthermore PLX:CS:EX was able to inhibit the growth of Candida albican. However, it did not show fungicidal effects. In conclusion, the fruit hull of mangosteen extract was successfully incorporated into the thermo sensitivity PLX:CS gel with proper physical properties. These formulations may be develope for using in the oral cavity.

Keywords : Thermosensitive gel, Hull of mangosteen fruit extract, Mouth ulcer

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญเรื่อง	v
สารบัญตาราง	vi
สารบัญรูปภาพ	vii
สารบัญตารางภาคผนวก	Ix
สารบัญภาพภาคผนวก	x
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	xi
บทที่ 1 บทนำ	
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
- วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย	
- สารเคมี	11
- อุปกรณ์	12
- ระเบียบวิธีวิจัย	13
บทที่ 3 ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	19
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย	40
ผลผลิตที่ได้จากโครงการ	41
รายงานการเงิน	48
เอกสารอ้างอิง	49
ภาคผนวก	51
ประวัติคณะผู้วิจัย	63

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ 13

ตารางที่ 2 แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของ ascorbic acid และสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด 19

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางกายภาพในแต่ละอัตราส่วนระหว่าง Chitosan กับ EDTA 20

ตารางที่ 4 แสดงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol-gel}$) ของ PLX407 ที่ 14, 14.5, 14.75, 14.9, 15, 15.5, 16, 17, 18, 19, 20 %w/w 21

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะทางกายภาพ เมื่อผสม 2% CS และ 14.9% PLX407 ที่ใช้เตรียมในสัดส่วนต่างๆ ในที่เย็น 22

ตารางที่ 6 แสดงส่วนประกอบของเจลไคโตซานไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด 23

ตารางที่ 7 แสดงภาพถ่ายลักษณะตำรับเจล 24

ตารางที่ 8 แสดงลักษณะทางกายภาพของตำรับเจล 25

ตารางที่ 9 แสดง %content ของตำรับยาเจล 28

ตารางที่ 10 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์การคำนวณปลดปล่อยสะสมของสารแอลฟาแมงโกสติน 30

ตารางที่ 11 แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของตำรับเจล 30

ตารางที่ 12 แสดง shear viscosity ของตำรับเจลที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ rate ที่ 1 s^{-1} 37 องศาเซลเซียส 32

ตารางที่ 13 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Candida albicans* โดยการหาค่า minimum fungicidal concentration (MFC) ของสารสกัดใน 50% DMSO 36

ตารางที่ 14 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Candida albicans* โดยการหาค่า minimum inhibitor concentration (MIC) ของตำรับ 37

ตารางที่ 15 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Candida albicans* โดยการหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของตำรับ 38

ตารางที่ 16 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Candida albicans* โดยการหาค่า minimum fungicidal concentration (MFC) ของตำรับ 39

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 กราฟแสดงผลการวัดความหนืดของตำรับยาเจลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสของตำรับที่ไม่มี ไคโตซาน 25

รูปที่ 2 กราฟแสดงผลการวัดความหนืดของตำรับยาเจลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสของตำรับที่มี ไคโตซาน 26

รูปที่ 3 กราฟแสดงผลการวัดความหนืดเปรียบเทียบระหว่างตำรับยาเจลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสของตำรับที่มี ไคโตซานและไม่มีไคโตซานเป็นส่วนประกอบ 26

รูปที่ 4 กราฟแสดงผลการวัดความหนืดของตำรับยาเจลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสของตำรับที่ไม่มี ไคโตซาน 27

รูปที่ 5 กราฟแสดงผลการวัดความหนืดของตำรับยาเจลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสของตำรับที่มี ไคโตซาน 27

รูปที่ 6 กราฟแสดงผลการวัดความหนืดเปรียบเทียบระหว่างตำรับยาเจลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสของตำรับที่มี ไคโตซานและไม่มีไคโตซานเป็นส่วนประกอบ 28

รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Cumulative ของสารที่ปลดปล่อยจากตำรับกับเวลา ของตำรับ 18% poloxamer 407 กับสารสกัดเปลือกผลมังคุด 5 มิลลิกรัม/กรัม 29

รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Cumulative ของสารที่ปลดปล่อยจากตำรับกับเวลา ของตำรับ 18% poloxamer 407, 2% chitosan (CS) และ สารสกัด 5 mg/g 29

รูปที่ 9 กราฟแสดงผลการวัดการยึดติดเนื้อเยื่อของตำรับยาเจลไม่มีไคโตซานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 31

รูปที่ 10 กราฟแสดงผลการวัดการยึดติดเนื้อเยื่อของตำรับยาเจลผสมไคโตซานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 31

รูปที่ 11 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 33

รูปที่ 12 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : EX : 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 33

รูปที่ 13 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : EX : 5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 34

รูปที่ 14 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : CS ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 34

หน้า

รูปที่ 15 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : CS : EX : 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 35
รูปที่ 16 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : CS : EX : 5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 35
รูปที่ 17 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Candida albicans* ของตำรับเจล 37

สารบัญตารางภาคผนวก

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณสารสกัดที่ได้จากการสกัดเปลือกผลมังคุด 53

ตารางที่ 2 แสดง % content ของแอลฟาแมงโกสตินในสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด 53

ตารางที่ 3 แสดงผลการวัดความหนืดของตำรับยาเจลที่ไม่มีไคโตซาน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 54

ตารางที่ 4 แสดงผลการวัดความหนืดของตำรับยาเจลที่มีไคโตซาน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 55

ตารางที่ 5 แสดงผลการวัดความหนืดของตำรับยาเจลที่ไม่มีไคโตซาน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 56

ตารางที่ 6 แสดงผลการวัดความหนืดของตำรับยาเจลที่มีไคโตซาน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 57

ตารางที่ 7 แสดงค่า AUC ที่ความยาวคลื่น 320 nm และ %content ของตำรับยาเจล 58

ตารางที่ 8 แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุและไม่บรรจุสารสกัดจากเปลือกมังคุด ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical assay 58

ตารางที่ 9 ปริมาณการปลดปล่อยสาร alpha-mangostin ของตำรับ 18% poloxamer 407 กับสารสกัด 5 mg/g 59

ตารางที่ 10 ปริมาณการปลดปล่อยสาร alpha-mangostin ของตำรับ 18% poloxamer 407, 2% chitosan (CS) และ สารสกัด 5 mg/g 59

ตารางที่ 11 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 60

ตารางที่ 12 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : EX 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 60

ตารางที่ 13 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : EX 5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 61

ตารางที่ 14 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : CS ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 61

ตารางที่ 15 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : CS : EX 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 62

ตารางที่ 16 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : CS : EX 5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 62

สารบัญภาพภาคผนวก

หน้า

รูปที่ 1 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน แอลฟาแมงโกสติน 52

รูปที่ 2 แสดงโครมาโตรแกรมของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด 52

รูปที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐานของค่า Area กับ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานแอลฟาแมงโกสติน 53

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

% w/v	Percent weight by volume
% w/w	Percent weight by weight
°C	Degree Celsius
µg	Microgram
µL	Microliter
µm	Micrometer
µM	Micromolar
CFU	*Colony-forming unit*
cm	Centimeter
DPPH	2,2-di(4-*tert*-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
et al.	and others
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum
g	Gram
h	Hour(s)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC_{50}	The half maximal inhibitory concentration
J	Joule
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
M	Molar
MBC	Minimum bactericidal concentration
mg	Milligram
MIC	Minimum inhibitory concentration
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mL	Milliliter

mPa	Megapascal
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
MW	Molecular weight
ng	Nanogram
nm	Nanometer
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffer solution
pH	Potentia hydrogenii (lat.)
pKa	-log10Ka
PBS	Phosphate buffer solution
ppm	Parts per million
rpm	Round per minute
s	second
SD	Standard deviation
SEM	Scanning electron microscope
UV	Ultraviolet

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสาคัญและที่มาของปัญหา

ประชากรทั่วไปมักมีอุบัติการณ์การเกิดแผลในช่องปากร้อยละ 5-25 ซึ่งมักเกิดซ้ำในทุกๆ 3 เดือน สูงถึงร้อยละ 50 ของประชากรทั้งหมด (1) ซึ่งรอยโรคเหล่านี้มักก่อให้เกิดอาการเจ็บปวดในช่องปาก ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการรับประทานอาหาร การกลืนอาหาร และการพูดลดลง ซึ่งรบกวนคุณภาพชีวิตของผู้ที่เป็นแผลในช่องปาก โดยสาเหตุของการเกิดแผลในปากเกิดจากหลายปัจจัย เช่น การติดเชื้อแบคทีเรีย แผลจากอุบัติเหตุ หรือการรับประทานอาหารที่มีลักษณะแข็ง เป็นต้น ปัจจุบันแนวทางการรักษาแผลในช่องปากมักรักษาตามอาการและตามสาเหตุของการเกิดแผล โดยยาตัวเลือกแรกที่ใช้ในการรักษาในปัจจุบัน คือ chlorhexidine mouth wash ซึ่งไม่เหมาะในผู้ป่วยที่มีปัญหาในการกลืน และ topical corticosteroid paste ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม สเตียรอยด์ ที่ไม่เหมาะสมในการใช้เป็นระยะเวลานาน หรือใช้บ่อยครั้งโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง (2) อย่างไรก็ตามมีสารสกัดจากสมุนไพรไทยหลายชนิดมีสามารถนำมาใช้รักษาบาดแผลได้ เช่น สารสกัดจากใบบัวบก สารสกัดจากว่านหางจรเข้ สารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจนำสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ซึ่งมีสารสำคัญคือ แอลฟา แมงโกสติน ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังมีสารอื่นที่ช่วยเร่งการสมานบาดแผล เช่น แทนนิน เป็นต้น มาพัฒนาเป็นรูปแบบเจลที่ไวต่ออุณหภูมิเพื่อให้เกิดการเกาะติดบริเวณบาดแผลได้ยาวนานขึ้น

คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจพัฒนาตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิสำหรับรักษาแผลในช่องปาก เพื่อเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับผู้ป่วยที่มีปัญหาด้านการใช้ยาป้ายปากกลุ่มสเตียรอยด์ และยารูปแบบยาบ้วนปาก จึงได้เลือกใช้พอลิเมอร์ที่ไวต่ออุณหภูมิผสมกับพอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติการเกาะติดเนื้อเยื่อมาพัฒนาตำรับยารักษาแผลในช่องปากที่บรรจุสารสกัดเปลือกผลมังคุดด้วยการเลือกพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ พอลิเมอร์ที่ไวต่ออุณหภูมิคือ โพล็อกซาเมอร์ 407 (poloxamer 407) และ พอลิเมอร์ที่คุณสมบัติคุณสมบัติการเกาะติดเนื้อเยื่อ ได้แก่ ไคโตซาน (chitosan) โดยการประเมินในด้านต่างๆ เช่น อุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายเป็นเจล($T_{sol\text{-}gel}$) ศึกษาฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ ศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญ คุณสมบัติของการเกาะติดเนื้อเยื้อ ความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุช่องปาก

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาตำรับเจลไวต่ออุณหภูมิ ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด
2. เพื่อประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตำรับเจลไวต่ออุณหภูมิ ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. นำเสนอรายงานวิจัยในงานประชุมวิชาการระดับหรือนานาชาติอย่างน้อย 1 ครั้ง
2. ตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติ หรือ ตีพิมพ์ผลงานใน proceeding งานประชุมวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติ
3. เป็นต้นแบบการพัฒนาให้สำหรับภาคเอกชนที่สนใจนำไปพัฒนาเพื่อ จำหน่ายต่อไป

1.4 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1.4.1. แผลในช่องปาก

1.4.1.1 พยาธิสภาพในช่องปาก

สุขภาพช่องปากที่ดีมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตหลายประการ ทั้งช่วยในการบดเคี้ยวอาหารให้มีขนาดเล็กลงก่อนกลืน สามารถรับรสอาหารและเพิ่มความอยากอาหารได้ รวมถึงช่วยให้การออกเสียงพูดชัดเจน และเสริมสร้างบุคลิกภาพและความมั่นใจมากขึ้น โดยองค์ประกอบที่สำคัญในช่องปาก ประกอบด้วย เยื่อเมือก น้ำลาย และฟัน ฟันประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 4 ชนิด คือ เนื้อเยื่อโพรงฟัน ทำหน้าที่ให้ความรู้สึกและให้อาหารเนื้อเยื่อฟัน เนื้อฟันเป็นองค์ประกอบป้องกันเนื้อเยื่อในโพรงฟัน เคลือบฟันเป็นเนื้อเยื่อที่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอก และเป็นเนื้อเยื่อเพียงชนิดเดียวในร่างกายที่มีการแคลซิไฟล์มากที่สุด และ เคลือบรากฟันทำหน้าที่สำคัญในการยึดเกาะติดแน่นของตัวฟันกับขากรรไกร น้ำลายเป็นสารคัดหลั่งที่สร้างมาจากต่อมน้ำลาย ซึ่งประกอบด้วย 3 คู่ในร่างกาย คือ ต่อมน้ำลายพาโรติด(parotid grand) ต่อมน้ำลายใต้ขากรรไกร(submandibular gland) และต่อมน้ำลายใต้ลิ้น (sublingual gland) ซึ่งสารคัดหลั่งจากแต่ละต่อมก็ให้องค์ประกอบของสารเคมีที่แตกต่างกันไป โดยรวมมักประกอบด้วยแร่ธาตุหลายชนิด เช่น โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม คลอไรด์ ไบคาร์โบเนท และฟอสเฟต ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์สามารถลดการก่อฟันผุของกรดที่เกิดจากการผลิตของแบคทีเรีย โดยความเป็นกรด-เบสของน้ำลายโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 6.75 นอกจากนี้น้ำลายยังมีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ เช่น มิวซิน และโปรตีน (1)

โครงสร้างของเยื่อเมือกในช่องปากมักมีความชุ่มชื้นติดต่อระหว่างเยื่อเมือกที่ปกคลุมทางเดินอาหารและเยื่อเมือกที่ติดกับผิวหนังบริเวณริมฝีปาก เยื่อเมือกในช่องปากมีหน้าที่หลายประการ ได้แก่ การป้องกันเนื้อเยื่อระดับลึก รับความรู้สึกที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิ รวมถึงยังมีปุ่มรับรส และต่อมน้ำลายเพื่อเพิ่มความชุ่มชื้น โดยสีของเยื่อเมือกนั้นสัมพันธ์กับปริมาณและการขยายตัวของหลอดเลือด

ขนาดเล็ก ความหนาเยื่อบุ ระดับการสร้างเคอราทิน (keratin) รวมถึงปริมาณของเมลานิน โดยอาจพบต่อมไขมันที่ริมฝีปากบนและกระพุ้งแก้มประมาณ 3 ใน 4 ของผู้ใหญ่ (2)

สามารถแบ่งประเภทของเยื่อเมือกในช่องปาก คือ เยื่อเมือกที่ดาดช่องปาก (lining mucosa) เป็นบริเวณที่ไม่มีเคอราทิน จึงทำให้ผิวบางกว่า สามารถยืดหยุ่นได้เนื่องจากมีเส้นใยยืดหยุ่น มักพบบริเวณริมฝีปาก กระพุ้งแก้ม เยื่อเมือกเบ้าฟัน เพดานอ่อน ลิ้นด้านล่าง และพื้นช่องปาก เยื่อเมือกบดเคี้ยว(masticatory mucosa) เป็นบริเวณที่มีการสร้างเคอราทิน จึงมักไม่ค่อยยืดหยุ่นและยึดแน่นกับเยื่อหุ้มกระดูก มักพบที่เพดานแข็งและเหงือก ซึ่งต้องรับแรงกด แรงเฉือน รวมถึงการเสียดสีจากอาหาร และเยื่อเมือกพิเศษ (specialized mucosa) เป็นเยื่อเมือกที่มีการปรับตัวเพื่อรับรสและทำหน้าที่ในการบดเคี้ยว มีการสร้างเคอราทินรวมถึงมีความยืดหยุ่นสูงด้วยเยื่องจากมีเส้นใยยืดหยุ่นและเส้นใยคอลลาเจน (collagen lining) มักพบที่ด้านบนของลิ้น (3) นิเวศวิทยาภายในช่องปากดังข้างต้นมีส่วนควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ทั้งด้านชนิดและปริมาณ ซึ่งสัมพันธ์กับโรคในช่องปาก ซึ่งเชื้อจุลชีพในช่องปากประกอบด้วยหลายสปีชีส์หลายชนิด ทั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ ไวรัส และปาราสิต โดยส่วนมากมักพบเชื้อแบคทีเรียมากที่สุดและเชื้อแบคทีเรียที่เด่นชัดที่สุด คือ เชื้อสายพันธุ์ streptococci เช่น *S. sanguis S.mitior S.milleri S.salivarius* และ *S.mutans* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคฟันผุในคนมากที่สุด โดยเชื้อ streptococci ตัวอื่นๆก็สามารถก่อโรคในช่องปากได้เช่นกันหากมีโอกาส นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิดแท่งก็เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่อีกกลุ่มหนึ่งที่พบในช่องปาก เช่น เชื้อสายพันธุ์ *Actinomyces* (1, 4)

1.4.1.2 อุบัติการณ์การเกิดแผลในช่องปาก

ในประชากรทั่วไปมีอุบัติการณ์การเกิดแผลในช่องปากหรือรอยโรคในช่องปากราว 5-25% โดยมีอัตราการเกิดรอยโรคซ้ำทุกๆ 3 เดือน สูงถึง 50% ของประชากรทั้งหมด ซึ่งเพศชาย และเพศหญิงมีแนวโน้มในการเป็นรอยโรคในช่องปาก คือ 48.3% และ 57.2% ตามลำดับ (5) โดยรอยโรคชนิดทุติยภูมิ (Recurrent aphthous stomatitis:RAS) หรือ รอยโรคในช่องปากที่เกิดเป็นซ้ำมีอุบัติการณ์ในการเกิดมากที่สุดเมื่อเทียบกับรอยโรคในช่องปากชนิดอื่นๆ ซึ่ง 80 - 85% ของผู้ป่วยที่เป็นรอยโรคในช่องปากที่เกิดเป็นซ้ำมักมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยโรคต่ำกว่า 1 cm ซึ่งรอยโรคขนาดนี้สามารถหายได้เองภายใน 7 - 10 วันโดยที่ไม่ทิ้งแผลเป็นไว้ (6)

1.4.1.3 ความหมายของแผลในช่องปาก

รอยโรคในช่องปาก (oral Lesion) หรือแผลในช่องปาก เกิดจากเยื่อเมือกในช่องปากมีการเปลี่ยนแปลงจากสภาวะปกติซึ่งมาจากสาเหตุหลายประการ ได้แก่ การได้รับบาดเจ็บ การใช้ยาบางชนิด ความผิดปกติของภูมิคุ้มกัน การติดเชื้อไวรัส การติดเชื้อรา และการติดเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น (2) ซึ่งรอยโรคเหล่านี้มักก่อให้เกิดอาการเจ็บปวดในช่องปาก ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกิน กลืนอาหาร และการพูดลดลง ซึ่งรบกวนคุณภาพชีวิตของผู้ที่เป็น (7)

1.4.1.4 การวินิฉัยแผลในช่องปาก

โดยสามารถจำแนกโรคที่มีอาการแสดงแผลและตุ่มพองในช่องปาก โดยใช้ข้อมูล 3 ประการ ซึ่งสามารถจัดประเภทของโรคได้ และนำไปสู่การวินิจฉัยโรค (3) คือ

- ช่วงเวลาตั้งแต่รอยโรคเริ่มปรากฏจนถึงปัจจุบัน ซึ่งบางครั้งระยะแรกรอยโรคอาจยังไม่ปรากฏ หากประเมินแล้วพบว่าเป็นมาไม่เกิน 3 สัปดาห์ จัดว่าเป็นรอยโรคชนิดเฉียบพลัน (acute lesion) หากเป็นมานานมากกว่า 3 สัปดาห์จะจัดว่าเป็นรอยโรคชนิดเรื้อรัง (chronic lesion)

- ประวัติการเป็นโรคที่รอยโรคคล้ายปัจจุบัน สามารถแยกรอยโรคที่เกิดขึ้นในครั้งแรกหรือรอยโรคปฐมภูมิ (primary disease) และรอยโรคกลับเป็นซ้ำหรือรอยโรคทุติยภูมิได้ (recurrent disease)

- จำนวนของรอยโรค โดยสามารถแยกเป็นรอยโรคที่เกิดขึ้นเพียงรอยโรคเดี่ยว (single lesion) หรือเกิดหลายรอยโรค (multiple lesion)

1.4.1.5 สาเหตุของแผลในช่องปาก

โรคที่เป็นสาเหตุของรอยโรคช่องปากหลายตำแหน่งเฉียบพลัน ได้แก่ โรคเริมในช่องปากปฐมภูมิ โรคงูสวัด โรคอิสุกอิใส คอหอยอักเสบเฉียบพลัน โรคมือ-เท้า-ปาก โรคเหงือกอักเสบเนื้อตาย แผลในช่องปากที่เกิดจากการใช้ยาเคมีบำบัด herpangina erythema multiform และ contract allergic stomatitis เป็นต้น

โรคที่เป็นสาเหตุของแผลกลับเป็นซ้ำในช่องปากซึ่งเป็นรอยโรคที่เป็นแล้วหายได้เองและกลับมาเป็นซ้ำโดยลักษณะของแผลเช่นเดิม แต่ตำแหน่งของแผลอาจเปลี่ยนไปจากเดิม ได้แก่ recurrent aphthous stomatitis Behcet’s disease และการติดเชื้อไวรัสเริมซ้ำที่ช่องปาก

โรคที่เป็นสาเหตุของรอยโรคในช่องปากหลายตำแหน่งชนิดเรื้อรัง ได้แก่ pemphigus vulgaris bullous pemphigoid mucous membrane pemphigoid erosive and bullous lichen planus และการติดเชื้อไวรัสเริมเรื้อรังในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง

โรคที่เป็นสาเหตุของรอยโรคเดียวในช่องปาก ได้แก่ แผลบาดเจ็บ histoplasmosis blastoplasmosis และ mucomycosis (2)

1.4.1.6 การรักษาโรคในช่องปากสามารถรักษาตามอาการและตามสาเหตุของการเกิดรอยโรคซึ่งสามารถแบ่งประเภทของยาที่ใช้ในการรักษาโดยสังเขป คือ

- น้ำยาบ้วนปากที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ เนื่องจากมีหลักฐานแสดงว่าการมีอนามัยในช่องปากที่ดีส่งผลต่อการบรรเทาของรอยโรคในช่องปากบางชนิด (8) เช่น รอยโรค lichen planus หรือในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ ซึ่งสารสำคัญที่อยู่ในน้ำยาบ้วนปากที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ ประกอบด้วย chlorhexidine gluconate 0.1-0.2% Povidone iodine 1% cetylpyridium chloride 0.05% เป็นต้น

- สารเฉพาะที่ที่มีฤทธิ์ระงับปวด เป็นการรักษาตามอาการโดยมีทั้งในรูปแบบของสารละลาย ยาป้าย ยาผง หรือเจล ซึ่งมีสารสำคัญที่มีฤทธิ์ระงับปวด คือ benzydamine, hydrochloride และ lidocaine เป็นต้น

- ยาต้านเชื้อรา ใช้สำหรับการติดเชื้อราในช่องปากและคอหอย โดยมีทั้งในรูปแบบยาน้ำแขวนตะกอน ยาทา ยาอม ยาเจล ยาครีม ที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์เฉพาะที่ และในรูปแบบยาเม็ด และยาแคปซูล ซึ่งออกฤทธิ์ทั่วทั้งร่างกาย ได้แก่ ยา nystatin, clotrimazole, miconazole และ fluconazole เป็นต้น

- ยาต้านไวรัส มักใช้ทั้งในการรักษาและการป้องกันการติดเชื้อไวรัส เช่น ไวรัสโรคเริม ไวรัสโรคงูสวัด โดยประกอบด้วยยาที่ออกฤทธิ์เฉพาะที่ และออกฤทธิ์ทั่วทั้งร่างกาย เช่น ยา acyclovir, pencyclovir และ valacyclovir เป็นต้น

- ยากดภูมิคุ้มกันและสารปรับภูมิคุ้มกัน มักเป็นสารจำพวก corticosteroid ที่ใช้เฉพาะที่ที่ถูกดูดซึมน้อยมาก เช่น triamcinolone acetonide oral paste 0.1% beclomethasone spray เป็นต้น และสารปรับภูมิคุ้มกัน เช่น cyclosporin tacrolimus เป็นต้น (2) นอกจากนี้มีการศึกษาการรักษารอยโรคในช่องปากชนิดที่เกิดเป็นซ้ำ ด้วย propolis capsule ในผู้ป่วย (9)

1.4.2. In-situ gel

In-situ gel คือ เจลที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงหรือการกระตุ้นจากสภาวะแวดล้อมต่างๆ ทำให้สถานะการละลายของเจลเปลี่ยนแปลงไป เช่น การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา (อุณหภูมิ และ ความเป็นกรด-เบส) การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ (ชนิดตัวทำละลาย และ การพองตัว) การเกิดปฏิกิริยาเคมี (การเหนียวนำด้วย เอมไซม์ หรือแสง) เป็นต้น (10)

ปัจจัยที่มีผลต่อ in-situ gel สามารถแบ่งได้ดั้งต่อไปนี้

- อุณหภูมิ คือเมื่อมีการแปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทำให้เกิดปฏิกิริยาเหนี่ยวนำให้มีการเปลี่ยนแปลงสถานะของพอลิเมอร์ระหว่าง sol-gel โดยแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1) พอลิเมอร์ที่มีอุณหภูมิวิกฤติของสารละลายแบบต่ำสุด(lower critical solution temperature, LCST) เป็นพอลิเมอร์สามารถสารละลายในน้ำแต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้ตกตะกอนเป็นเจลในน้ำ(sol-gel) โดยพอลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ poly-Nisopropylacrylamide (PNIPAAm), polyN-(L)-(1-hydroxymethyl)propylmethacrylamide [P(LHMPMAAm)], polyN,N diethylacrylamide(PDEAAm), poly-2-(dimethylamino) ethylmethacrylate (PDMAEMA) และ poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO, Pluronics)

2) พอลิเมอร์ที่มีอุณหภูมิวิกฤติของสารละลายแบบสูงสุด (upper critical solution temperature, UCST) เป็นพอลิเมอร์ที่ลักษณะเป็นเจลแต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้พอลิเมอร์สามารถสารละลายในน้ำ โดยพอลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ polyacrylic acid (PAA),

polyacrylamide (PAAm) และ polyacrylamide-co-butyl methacrylate ซึ่งไม่ขึ้นอยู่กับการพองตัว

- ความเป็นกรด-เบส คือ พอลิเมอร์ที่หมู่เป็นกรดหรือเบสเป็นส่วนประกอบซึ่งทำหน้าที่ให้หรือรับโปรตอนจากสภาวะแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลง pH ซึ่งมีลักษณะการเกิดเจลของพอลิเมอร์ขึ้นกับการพองตัวโดยที่การพองตัวจะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH สูงขึ้นในพอลิเมอร์ที่มีประจุลบ(anionic) เช่น หมู่ฟังก์ชันเป็นกรดอ่อน แต่การพองตัวจะลดลงในพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก(cationic) เช่นหมู่ฟังก์ชั่นที่เป็นเบสอ่อน โดยพอลิเมอร์ที่มีนิยมมาใช้ได้แก่ polyacrylic acid(PAA, Carbopol®, carbomer), polyvinylacetal diethylaminoacetate (AEA) โดยมีสถานะเป็น sol ที่ pH 4 และเป็น gel ที่ pH 7.4

- การพองตัว (swelling) คือ เกิดจากการที่พอลิเมอร์ดูดซับน้ำบริเวณรอบข้างเช่น myverol 18-99 (glycerol mono-oleate) ซึ่งเป็นไขมันที่มีขั้วจะพองตัวในน้ำจากผลึกเหลวชนิดไลโอทรอปิก (lyotropic liquid crystals)

- การแพร่ (diffusion) คือ เกิดจากการแพร่ของตัวทำละลายระหว่างพอลิเมอร์และสิ่งแวดล้อมที่เป็นเนื้อเยื่อทำให้เกิดการตกตะกอนของเจล เช่น N-methylpyrrolidone (NMP)

- การเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลพอลิเมอร์ผ่านพันธะไอออนิค (ionic crosslinking) คือ พอลิเมอร์ที่เปลี่ยนแปลงสถานะขึ้นกับจำนวนของประจุโดยเฉพาะ anionic polysaccharide ที่มีความไวต่อประจุที่เป็น mono และ divalent cations(Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+} และ Na^{+}) เช่น k-carrageenan จะเป็นเจลที่แข็งและเปราะแตกเมื่อจำนวนของ K^{+} น้อย ส่วน i-carrageenan จะเป็นเจลที่มีความยืดหยุ่นเมื่อจำนวนของCa^{2+} มาก หรือ พอลิเมอร์ที่มีหมู่ methoxy และ alginic acid จะเกิดขึ้นอยู่กับ Ca^{2+} เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ methoxy และ glucuronic acid ตามลำดับ

- การเชื่อมโยงระหว่างโมเลกุลพอลิเมอร์ผ่านเอมไซม์ (enzymatic cross-linking) คือ พอลิเมอร์ไวต่อเอมไซม์เช่น การปลดปล่อย insulin (ยาฉีด) ของสู่ร่างกายโดยเป็นใช้พอลิเมอร์ที่ไวต่อ cationic และ pH ซึ่งประกอบด้วย insulin และ glucose oxidase โดยจะตอบสนองต่อระดับน้ำตาลในกระแสเลือดทำให้เกิดการพองตัวขึ้น และปลดปล่อยตัวยาออกมา

- การเกิดพอลิเมอร์เซชันผ่านการกระตุ้นด้วยแสง (photo-polymerisation) คือ การทำให้พอลิเมอร์เปลี่ยนแปลงสถานะโดย การใช้ electromagnetic radiation โดยจะใช้ long wavelength ultraviolet ซึ่งทำให้ polymer ไวต่อการกระตุ้น แต่ Short wavelength ultraviolet จะมีผลต่อการซึมผ่านของเนื้อเยื่อที่ลดลง เช่น 2,2 dimethoxy-2-phenyl

มีการศึกษาพัฒนาสูตรตำรับยาเจลจากคุณสมบัติการเกาะติดเนื้อเยื่อของพอลิเมอร์แต่ละชนิด Bukka และคณะ (2010) ประเมินคุณสมบัติการเกาะติดเนื้อเยื่อและการปลดปล่อยยา rasagiline ในช่องปากรูปแบบของฟิล์ม ที่เปรียบเทียบระหว่าง carbopol P 940 และ sodium alginate พบว่า carbopol P 940 มีคุณสมบัติการเกาะติดเนื้อเยื่อได้ดีกว่า sodium alginate และ

การปลดปล่อยยาจะลดลงเมื่อมีการเพิ่มปริมาณของพอลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิด และ Farmacia และคณะ (2010) ศึกษาเปรียบเทียบการใช้พอลิเมอร์ชนิดเดียว คือ poloxamer 407 (P407), carbopol 934P (C934P) หรือ gelatin (GELA) และการใช้พอลิเมอร์ร่วมกัน คือ P407 ร่วมกับ C934P และ P407 ร่วมกับ GELA พบว่าการใช้พอลิเมอร์ร่วมกันระหว่าง 15% P407 ร่วมกับ 0.2% C934P หรือ 15% P407 ร่วมกับ 1% GELA สามารถก่อเจลได้ที่อุณหภูมิในช่วง 29-30°C ซึ่งการพัฒนาตำรับยาเจลจึงนิยมเลือกใช้พอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติในการก่อเจล และการเกาะติดเนื้อเยื่อได้ดี โดยส่วนใหญ่จะใช้พอลิเมอร์ 2 ชนิดรวมกัน คือ poloxamer, carbopol หรือ sodium alginate เพื่อคุณสมบัติการเกาะติดและการปลดปล่อยยาที่ดี (11)

1.4.3. สารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

มังคุด (*Garcinia mangostana* Linn. วงศ์ Guttiferae) หรือมีชื่อทางภาษาอังกฤษว่า mangosteen เป็นพืชที่ทุกคนรู้จักดี ถูกจัดเป็นทั้งไม้ผลและสมุนไพร ในแง่ของการเป็นไม้ผลนั้น เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่ามังคุดจัดเป็นราชินีแห่งผลไม้ ส่วนในแง่ของการเป็นสมุนไพรนั้น มังคุดได้ถูกนำมาให้เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณต่างๆ หลากหลาย เช่น เปลือกผลมีรสฝาด บดเป็นผงหรือชงหรือต้มรับประทานเป็นยาแก้ท้องร่วง แก้บิด มูกเลือด แก้ไข้ท้องเสีย ถ้านำมาฝนกับน้ำปูนใสจะใช้ทาแก้แผลเน่าเปื่อยพุพอง ช่วยสมานแผลสด หรือใช้ต้มชะล้างบาดแผลก็ได้ เนื้อหุ้มเมล็ด ซึ่งก็คือส่วนที่เป็นเนื้อสีขาวที่เรารับประทานเป็นผลไม้ นอกจากมีรสชาติหวานอมเปรี้ยวอร่อยแล้ว ยังมีสรรพคุณเป็นยาบำรุงกำลัง บำรุงร่างกาย แก้ร้อนใน เนื่องจากรับประทานทุเรียนอีกด้วย ยางที่ได้จากผล ซึ่งมีลักษณะเป็นยางสีเหลือง จะมีรสฝาด มีสรรพคุณเป็นยาได้เหมือนกัน คือนำมาใช้เป็นยาแก้บิด แก้ท้องร่วงและแก้แผลหนอง

ส่วนที่นำมาใช้เป็นยาทั่วไปของมังคุด มักจะเป็นส่วนของเปลือกผล ซึ่งนอกจากมีสรรพคุณตามที่ระบุไว้ในตำรายาแผนไทยแล้ว ยังถูกนำมาใช้เป็นยาแก้ท้องเดินในยาสมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน โดยใช้กับอาการท้องเดินทั่วไปที่มีอาการไม่รุนแรง เช่น ท้องเดินที่เกิดจากอาหารเป็นพิษที่ไม่ใช่อาการท้องเดินที่รุนแรง หรือเกิดจากเชื้อบิดมีตัว โดยมีวิธีใช้ คือ ใช้เปลือกผลแห้งประมาณครึ่งผล (4 กรัม) ย่างไฟให้เกรียม ฝนกับน้ำปูนใสประมาณครึ่งแก้ว หรือบดเป็นผงละลายน้ำข้าว (น้ำข้าวเช็ด) หรือน้ำสุก ดื่มทุก 2 ชั่วโมง จนกว่าอาการท้องเดินจะดีขึ้น หรือหาย

มังคุดเป็นไม้ยืนต้นสูง 10 – 12 เมตร ใบหนาโตขนาดใบชมพู่ หลังใบสีเขียวเข้มเป็นมัน ท้องใบมีสีอ่อนกว่า แผ่นใบเป็นรูปไข่หรือรูปวงรี แกมขอบขนานกว้าง 10 – 11 ซม. ยาว 15 – 25 ซม. ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามกัน ดอกมังคุดเป็นดอกเดี่ยวหรือดอกคู่ ออกที่ซอกใบใกล้ปลายกิ่ง เป็นดอกสมบูรณ์เพศ กลีบเลี้ยงมีสีเขียวอมเหลือง และกลีบเลี้ยงนี้จะติดทนจนติดมากับผลที่บริเวณปลายผลที่มีลักษณะเป็นแฉก 4 – 6 แฉก มังคุดจัดเป็นพืชที่มีดอกที่สามารถเจริญไปเป็นผลได้โดยไม่ต้องผสมเกสร ดังนั้นในทางพฤกษศาสตร์ มังคุดจัดเป็นพืชที่ไม่กลายพันธุ์ แต่อาจมีความแตกต่างทางสายพันธุ์

บ้างระหว่างพันธุ์มังคุดที่ปลูกในภาคตะวันออกกับมังคุดที่ปลูกในภาคใต้ มังคุดเป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตช้า และต้องการร่มเงาในขณะที่ต้นยังมีขนาดเล็ก

มีรายงานการศึกษาเป็นจำนวนมากที่รายงานเกี่ยวกับสารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในเปลือกผลมังคุด ซึ่งเปลือกผลมังคุดประกอบด้วยสารแทนนิน (tannin) 8.8 – 10.5 % ที่มีฤทธิ์แก้อาการท้องเดิน นอกจากนี้ยังมีสารเคมีอื่น ๆ อีกหลายชนิด สารเคมีกลุ่มหนึ่งที่มีพบเป็นจำนวนมากเช่นกันในเปลือกผลมังคุด คือ สารกลุ่มแซนโธน (xanthones) ที่ประกอบด้วยสารหลัก คือ แอลฟา-แมงโกสติน (**α**-mangostin)

มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเป็นจำนวนมากของสารกลุ่มแซนโธนจากเปลือกผลมังคุด เช่นฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านเชื้อมาเลเรีย เป็นพิษต่อเซลล์ ต้านฮีสตามีนและซีโรโทนิน ลดการอักเสบและลดการเกิดแผลในทางเดินอาหาร ยับยั้งเอนไซม์ DNA topoisomerase I & II เพิ่มปริมาณเอนไซม์ serum glutamic oxaloacetic transaminase และ serum glutamic pyruvic transaminase กดประสาทส่วนกลางและเพิ่มความดันโลหิต จับกับอนุมูลอิสระและต้านออกซิเดชัน ต้าน cyclooxygenase และ prostaglandin E_2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอักเสบ ต้าน monoamine oxidase และต้านเซลล์มะเร็ง (12 ,13)

จะเห็นได้ว่าเปลือกผลมังคุดและสารเคมีที่พบอยู่ในเปลือกผล โดยเฉพาะสารในกลุ่มแซนโธนมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมายเมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะฤทธิ์ทางด้านการต้านการอักเสบ การต้านฮีสตามีนและซีโรโทนิน หรือแม้แต่ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ก็หวังเป็นอย่างยิ่งว่าสักวันหนึ่งในอนาคต จะได้เห็นยาสมุนไพรแผนปัจจุบัน หรือยาแผนปัจจุบันที่พัฒนามาจากเปลือกผลมังคุดที่เกิดจากการศึกษาวิจัยต่อยอด หรืองานวิจัยประยุกต์ของงานวิจัยที่เกี่ยวกับมังคุดที่มีอยู่ในปัจจุบัน

ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดมีดังนี้

<u>ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย</u>

ในปีค.ศ. 2003 Sakagami และคณะ (14) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสาร **α**-mangostin ซึ่งเป็นสารสำคัญที่อยู่ในเปลือกผลมังคุด *Garcinia mangostana* โดยสามารถออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย vancomycin resistant *Enterococci* (VRE) และ methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) โดยมีค่า MIC เป็น 6.25 ถึง 12.5 µg/ml ตามลำดับ โดยการศึกษานี้ยังแสดงถึงผลการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสาร **α**-mangostin กับ Gentamycin ในการต้านเชื้อ VRE และสาร **α**-mangostin กับ Vancomycin hydrochloride ในการต้านเชื้อ MRSA และในการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าการเสริมฤทธิ์ระหว่าง **α**-mangostin กับยาปฏิชีวนะที่มีขายทั่วไปเช่น ampicillin และ minocycline เป็นแบบ partial synergism โดยสรุปแล้วการศึกษานี้พบว่าการใช้

α-mangostin เดี่ยวๆ หรือการใช้ร่วมกับ Gentamycin ในการต้านเชื้อ VRE และใช้ร่วมกับ Vancomycin ในการต้านเชื้อ MRSA มีประสิทธิภาพในการควบคุมการติดเชื้อ VRE และ MRSA ได้เป็นอย่างดี

ในปีค.ศ. 2007 Chomnawang และคณะ (15) ได้ทำการศึกษาถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยในการต้านการอักเสบที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Propionibacterium acnes* ในด้านคุณสมบัติการกำจัดอนุมูลอิสระและการลดระดับของ cytokine ที่เป็นสาเหตุของการอักเสบ ซึ่ง *P. acnes* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดหนอง ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบและเกิดสิว โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุสูลอิสระในงานวิจัยชิ้นนี้ใช้วิธี DPPH scavenging และ NBT reduction assay

ซึ่งผลการทดลองพบว่าสารสกัดจาก *Garcinia mangostana* มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและสามารถลดการเกิด reactive oxygen species ได้ อีกทั้งการทดสอบด้วยวิธี ELISA ยังพบว่าสามารถลดปริมาณของ TNF-α ได้อีกด้วย ซึ่งสรุปได้ว่า *Garcinia mangostana* มีประสิทธิภาพที่ดีมากในการกำจัดอนุมูลอิสระและยับยั้งการหลั่ง cytokine ซึ่งเป็น mediator ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ จากการทดลองนี้เห็นได้ว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีแนวโน้มในการต้านการอักเสบซึ่งอาจจะมีประโยชน์ในการนำมาใช้รักษาสิว

ในปีค.ศ. 2009 Chomnawang และคณะ (16) ได้ทำการศึกษาถึงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* (S.*aureus*)ของสมุนไพรทั้งหมด 17 ชนิดโดยใช้วิธี disc diffusion method โดยผลปรากฏว่าสารสกัดจาก *Barleria lupulina, G. mangostana, Hibiscus sabdariffa, Senna alata, Tagetes erecta, Psidium guajava* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S.aureus* ได้ อีกทั้งเชื้อ MRSA ยังถูกยับยั้งการเจริญเติบโตโดย G. *mangostana, B. lupulina, H. sabdariffa, P. guajava, Eupatorium odoratum, Lawsonia inermis, S. alata และ T. erecta* ซึ่งในบรรดาสมุนไพรทั้งหมด G. *mangostana* สามารถยับยั้งเชื้อโดยมี inhibition zone สูงที่สุด จากนั้นจึงทำการวัด minimum inhibitory concentrations (MIC) ของสมุนไพรทั้งหมดโดยวิธี Broth dilution method พบว่า G. *mangostana* มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงที่สุดโดยมีค่า MIC เท่ากับ 39 µg/ml และทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย MRSA เพิ่มเติมโดยวิธี microdilution methods พบว่าค่า MIC และ MBC เป็น 1.95 µg/ml และ 3.91 µg/mL ตามลำดับ

<u>ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ</u>

ในปี ค.ศ. 2006 Yu และคณะ (17) ได้ทำการศึกฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นจากสารประกอบกลุ่ม phenolic compound ในมังคุด (*Garcinia mangostana*) โดยสกัดด้วยสารละลาย 70% MeOH และทำการ partition แยกชั้นในส่วน *n*-BuOH โดยสารประกอบหลักในกลุ่ม phenolic 3 ชนิดมีส่วนสำคัญในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและถูกทำให้บริสุทธิ์โดย silica

gel column chromatography และ sephadex LH-20 และระบุแต่ละส่วนเป็น P_1 (1,3,6,7-tetrahydroxy-2,8-(3-methyl-2-butenyl)), P_2 [1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-2,8-(3-methyl-2-butenyl) xanthone] และ P_3 (epicatechin) โดยใช้เครื่อง UV–visible spectrophotometry, IR spectrophotometry และ NMR spectroscopy ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบทั้ง 3 ชนิดใช้การประเมินผลโดยวิธีแตกต่างกัน ประกอบด้วยวิธี freeradical scavenging capability และ total antioxidant activity in a linoleic acid peroxidation ซึ่งสารประกอบทั้ง 3 มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาที่แตกต่างกันในแต่ละการทดสอบ ซึ่งจากการทดสอบโดยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capabilities ซึ่งวัดประสิทธิภาพในการต้านปฏิกิริยา linoleic acid peroxidation ของ P_1 มากกว่า P_2 และ P_3 แต่ประสิทธิภาพ superoxide anion radical scavenging activity ของ P_3 มากกว่า P_1 แต่ใกล้เคียงกับ P_2 หรือ **α**-tocopherol ซึ่งกระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ activity ยืนยันถึงองค์ประกอบที่แสดงถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (DPPH radical scavenging activity) ของมังคุด G. *mangostana* ได้เป็นอย่างดี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 สารเคมี

2.1.1 เปลือกผลมังคุด (สวนผลไม้ จังหวัด จันทบุรี)

2.1.2 Agar (Himedia,USA)

2.1.3 Ethanol AR grade (Labscan co.ltd.)

2.1.6 Methanol HPLC grade and AR grade (Labscan co.ltd.)

2.1.7 Orthophosphoric acid (Labscan co.ltd.)

2.1.8 Acetonitrile HPLC grade (Labscan co.ltd.)

2.1.9 Dulbecco's modified eagle medium (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)

2.1.10 Fetal bovine serum (FBS) (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)

2.1.11 L-Glutamine-200 mM (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)

2.1.12 Penicillin G sodium for injection (sterile) (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)

2.1.13 Sodium Pyruvate 100 mM (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)

2.1.14 Sterile water for irrigation (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)

2.1.15 Streptomycin sulfate (sterile) (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)

2.1.16 Trypan blue stain 0.4% w/v (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)

2.1.17 Trypsin-EDTA (0.25%) solution (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)

2.1.18 Tryptone soy broth (TSB) (Lab M Limited, Bury, Lancashire, UK)

2.1.19 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)

2.1.20 Potassium phosphate (Ajax Finechem Australia, New Zealand)

2.1.21 Sodium bicarbonate (BDH AnalaR®, VWR International Ltd. England)

2.1.22 Sodium chloride (Ajax Finechem Australia, New Zealand)

2.1.23 Sodium hydroxide pellet (Ajax chemicals, New South Wales, Australia)

2.1.24 Sodium phosphate (Ajax Finechem Australia, New Zealand)

2.1.26 Glycerin (commercial grade)

2.1.27 Triethanolamine (commercial grade)

2.1.28 Peppermint oil (commercial grade)

2.1.29 Xylitol (commercial grade)

2.1.30 Sodium saccharine (commercial grade)

2.1.32 Sodium lauryl sulphate (commercial grade)

2.1.32 Polysorbate 80 (commercial grade)

2.1.32 Calcium carbonate (Ajax Finechem Australia, New Zealand)

2.1.33 Carbomer 940 (commercial grade)

2.1.31 Sodium carboxymethyl cellulose (commercial grade)

2.1.32 Sodium benzoate (Ajax Finechem Australia, New Zealand)

2.2 วัสดุอุปกรณ์

2.2.1 Beaker ขนาด 20, 50, 100, 250, 400 และ 1,000 มิลลิลิตร (SCHOTT®, Germany)

2.2.2 Centrifuge (LEGEND X1R, Thermo Fisher Scientific®, USA)

2.2.3 Cylinder ขนาด 10, 25, 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร Micropipettes ขนาด 20-5000 µL (BIOHIT® Proline 100-1000 µL, RAININ® Pipet-Lite XLS)

2.2.4 Dropper

2.2.5 Electrical balance (New classic MF, MS204, METTLER TOLEDO®, Switzerland)

2.2.6 Evaporator (Buchi®, Thailand)

2.2.7 Funnel

2.2.8 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) instrument (Agilent Technologies,USA)

2.2.9 HPLC vial (Duran SCHOTT®,Germany)

2.2.10 High voltage power supply (Gamma high voltage research,USA)

2.2.11 Hot plate (IKA®C-MAG HS 7 ,Becthai Bangkok Equipment & Chemicak Co.,Ltd.,Thailand)

2.2.12 Magnetic stirrer and stirrer bar (IKA®RO10, Becthai Bangkok Equipment & Chemicak Co.,Ltd.,Thailand)

2.2.13 Microplate reader (Accu Reader® Metertech Inc,Taiwan)

2.2.15 Sonicator (Ultrasonic cleaner set,WiseClean®,Korea)

2.2.16 Stirring rod

2.2.17 Syringe pump (NE-300, New Era Pump Systems,Inc.,NY,USA)

2.2.18 Test tube

2.2.19 Volumetric flask ขนาด 10, 25, 50, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร (SCHOTT®,Germany)

2.3 การเตรียมสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดและการตรวจสอบคุณลักษณะ

2.3.1 การสกัดเปลือกผลมังคุด

นำเปลือกมังคุดไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง นำเปลือกมังคุดที่อบแห้งแล้วมาบดจนละเอียด นำผงเปลือกมังคุดแห้งที่บดแล้ว 5 กรัมใส่ใน soxlet apparatus และใส่ 95 % ethanol 250 ml ลงใน round bottom flask โดยให้อุณหภูมิที่ 78.1 องศาเซลเซียส ระเหย ethanol ด้วย water bath นำสารสกัดหลังจากระเหย ethanol ใส่ภาชนะปิดสนิท หาผลผลิตร้อยละที่ได้จากการสกัด (% yield)

2.3.2 การตรวจสอบคุณลักษณะของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

เจือจางให้สารสกัดมีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรในเอทานอลนำไปวิเคราะห์ ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้ C18 column reverse phase (4.6 x 250 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) อัตราการไหล (Flow rate) เท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที, ปริมาตรที่ใช้ฉีดเท่ากับ 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์โดย ยูวี สเปกโตรสโกปี ความยาวคลื่น 320 นาโนเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ อะซิโตไนไทรล์ (A) และ ฟอสฟอริกแอซิด (B) โดยมีการปรับอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ทั้ง 2 ชนิด ที่เวลาต่างๆ ดังตารางที่ 1 (18)

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่

วัฏภาคเคลื่อนที่	เวลาที่ใช้
70% A	0–15 นาที
70% A to 75% A	ภายใน 3 นาที
75% A to 80% A	ภายใน 1 นาที
80% A	6 นาที
80% A to 70% A	ภายใน 1 นาที

2.3.3 ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่ได้ ด้วย DPPH assay

เตรียม DPPH (MW 394.32) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ โดยชั่งผง DPPH 7.89 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียมสารตัวอย่าง ให้มีความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้เอทานอล เป็นตัวทำละลาย เช่น 1, 5, 10, 20 และ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไป incubate อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาค่า %Inhibition ตามสมการที่ 1

$$\%\text{Inhibition} = \frac{(\square 3)_{\square\square\square} - [(\square 1)_{\square\square\square} - (\square 2)_{\square\square\square}]}{(\square 3)_{\square\square\square}} \times 100 \quad \text{.....(1)}$$

โดยที่ A1 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

A2 = ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank

A3 = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

นำ %Inhibition และความเข้มข้นที่ทดสอบไปสร้างกราฟเพื่อหาค่า IC_{50}

หมายเหตุ : ความเข้มข้นสุดท้ายที่นำไปสร้างกราฟ IC_{50} จะเป็นครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นเริ่มต้น

2.4 การตั้งตำรับการตั้งตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

2.4.1 ศึกษาอุณหภูมิในการก่อเจลของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่ประกอบด้วย โพล็อกซาเมอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.4.1.1 การเตรียมสารละลายผสมระหว่าง EDTA และ ไคโตซาน ที่สามารถละลายเข้ากัน

1) เตรียมสารละลายไคโตซาน 1.0% w/w

(1) ชั่ง ไคโตซาน 0.50 กรัม ใส่ใน beaker ขนาด 50 มิลลิลิตร

(2) ชั่ง EDTA ตามน้ำหนักที่ต้องการ ใส่ใน beaker ที่มี ไคโตซานอยู่

(3) ปรับน้ำหนักด้วยน้ำจนครบ 50 กรัม

(4) นำไปผสมด้วยเครื่อง magnetic stirrer

2) เตรียมสารละลายไคโตซาน 1.5% w/w

(1) ชั่ง ไคโตซาน 0.25 กรัม ใส่ใน beaker ขนาด 50 มิลลิลิตร

(2) ชั่ง EDTA ตามน้ำหนักที่ต้องการ ใส่ใน beaker ที่มี ไคโตซานอยู่

(3) ปรับน้ำหนักด้วยน้ำจบครบ 50 กรัม

(4) นำไปผสมด้วยเครื่อง magnetic stirrer

3) เตรียมสารละลายไคโตซาน 2.0% w/w

(1) ชั่งไคโตซาน 0.25 กรัม ใส่ใน beaker ขนาด 50 มิลลิลิตร

(2) ชั่ง EDTA ตามน้ำหนักที่ต้องการ ใส่ใน beaker ที่มีไคโตซานอยู่

(3) ปรับน้ำหนักด้วยน้ำจนครบ 50 กรัม

(4) นำไปผสมด้วยเครื่อง magnetic stirrer

2.4.1.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล แต่ละอัตราส่วนของ poloxamer

1) การเตรียมสารละลาย poloxamer 407

(1) ชั่ง poloxamer 407 ตามน้ำหนักที่ต้องการ ใส่ลงใน beaker ขนาด 50 มิลลิลิตร

(2) ปรับน้ำหนักด้วยน้ำจนครบ 50 กรัม

(3) นำไปผสมด้วยเครื่อง magnetic stirrer ด้วยความเย็นจนใส

(4) นำสารละลาย poloxamer ที่ได้ มาทดสอบการก่อตัวเป็นเจล โดยการค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิ

2.4.1.3 การเตรียม poloxamer ร่วมกับ EDTA : ไคโตซาน

1) การเตรียม poloxamer 407 ร่วมกับ chitosan แต่ละความเข้มข้น

(1) ชั่ง poloxamer 407 ร่วมกับ 1.0% ไคโตซาน : EDTA

ก. ชั่ง poloxamer 407 ตามน้ำหนักที่ต้องการ

ข. ชั่ง 1.0% ไคโตซาน : EDTA ตามน้ำหนักที่ต้องการ ลงในบีกเกอร์เดิม

ค. ผสมด้วยเครื่อง magnetic stirrer จนเข้ากันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

(2) ชั่ง poloxamer 407 ร่วมกับ 1.5% ไคโตซาน : EDTA

ก. ชั่ง poloxamer 407 ตามน้ำหนักที่ต้องการ

ข. ชั่ง 1.5% ไคโตซาน : EDTA ตามน้ำหนักที่ต้องการ ลงในบีกเกอร์เดิม

ค. ผสมด้วยเครื่อง magnetic stirrer จนเข้ากันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

(3) ชั่ง poloxamer 407 ร่วมกับ 2.0% ไคโตซาน : EDTA

ก. ชั่ง poloxamer 407 ตามน้ำหนักที่ต้องการ

ข. ชั่ง 2.0% ไคโตซาน : EDTA ตามน้ำหนักที่ต้องการ ลงในบีกเกอร์เดิม

ค. ผสมด้วยเครื่อง magnetic stirrer จนเข้ากันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4.2 ศึกษาการตั้งตำรับยาเจลที่ไวอุณหภูมิร่วมกับพอลิเมอร์ชนิดต่างๆในอัตราส่วนต่างๆ กัน

1) การบรรจุสารสกัดจากเปลือกมังคุด ในยาพื้นที่ประกอบด้วย poloxamer 407 และไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ

(1) ชั่งน้ำหนักสารสกัดจากเปลือกมังคุด 0.5, 0.25, 0.1 กรัม

(2) ปรับปริมาตรด้วยยาพื้น 1.0% ไคโตซานจนครบ 100 กรัม

(3) ผสมด้วย magnetic stirrer จนเข้ากัน

2.5 ทดสอบคุณลักษณะทางกายภายและเคมีของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

2.5.1 ลักษณะภายนอกของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิ

ลักษณะภายนอกของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ประเมินโดยภายถ่ายและสังเกต ลักษณะ สีของตำรับ ความใส เป็นต้น

2.5.2 ค่าความเป็นกรดด่าง

ค่าความเป็นกรดด่างของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ตรวจสอบด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดด่าง **(**Horiba PH-33, Japan**)** วัดตัวอย่างละ 3 ครั้ง

2.5.3 ค่าความหนืด

ค่าความเป็นกรดด่างของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด โรง ตรวจสอบด้วยเครื่องวัดความหนืด (Rheometer, Kinexus Pro, Marvern, England) ชั่งตัวอย่าง 15 กรัม กำหนด Shear rate 1-100 s^{-1} ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซสเซียส วัดตัวอย่างละ 3 ครั้ง

2.5.4 การหาปริมาณสารสำคัญ

นำตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด เตรียมได้มาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ละลายใน ethanol ปั่นด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่าน membrane ขนาด 0.45 micron เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ แอลฟาแมงโกสติน ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้สภาวะตามที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 2.3.2 เมื่อได้ค่าความเข้มข้นของสารสำคัญแอลฟาแมงโกสติน จะคำนวณเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัด นำมาหาเป็นร้อยละของจำนวนที่ระบุไว้ในฉลาก **(**labelled amount **%)** ตามสมการที่ 2 ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ร้อยละของจำนวนที่ระบุไว้ในฉลาก = ความเข้มข้นของสารสกัดที่ตรวจสอบได้/ความเข้มข้นของสารสกัดที่ระบุไว้ในฉลาก x 100.....**(2)**

2.5.5 การศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญ

นำเจลจำนวน 10 g ใส่ลงในขวดที่มีฝาปิด นำขวดที่บรรจุเจลวางบนแท่นของเครื่อง shaking incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 50 rpm และ ความเร็วในการหมุนของพัดลมระบายอากาศ 1400 rpm ใส่น้ำลายเทียมปริมาตร 15 มิลลิลิตร (น้ำลายเทียม**;** สารละลายผสมของ Na_2HPO_4 2.38 กรัม KH_2PO_4 0.19 กรัม NaCl 8 กรัม ต่อ 1 ลิตรของน้ำกลั่น) ลงในขวดแก้วที่บรรจุตำรับยาเจล แล้วปิดฝาภาชนะทำการจับเวลา สุ่มตัวอย่างครั้งละ 1 มิลลิลิตร และใส่น้ำลายเทียมใหม่กลับคืนในปริมาตรเท่าเดิมที่เวลาต่างๆ นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ แอลฟาแมงโกสติน ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้สภาวะตามที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 2.3.2 ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.6 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

ตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด จะถูกเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 1000, 800, 600, 400, 200 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับจากนั้นนำไปตรวจสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และคำนวณ เป็นค่า IC_{50} ตามที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 2.3.4

2.7 การทดสอบการเกาะติดเนื้อเยื่อของตำรับเจลด้วยวิธี viscometer method

เตรียมสารละลาย mucin ความเข้มข้น และนำไปวัดความหนืด ด้วยเครื่องวัดความหนืด (Rheometer, Kinexus Pro, Marvern, England) ความหนืดของ mucin (ηm), ความหนืดของตำรับยาเจล (ηgel) และความหนืดของ ตำรับยาเจลที่ผสมกับ mucin (ηtotal) และ นำค่าความหนืดที่ได้มาคำนวณหาแรงในการเกาะติดเนื้อเยื่อ (F) และ มาคำนวณตามสูตรที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับสูตร และ นำค่า ηadhesion กับ σ มาสร้างกราฟการทดสอบสมบัติเกาะติดเนื้อเยื่อ

$$\eta \text{ adhesion} = \eta \text{ total} - \eta \text{ m} - \eta \text{ gel} \quad \text{----------(1)}$$

$$\square = \eta \text{ adhesion } \sigma \text{ F} \quad \text{----------(2)}$$

$$\sigma = \square\gamma^{\square} \quad \text{----------(3)}$$

หมายเหตุ: γ = shear stress (Pa), σ = shear rate (s^{-1})

2.8 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ Gingival fibroblast cell

ประเมินโดยใช้ MTT assay ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (ISO 10993-5 indirect contact) นำตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ไปส่องด้วยแสง UV เพื่อฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น ละลายตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ที่ทราบปริมาณแน่นอน ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรั่ม (Serum free medium (SFM)) ที่ประกอบด้วย Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 1% l-glutamine 1% lactalbumin และ 1% antibiotic และ antimycotic ให้ได้ความเข้มข้น ตามที่ต้องการ 5 ความเข้มข้น นำ Human gingival fibroblast เซลล์ใน DMEM ที่มี 10% ซีรั่ม ความหนาแน่นของเซลล์ 8000 เซลล์ใน 100 ไมโครลิตร หยอดลงใน 96-well plates นำไปเพาะเลี้ยงจนเซลล์เกาะที่ก้น plate เป็นเวลา 2 วัน ใน incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเซลล์เกาะที่ก้น plate แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วแทนที่ด้วยอาหารที่มีตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ละลายอยู่ นำไป incubate เป็นเวลา 1 วัน หลังจากเซลล์ได้สัมผัสกับสารละลายของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด จนครบเวลาแล้ว จึงดูดสารละลายออก ใส่สารละลาย MTT 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลงไปแทนที่ incubate เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารละลาย MTT ออก ล้างด้วยสารละลายฟอตเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.4 ละลายผลึก formazan ที่ก้น plate ที่ได้จากเซลล์ที่มีชีวิต

ด้วย DMSO 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยเครื่อง microplate reader (Universal Microplate Analyzer, Model AOPUS01 and AI53601, Packard BioScience, CT, USA). คำนวณหา % cell viability โดยหลุมที่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดละลายอยู่ (SFM) เป็นกลุ่มควบคุม (100% cell viability) (19)

2.9 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* โดยการหาค่า minimum inhibitor concentration (MIC) และ minimum fungicidal concentration (MFC)

2.9.1 การเตรียมเชื้อรา

ในระยะที่เซลล์ทุกๆเซลล์พร้อมที่จะเจริญเติบโตหรือแบ่งเซลล์ได้ มีวิธีเตรียมดังต่อไปนี้

เขี่ยโคโลนีของเชื้อที่ใช้ทดสอบที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีมาประมาณ 4-5 โคโลนี นำมาใส่ Sabouraud Dextrose Broth ที่เหมาะสมเขย่าเพื่อให้เชื้อกระจายตัวออกจากกัน นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปวัดความขุ่นให้ได้ค่าการดูดกลืนแดงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 McFarland

2.9.2 การหาค่า minimum inhibitor concentration (MIC) และ minimum fungicidal concentration (MFC)

(1) เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 100 mg/ml ใน DMSO

(2) ปิเปตสารสกัดลงในหลอดที่ 1 และ 2 ปริมาณ 500 µl

(3) เติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดที่ 2 ปริมาณ 500 µl ผสมให้เข้ากันจากนั้นปิเปตใส่หลอดที่ 3 ปริมาณ 500 µl

(4) ทำซ้ำข้อ (4) จนถึงหลอดที่ 12 จากนั้นปิเปตสารทิ้ง 500 µl

(5) นำเชื้อที่เตรียมไว้มาปิเปตใส่หลอดทุกหลอด หลอดละ 500 µl

(6) นำไปบ่มที่ 37 °C นาน 16-18 ชั่วโมง สังเกตหาความเข้มข้นต่ำสุดที่พบเชื้อเป็นค่า MIC

(7) นำหลอดที่เริ่มไม่พบเชื้อไปเพาะลงบนอาหารแข็ง Sabouraud Dextrose Agar (SDA) โดยปิเปตความเข้มข้นละ 100 µl spread จนทั่ว plate

(8) นำไปบ่มที่ 37 °C นาน 16-18 ชั่วโมง สังเกตหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ไม่พบเชื้อเป็นค่า MFC

2.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ Statistical analysis

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาจากการทำซ้ำ 3 ครั้ง ข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ใช้สถิติ one-way analysis of variance (ANOVA) สำหรับวิเคราะห์ความแตกต่าง กำหนดระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม (SPSS version 10.0 for Windows (SPSS Inc., USA))

บทที่ 3
ผลการวิจัย

3.1 การเตรียมสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดและการตรวจสอบคุณลักษณะ

3.1.1 การเตรียมสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

จากการสกัดเปลือกผลมังคุด ด้วยวิธีการ soxhlet extraction ในตัวทำละลายเอทานอลได้ผลผลิตร้อยละ (% yield) ของปริมาณสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด เท่ากับ 16.37 ± 1.76 (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ซึ่งสามารถอธิบายได้จากกฎของ like dissolve like คือ ตัวถูกละลายจะสามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติเหมือนกัน เช่น ตัวทำละลายที่มีขั้วจะสามารถละลายตัวถูกละลายที่มีขั้ว เพราะมีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลเป็นแรงไดโพล์-ไดโพล์ (Dipole-dipole force) และในทางตรงกันข้ามตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วก็สามารถละลายตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วได้เช่นกัน ดังนั้นตัวทำละลายเอทานอลจึงสามารถละลายสารสำคัญในเปลือกผลมังคุด คือ สารแอลฟาแมงโกสติน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มแซนโทน ที่เป็นสารมีขั้วต่ำออกมาได้

3.1.2 การหาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดเปลือกผลมังคุด

สารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ในเอทานอล ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะมีสารสำคัญแอลฟาแมงโกสติน (alpha-mangostin) 9.11 ± 0.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.1.3 การศึกษาฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดด้วยวิธี 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical assay โดยเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid

จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical assay โดยมีกลไกการต้านอนุมูลอิสระแบบ scavenging กล่าวคือ สารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะให้โปรตอนแก่ DPPH ทำให้ DPPH ถูกรีดิวซ์เปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ซึ่งส่งผลให้การดูดกลืนแสงได้ลดลง จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดทำให้สารละลาย DPPH เปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง และวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น โดยมีความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (half maximum inhibitory concentration: IC_{50}) เท่ากับ 43.67 ± 4.62 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่า ascorbic acid อยู่ 6.07 เท่า ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของ ascorbic acid และสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

Sample	IC_{50} (µg/ml)
Ascorbic acid	7.20 ± 0.53
สารสกัดจากเปลือกผลมังคุด	43.67 ± 4.62

3.2 การตั้งตำรับการตั้งตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

3.2.1 ศึกษาอุณหภูมิในการก่อเจลของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่ประกอบด้วย โพล็อกซาเมอร์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.2.1.1 การเตรียมสารละลายผสมระหว่าง EDTA และ ไคโตซาน ที่สามารถละลายเข้ากัน ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางกายภาพในแต่ละอัตราส่วนระหว่าง Chitosan กับ EDTA

อัตราส่วนระหว่าง CS:EDTA	ลักษณะทางกายภาพ
1%CS : 0.2%EDTA	+
1%CS : 0.4%EDTA	0
1%CS : 0.8%EDTA	+
1.5%CS : 0.4%EDTA	+
1.5%CS : 0.6%EDTA	+
1.5%CS :0.8%EDTA	0
2%CS : 0.4%EDTA	+
2%CS : 0.8%EDTA	+
2%CS : 1.2%EDTA	0

หมายเหตุ: 0 = ไม่มีตะกอน

\+ = มีตะกอน

จากการศึกษาอัตราส่วนระหว่าง EDTA และไคโตซานที่สามารถละลายเข้ากันได้พอดี พบว่าปริมาณของไคโตซานที่ 1%, 1.5% และ 2% จะสามารถละลายเข้ากันได้ดีในน้ำเมื่อผสม EDTA ในปริมาณ 0.4%, 0.8% และ 1.2% ตามลำดับ เนื่องจากไคโตซานเป็นสารที่มีโมกุลใหญ่ ละลายน้ำในสภาวะที่เป็นกรด และมีประจุเป็นบวก เมื่อผสมกับ EDTA ที่มีประจุลบ ทำให้สามารถจับกับไคโตซานจะเกิดแรงระหว่างโมเลกุล คือ แรงไอออนิก (Ionic force) จึงสามารถละลายไคโตซานในน้ำได้ดียิ่งขึ้น

3.2.1.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol-gel}$) ของ Poloxamer 407 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากการศึกษาอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะจากของสารละลายกลายเป็นเจล ($T_{sol-gel}$) พบว่า $T_{sol-gel}$ ของ PLX407 มีค่าขึ้นกับความเข้มข้น กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของ PLX407 มากขึ้นส่งผลให้ $T_{sol-gel}$ ของตำรับเจลต่ำลง ดังตารางที่ 11 เนื่องจาก PLX407 ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ คือ polyoxyethylene ,polyoxypropylene ตามลำดับ เมื่อ สารละลาย PLX407 มีอุณหภูมิสูงขึ้นจนถึงจุด critical micelle concentration (CMC) โครงสร้างของPLX407 จะมีการเปลี่ยนแปลงโดยส่วนที่ชอบน้ำ(polyoxyethylene) จะหันออกด้านนอกและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ

(polyoxypropylene) จะหันเข้าด้านในจับกันเกิดเป็น micelle จากนั้นเมื่ออุณหภูมิสูงถึงจุด critical gelation concentration (CGC)จะเกิดกระบวนการ dehydration ทำให้เกิด micelle เกิดการเกาะกลุ่มกันแน่นขึ้นและเกิดเป็นเจลในที่สุด

ตารางที่ 4 แสดงอุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล ($T_{sol\text{-}gel}$) ของ PLX407 ที่ 14, 14.5, 14.75, 14.9, 15, 15.5, 16, 17, 18, 19, 20 %w/w

Poloxamer407 (%w/w)	$T_{sol\text{-}gel}$ (°C)
14	>50
14.5	36.67 ± 0.58
14.75	35.00 ± 0.87
14.9	36.67 ± 1.53
15	32.83 ± 0.29
15.5	31.33 ± 0.76
16	30.17 ± 0.76
17	27.33 ± 0.58
18	26.00 ± 1.00
19	23.00 ± 0.00
20	24.67 ± 2.31

3.2.1.3 การศึกษาสัดส่วนและปริมาณของ PLX407 ร่วมกับ 2%CS ที่มีผลต่ออุณหภูมิที่เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะระหว่างสารละลายและเจล

จากการทดลองพบว่าเมื่อนำPLX407 มาผสมกับ 2**%** CS ทำให้อุณหภูมิทีทำให้เกิดการเปลี่ยนสถานะจากสารละลายกลายเป็นเจล ($T_{sol\text{-}gel}$) เพิ่มสูงขึ้น จึงพิจารณาเพิ่มความเข้มข้นของ PLX407 เพื่อให้สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะเป็นเจลที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และไม่มีตะกอน

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะทางกายภาพ เมื่อผสม 2%CS และ 14.9%PLX407 ที่ใช้เตรียมในสัดส่วนต่างๆ ในที่เย็น

ความเข้มข้นของ PLX407	**อัตราส่วน 2%CS : PLX407**	**ลักษณะทางกายภาพ**	**T sol-gel (°C)**
14.9%	0.5 : 9.5	0	>50
	1 : 9	0	>50
	2 : 8	0	>50
16%	0.5 : 9.5	0	>50
	1 : 9	0	>50
	2 : 8	0	>50
17%	0.5 : 9.5	+	29.67 ± 0.57
	1 : 9	+	38.3 ± 2.08
	2 : 8	0	>50
18%	0.5 : 9.5	0	26.50±0
	1 : 9	0	35.67±0.58
	2 : 8	+	>50

หมายเหตุ: 0 = ไม่มีตะกอน

+ = มีตะกอนเล็กน้อย

++ = มีตะกอนปานกลาง

3.2.2 ศึกษาการตั้งตำรับยาเจลที่ไวอุณหภูมิร่วมกับพอลิเมอร์ชนิดต่างๆในอัตราส่วนต่างๆ กัน

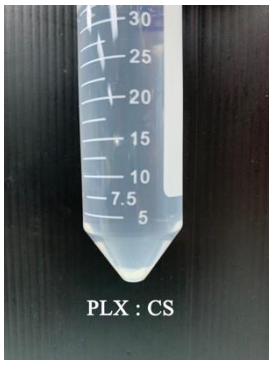
ตารางที่ 6 แสดงส่วนประกอบของเจลไคโตซานไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

ตำรับ	Code	ส่วนประกอบ (g)		
		Poloxamer (PLX)	Chitosan (CS)	Extract (EX)
18% poloxamer 407	PLX	100.01	-	-
18% poloxamer 407 กับสารสกัด 1 mg/g	PLX : EX 1	98.03	-	0.1004
18% poloxamer 407 กับสารสกัด 2.5 mg/g	PLX : EX 2.5	98.00	-	0.2514
18% poloxamer 407 กับสารสกัด 5 mg/g	PLX : EX 5	98.03	-	0.5025
18% poloxamer 407 กับ 2% chitosan (CS)	PLX : CS	90.02	10.00	-
18% poloxamer 407, 2% chitosan (CS) และ สารสกัด 1 mg/g	PLX : CS : EX 1	98.20	9.81	0.1000
18% poloxamer 407, 2% chitosan (CS) และ สารสกัด 2.5 mg/g	PLX : CS : EX 2.5	98.23	9.80	0.2504
18% poloxamer 407, 2% chitosan (CS) และ สารสกัด 5 mg/g	PLX : CS : EX 5	98.26	9.81	0.5001

3.3 ทดสอบคุณลักษณะทางกายภายและเคมีของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

3.3.1 ลักษณะภายนอกของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่าง

ตารางที่ 7 แสดงภาพถ่ายลักษณะตำรับเจล

ลักษณะตำรับเจล			
ตำรับ PLX	ตำรับ PLX : EX 1	ตำรับ PLX : EX 2.5	ตำรับ PLX : EX 5
			
ตำรับ PLX : CS	ตำรับ PLX : CS : EX 1	ตำรับ PLX:CS:EX 2.5	ตำรับ PLX : CS : EX 5

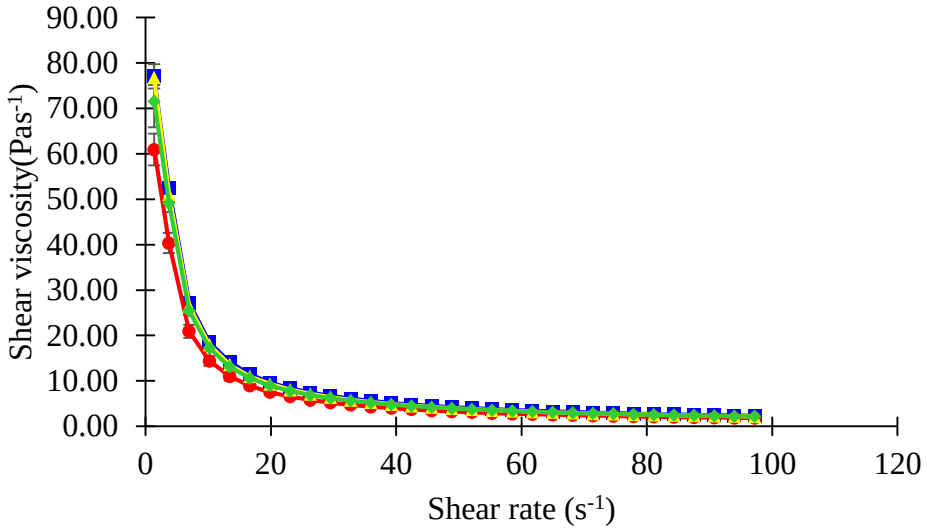
ตารางที่ 8 แสดงลักษณะทางกายภาพของตำรับเจล

ตำรับยาเจล	ความใส	ลักษณะสีของตำรับ	pH	$T_{sol-gel}$
PLX	0	0	6.87 ± 0.06	22.50 ± 0.50
PLX : EX 1	0	+1	6.81 ± 0.02	23.17 ± 0.29
PLX : EX 2.5	0	+2	6.26 ± 0.05	23.67 ± 0.58
PLX : EX 5	0	+3	5.25 ± 0.11	22.83 ± 0.29
PLX : CS	0	0	3.35 ± 0.03	35.00 ± 0.00
PLX : CS : EX 1	0	+1	3.40 ± 0.08	36.00 ± 0.00
PLX : CS : EX 2.5	0	+2	3.38 ± 0.01	36.33 ± 0.58
PLX : CS : EX 5	0	+3	3.44 ± 0.01	35.00 ± 0.00

หมายเหตุ: ความใส ;0 = ไม่ขุ่น, +1 = ขุ่นเล็กน้อย, +2 = ขุ่นปานกลาง, +3 = ขุ่นมาก
ลักษณะสีของตำรับ 0 = ใส, +1 = มีสีเหลืองอ่อน, +2 = มีสีเหลืองปานกลาง, +3 = มีสีเหลืองเข้ม

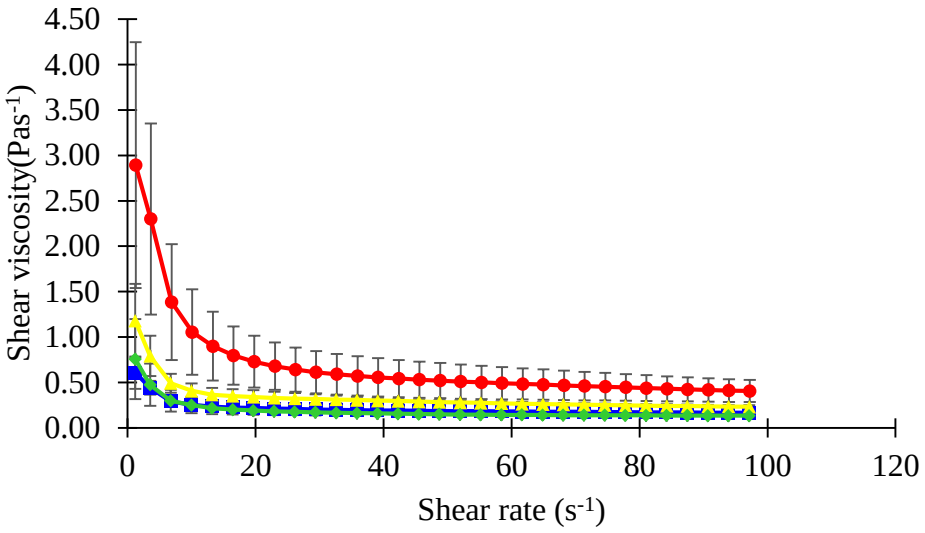
จากการทดลองพบว่า ทุกตำรับมีความใส สีของตำรับจะมีสีเหลืองเข้มขึ้นแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ในส่วนของค่าความเป็นกรด-ด่าง พิจารณาจากค่า pH ของตำรับพบว่าในตำรับที่มีไคโตซานทำให้เพิ่มความเป็นกรดมากขึ้น โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของตำรับที่มีไคโตซานอยู่ในช่วง 3.35-3.44 และพบว่าไคโตซานมีแนวโน้มในการเพิ่มอุณหภูมิในการเกิดเจล ($T_{sol-gel}$) ของตำรับ

3.3.2 ค่าความหนืด



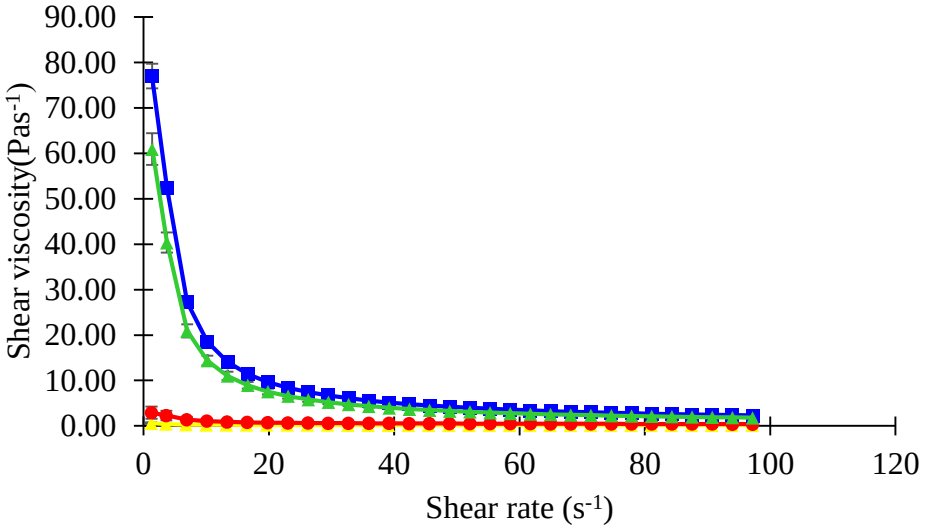
หมายเหตุ: = PLX = PLX : EX 1 = PLX : EX 2.5 = PLX : EX 5

รูปที่ 1 กราฟแสดงผลการวัดความหนืดของตำรับยาเจลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสของตำรับที่ไม่มี ไคโตซาน



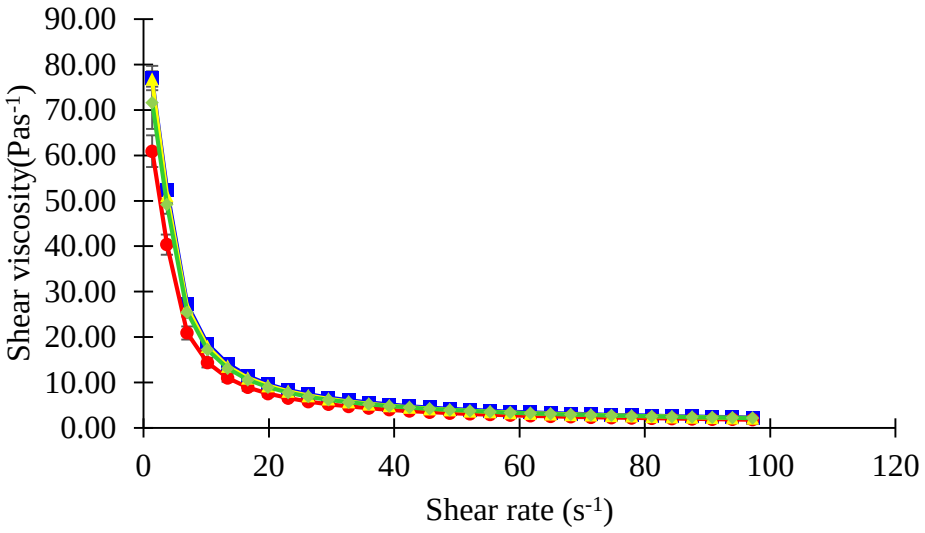
หมายเหตุ: = PLX : CS = PLX : CS : EX 1 = PLX : CS : EX 2.5 = PLX : CS : EX 5

รูปที่ 2 กราฟแสดงผลการวัดความหนืดของตำรับยาเจลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสของตำรับที่มี ไคโตซาน



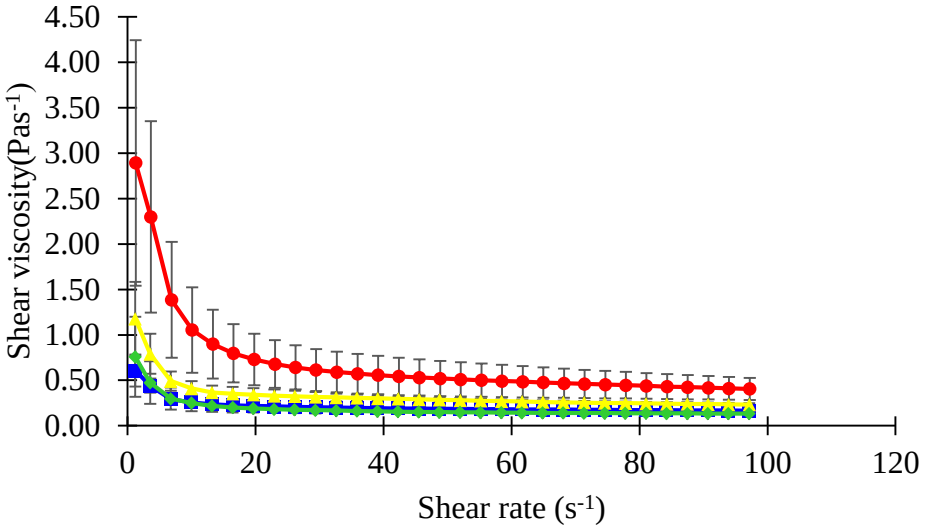
หมายเหตุ: = PLX = PLX : EX 5 = PLX : CS = PLX : CS : EX 5

รูปที่ 3 กราฟแสดงผลการวัดความหนืดเปรียบเทียบระหว่างตำรับยาเจลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสของตำรับที่มี ไคโตซานและไม่มีไคโตซานเป็นส่วนประกอบ



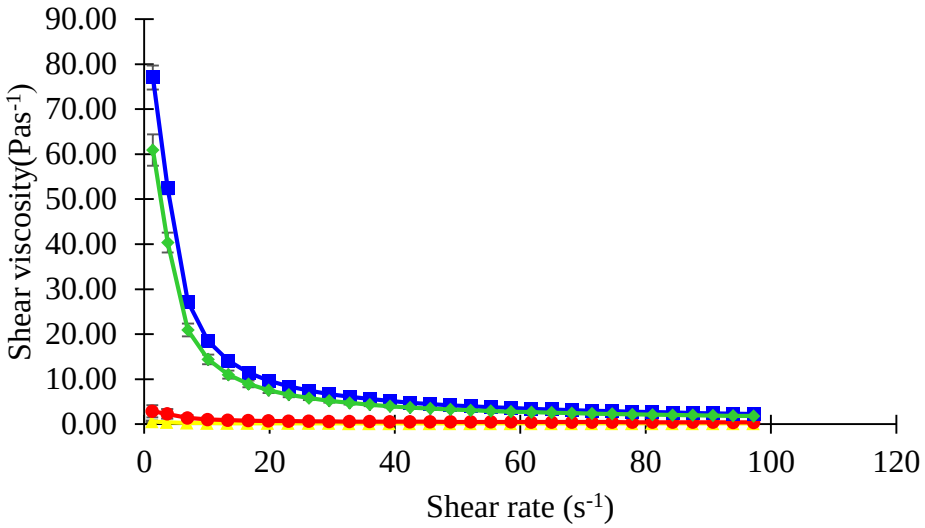
หมายเหตุ: = PLX = PLX : EX 1 = PLX : EX 2.5 = PLX : EX 5

รูปที่ 4 กราฟแสดงผลการวัดความหนืดของตำรับยาเจลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสของตำรับที่ไม่มี ไคโตซาน



หมายเหตุ: = PLX : CS = PLX : CS : EX 1 = PLX : CS : EX 2.5 = PLX : CS : EX 5

รูปที่ 5 กราฟแสดงผลการวัดความหนืดของตำรับยาเจลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสของตำรับที่มี ไคโตซาน



หมายเหตุ: = PLX = PLX : EX 5 = PLX : CS = PLX : CS : EX 5

รูปที่ 6 กราฟแสดงผลการวัดความหนืดเปรียบเทียบระหว่างตำรับยาเจลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสของตำรับที่มี ไคโตซานและไม่มีไคโตซานเป็นส่วนประกอบ

จากการทดลองพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะส่งผลให้ทุกตำรับมีความหนืดเพิ่มขึ้น จากคุณสมบัติของ PLX407 ที่สามารถเปลี่ยนสถานะจากสารละลายกลายเป็นเจลเมื่อมีอุณหภูมิที่สูงขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างตำรับที่ไม่มีไคโตซานกับตำรับที่มีไคโตซานพบว่า ตำรับที่มีไคโตซานจะทำให้ความหนืดของตำรับลดลง

3.3.3 การหาปริมาณสารแอลฟาแมงโกสติน ในตำรับยาเจล ด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

ตารางที่ 9 แสดง %content ของตำรับยาเจล

ตำรับยาเจล	%content
PLX : EX 1	124.54 ± 1.76
PLX : EX 2.5	116.57 ± 2.72
PLX : EX 5	103.54 ± 1.74
PLX : CS : EX 1	114.09 ± 2.28
PLX : CS : EX 2.5	84.71 ± 4.60
PLX : CS : EX 5	77.31 ± 1.50

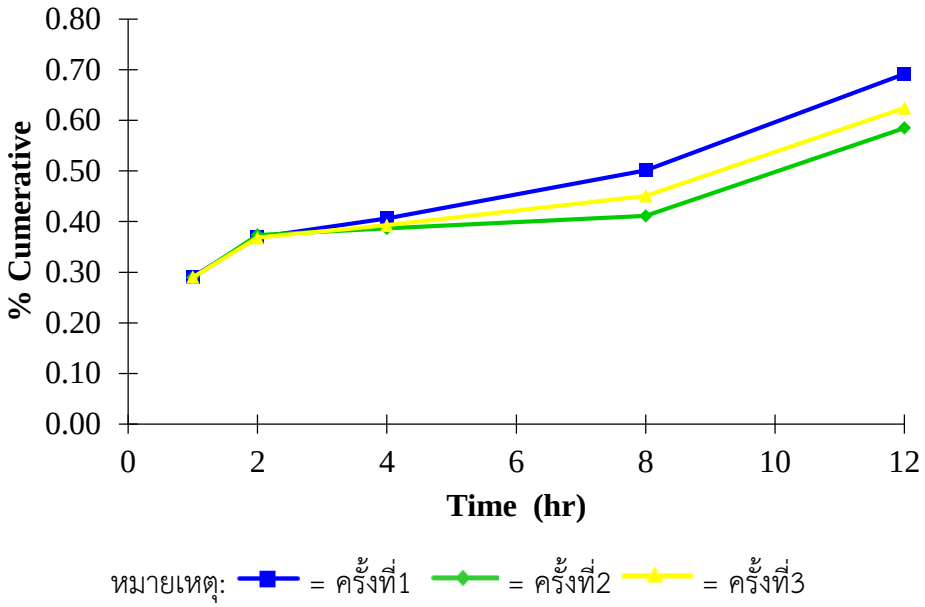
หมายเหตุ: สมการปริมาณของสาร alpha-mangostin จากการทำ standard curve คือ

$$y = 180.76x - 69.476$$

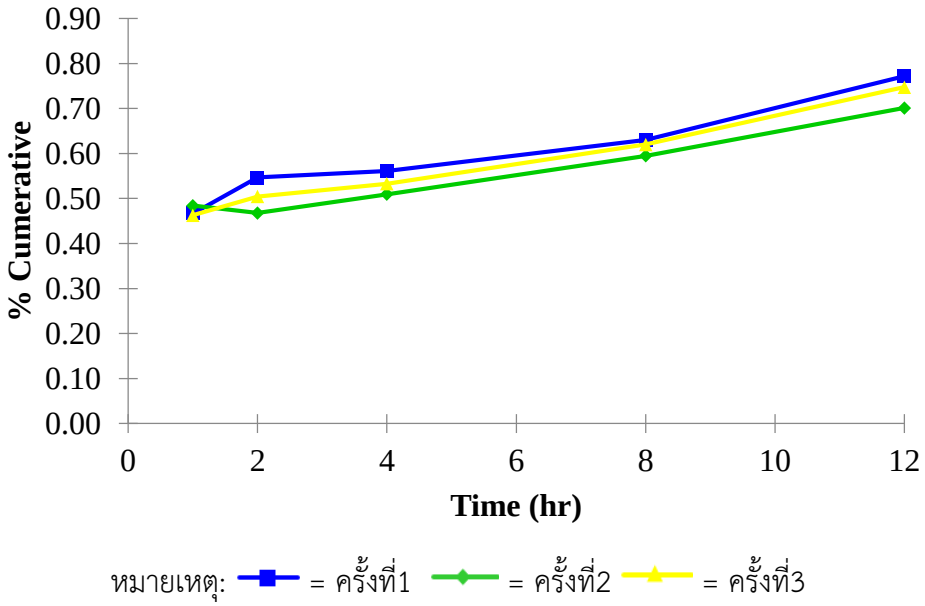
y คือ พื้นที่ใต้กราฟ (Area under the curve: AUC)

x คือ ความเข้มข้นของสารสำคัญแอลฟาแมงโกสติน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

3.3.4 การศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญ



รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Cumulative ของสารที่ปลดปล่อยจากตำรับ กับเวลา ของตำรับ 18% poloxamer 407 กับสารสกัดเปลือกผลมังคุด 5 มิลลิกรัม/กรัม



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %Cumulative ของสารที่ปลดปล่อยจากตำรับ กับเวลา ของตำรับ 18% poloxamer 407, 2% chitosan (CS) และ สารสกัด 5 mg/g

จากการทดสอบการปลดปล่อยสารสำคัญ แอลฟาแมงโกสตินของตำรับเจลไคโตซานและไม่มีไคโตซานที่ไวต่ออุณหภูมิ ทีบรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด 5 มิลลิกรัม/กรัม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในน้ำลายเทียม พบว่าเมื่อระยะเวลานานขึ้นการปลดปล่อยสาระสำคัญออกจากตำรับจะมีปริมาณมากขึ้น โดยตำรับที่มีไคโตซานจะมีการปลดปล่อยสารสำคัญได้มากกว่าตำรับที่ไม่มีไคโตซานเป็นส่วนประกอบ

ตารางที่ 10 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์การคำนวณปลดปล่อยสะสมของสารแอลฟาแมงโกสติน

Formula	Curve fitting constant (R^2)				
	Zero order	First order	Kosmeyer-peppas	Hickson-Crowell	Higuchi
PLX : EX 5	0.9365	0.9284	0.8999	0.9351	0.2364
PLX : CS : EX 5	0.9873	0.9925	0.9063	0.9919	-1.6923

การทดสอบการปลดปล่อยของสารสกัดสำคัญแอลฟาแมงโกสตินของตำรับยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่ 37 องศาสเซลเซียสในช่วงเวลา 1, 2, 4, 8 และ 12 ชั่วโมง ในน้ำลายเทียม pH 6.8 ± 0.05 พบว่าตำรับ PLX : EX 5 นั้นมีการปลดปล่อยลักษณะของสารสำคัญแอลฟาแมงโกสตินเมื่อพิจารณาจากค่า R^2 ใกล้เคียงกับแบบจำลองปฏิกิริยาอันดับศุนย์ (Zero order reaction) R^2 = 0.9365 ซึ่งการปลดปล่อยในลักษณะนี้จะมีอัตราการปลดปล่อยแบบคงที่โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสำคัญในตำรับ และตำรับ PLX : CS : EX 5 พบว่ามีการปลดปล่อยลักษณะของสารสำคัญแอลฟาแมงโกสตินเมื่อพิจารณาจากค่า R^2 ใกล้เคียงกับแบบจำลองปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง (First order reaction) R^2 = 0.9925 ซึ่งการปลดปล่อยในลักษณะนี้จะมีอัตราการปลดปล่อยแบบขึ้นกับความเข้มข้นของสารสำคัญในตำรับ

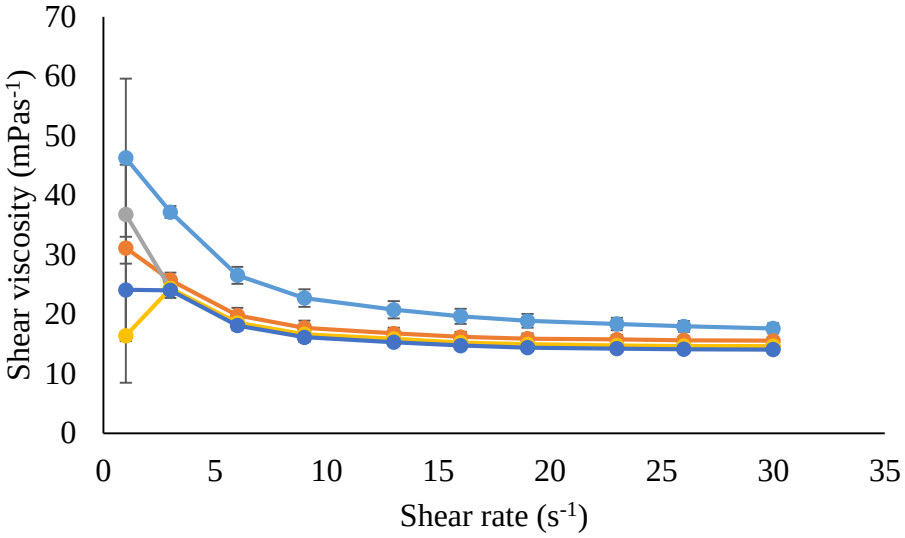
3.4 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยาเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

ตารางที่ 11 แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของตำรับเจล

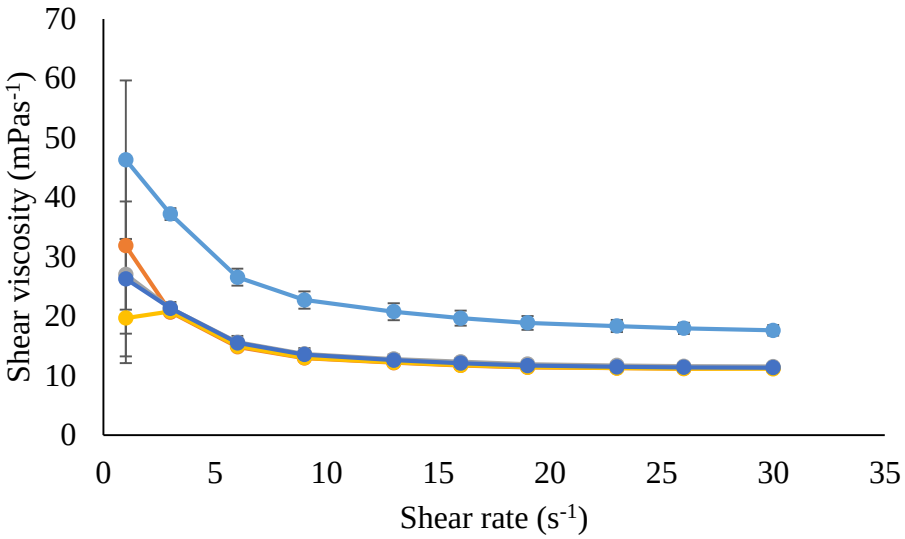
Sample	IC_{50} (µg/ml)
PLX407	N/A
PLX407 : EX 1	58.67 ± 3.05
PLX407 : EX 2.5	29.33 ± 1.15
PLX407 : EX 5	13.57 ± 0.21
PLX407 : CS	N/A
PLX407 : CS : EX 1	82.33 ± 2.31
PLX407 : CS : EX 2.5	38.33 ± 0.58
PLX407 : CS : EX 5	13.20 ± 0.40

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของตำรับเจลไคโตซานที่ไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด พบว่า ตำรับที่ไม่มีส่วนประกอบของสารสกัดไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และพบว่าตำรับที่มีสารสกัดปริมาณสูงขึ้นจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น

3.5 การทดสอบการเกาะติดเนื้อเยื่อของตำรับเจลด้วยวิธี viscometer method



รูปที่ 9 กราฟแสดงผลการวัดการยึดติดเนื้อเยื่อของตำรับยาเจลไม่มีไคโตซานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



รูปที่ 10 กราฟแสดงผลการวัดการยึดติดเนื้อเยื่อของตำรับยาเจลผสมไคโตซานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

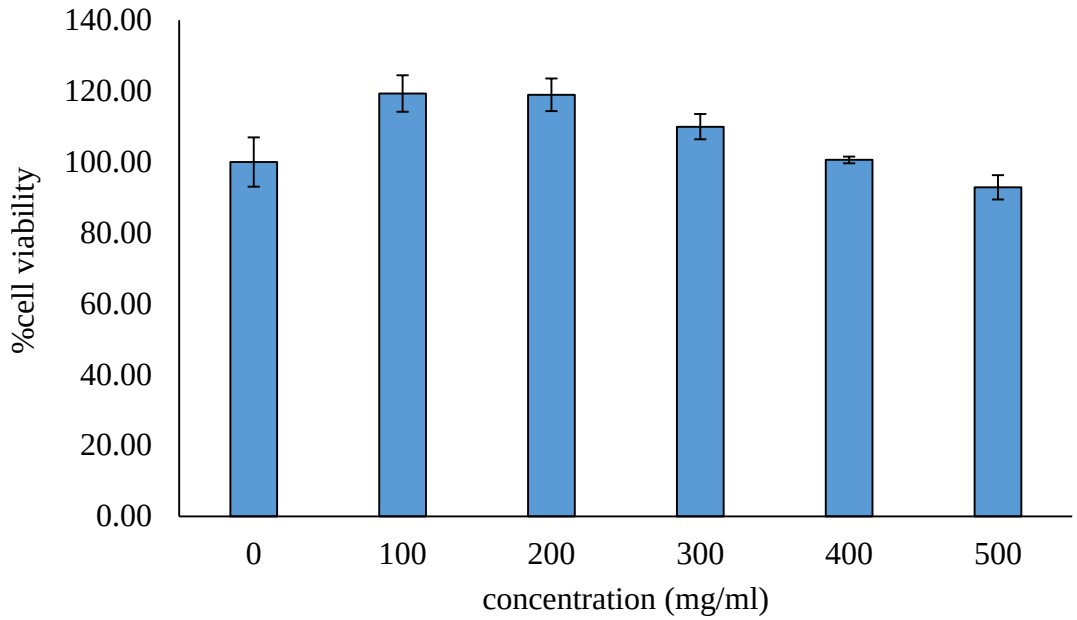
ตารางที่ 12 แสดง shear viscosity ของตำรับเจลที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ rate ที่ 1 s^{-1} 37 องศาเซลเซียส

สูตรตำรับ	shear viscosity ที่ shear rate 1 s^{-1} 37 องศาเซลเซียส
Mucin	46.33 ± 13.30
PLX	31.17 ± 15.69
PLX : EX 1	36.83 ± 8.32
PLX : EX 2.5	16.40 ± 7.91
PLX : EX 5	24.10 ± 7.21
PLX : CS	27.04 ± 5.91
PLX : CS : EX 1	31.87 ± 14.80
PLX : CS : EX 2.5	19.70 ± 7.55
PLX : CS : EX 5	26.30 ± 13.02

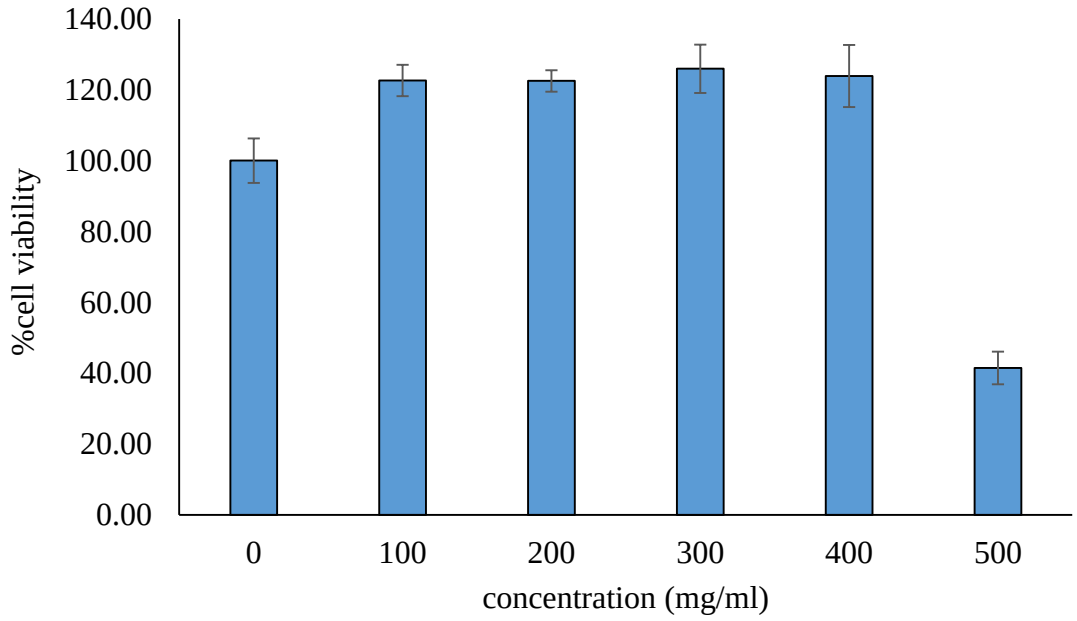
จากการศึกษาการยึดติดเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าตำรับที่มีส่วนประกอบของไคโตซาน จะมีแรงในการยึดติดเนื้อเยื่อได้มากกว่าตำรับที่ไม่มีส่วนประกอบของไคโตซานในตำรับที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่ 2.5 และ5 มิลลิกรัม/กรัม

3.6 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ Gingival fibroblast cell

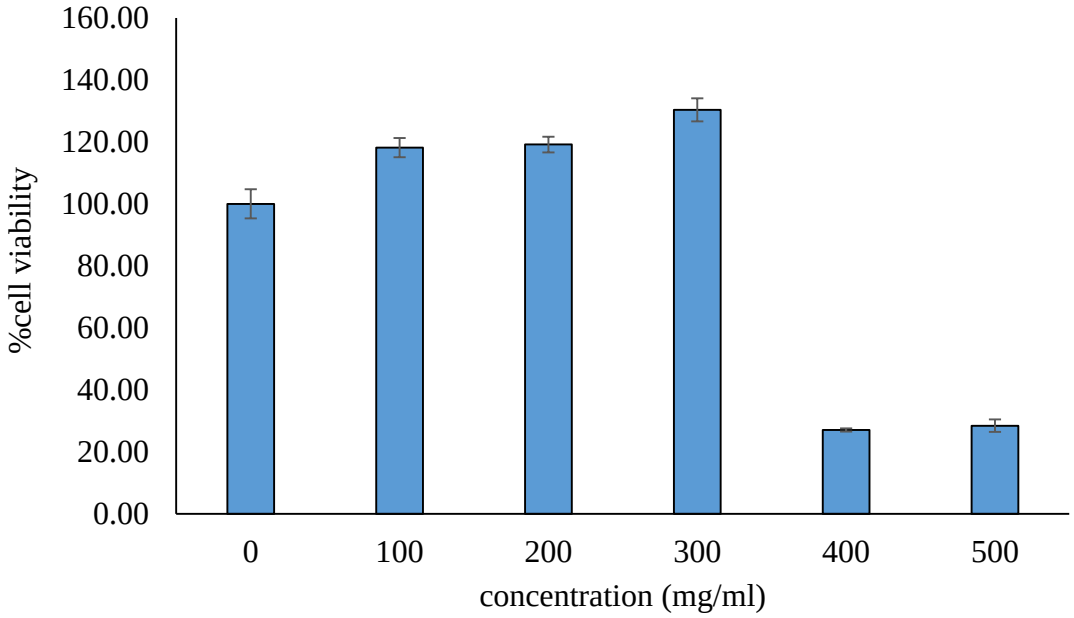
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ Human gingival fibroblast ด้วยวิธี MTT ของตำรับเจล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 11 – 16



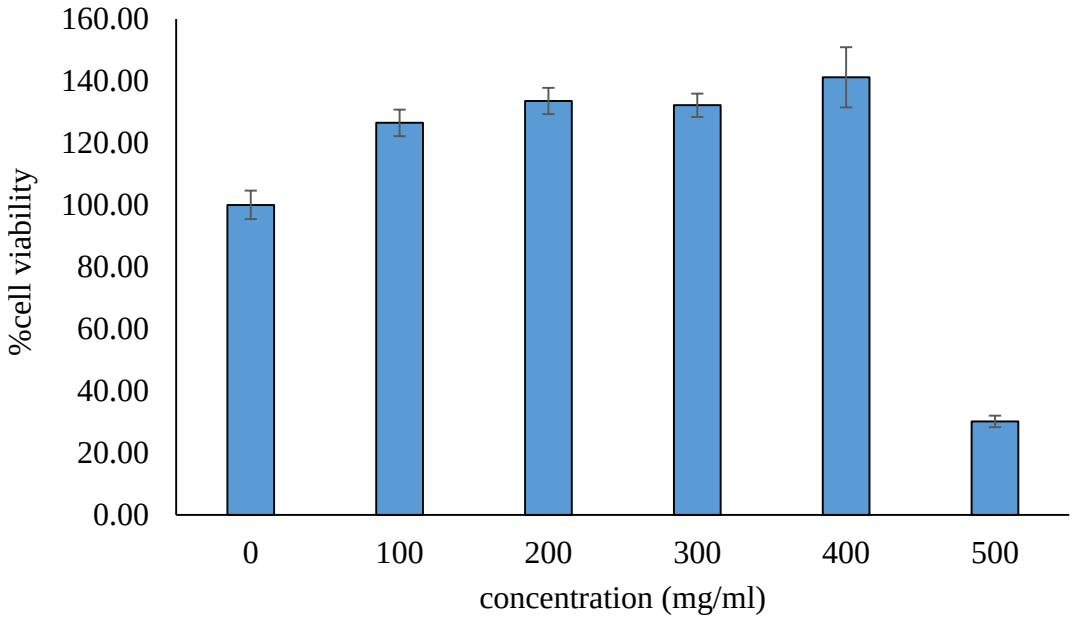
รูปที่ 11 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



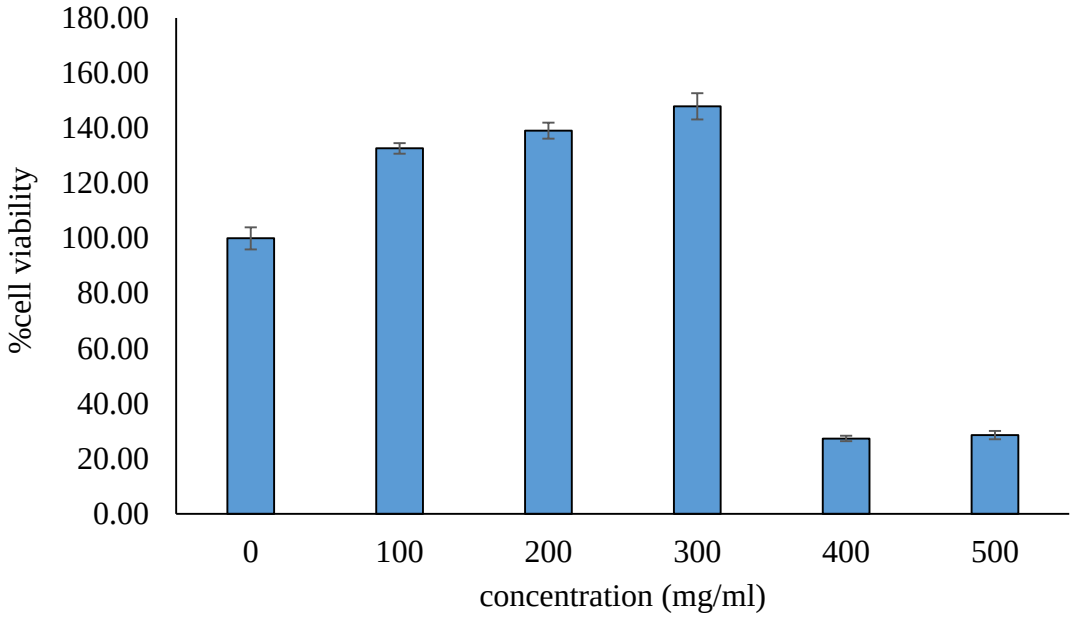
รูปที่ 12 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : EX : 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



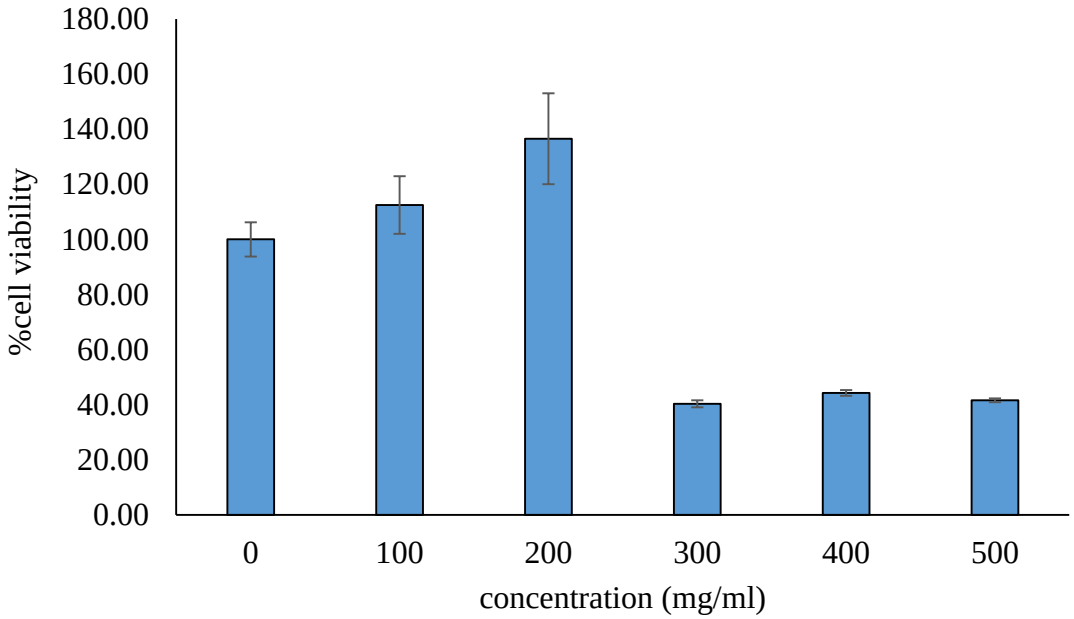
รูปที่ 13 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : EX : 5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 14 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : CS ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 15 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : CS : EX : 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

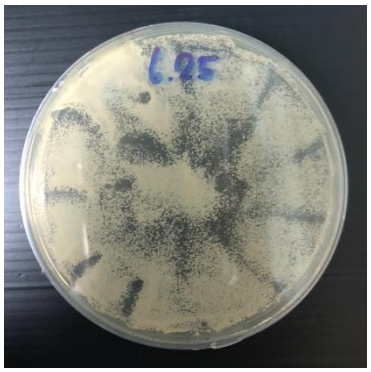


รูปที่ 16 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : CS : EX : 5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* โดยการหาค่า minimum inhibitor concentration (MIC) และ minimum fungicidal concentration (MFC)

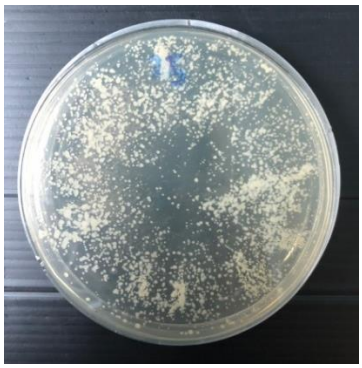
ตารางที่ 13 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Candida albicans* โดยการหาค่า minimum fungicidal concentration (MFC) ของสารสกัดใน 50% DMSO

Minimum fungicidal concentration (MFC) ของสารสกัดใน 50% DMSO

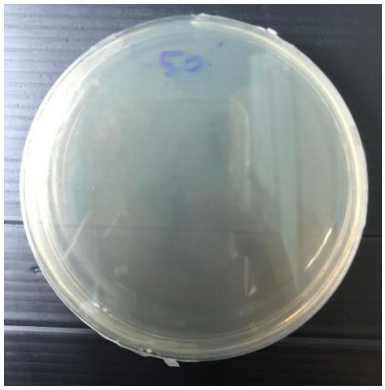


สารสกัด 6.25 mg/ml

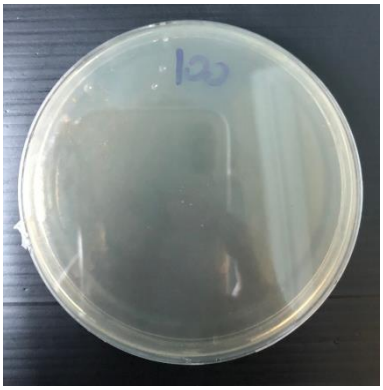
สารสกัด 12.5 mg/ml



สารสกัด 25 mg/ml



สารสกัด 50 mg/ml



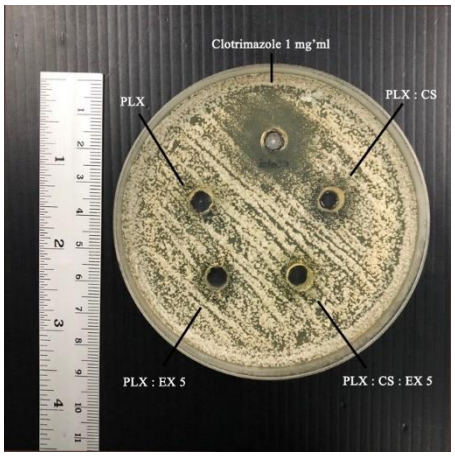
สารสกัด 100 mg/ml

จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Candida albicans* ของสารสกัดเปลือกผลมังคุดใน 50%DMSO พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้(MIC) คือ 6.25 % และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้(MFC) คือ 50 % ดังตาราง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaomongkolgit et al. (2009) ที่ได้ศึกษาว่าสาระสำคัญ แอลฟาแมงโกสตินมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Candida albicans* ได้

ตารางที่ 14 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Candida albicans* โดยการหาค่า minimum inhibitor concentration (MIC) ของตำรับ

ตำรับ	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้(MIC)	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้(MFC)
PLX : EX 1	N/A	N/A
PLX : EX 2.5	N/A	N/A
PLX : EX 5	100%	N/A
PLX : CS : EX 1	N/A	N//A
PLX : CS : EX 2.5	N/A	N/A
PLX : CS : EX 5	100%	N/A

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* (MIC) ของตำรับพบว่าตำรับที่มีปริมาณสารสกัด 5 มิลลิกรัม/กรัม สามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ความเข้มข้น 100% ขณะที่ตำรับอื่นไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ ในส่วนของความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Candida albicans* (MFC) ไม่มีตำรับใดเลยที่สามารถฆ่าเชื้อได้ แต่พบว่าตำรับที่มีส่วนประกอบของไคโตซานและสารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้ดีกว่า และ ความสามารถในการยับยั้งและฆ่าเชื้อขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในตำรับ

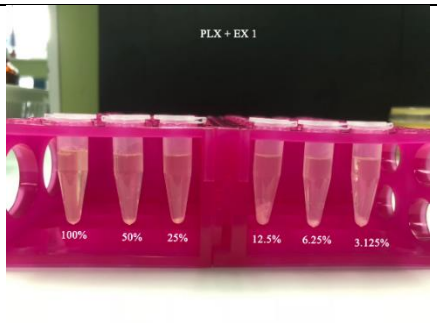


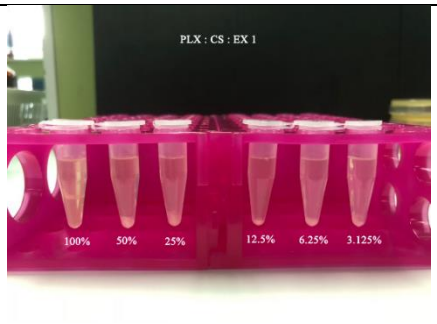
รูปที่ 17 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Candida albicans* ของตำรับเจล

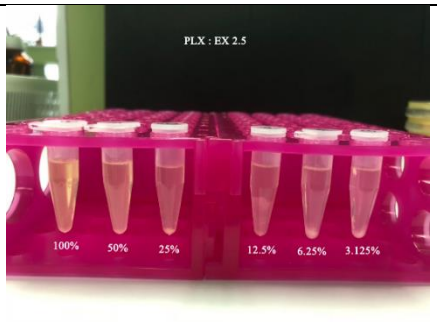
จากการทดลองพบว่าไม่สามารถวัด clear zone ได้ เนื่องจากตำรับเจลไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้เป็นวงใส แต่พบว่ารอบๆเจลเชื้อมีการเจริญเติบโตที่ลดลง เมื่อเทียบกับบริเวณรอบข้าง ในส่วนของ clotrimazole พบว่าสามารถวัด clear zone ได้

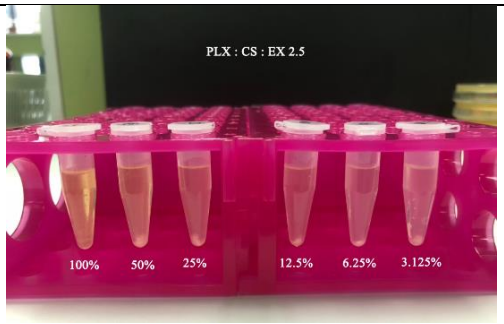
ตารางที่ 15 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Candida albicans* โดยการหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของตำรับ

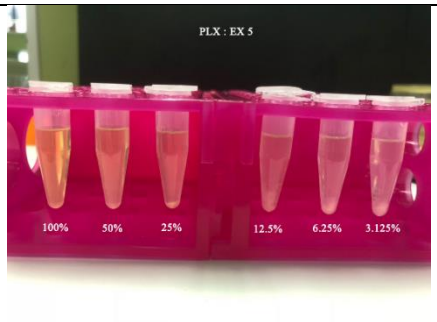
<table>
<tr><th colspan="2">Minimum inhibitory concentration (MIC) ของตำรับ</th></tr>
<tr><td colspan="2">

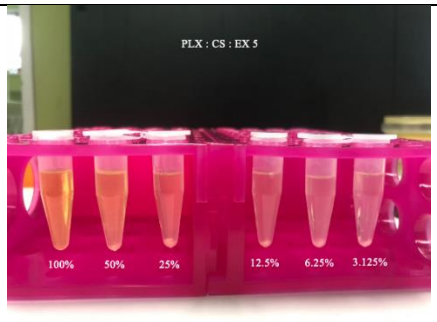
ยา Clotrimazole 1 mg/ml</td></tr>
<tr><td> 

ตำรับ PLX : EX 1</td><td> 

ตำรับ PLX : CS : EX 1</td></tr>
<tr><td> 

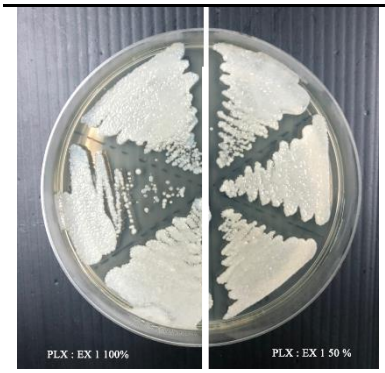
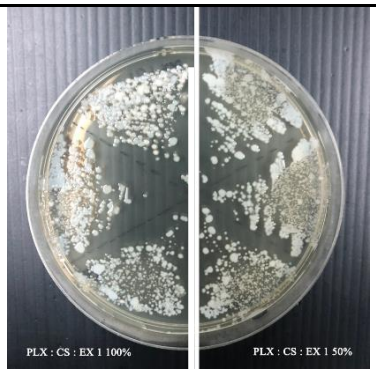
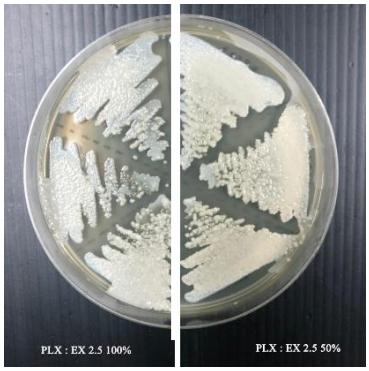
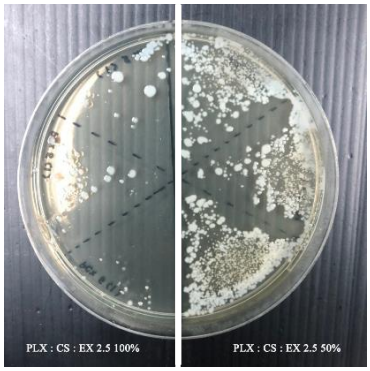
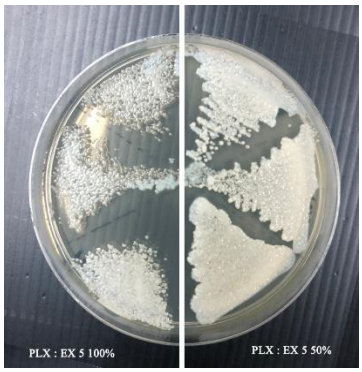
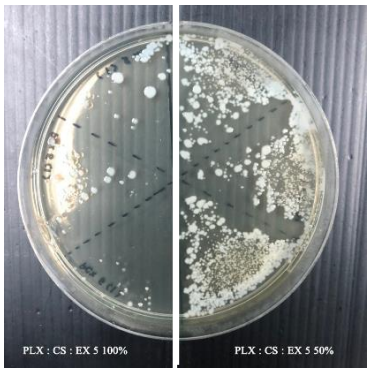
ตำรับ PLX : EX 2.5</td><td> 

ตำรับ PLX : CS : EX 2.5</td></tr>
<tr><td> 

ตำรับ PLX : EX 5</td><td> 

ตำรับ PLX : CS : EX 5</td></tr>
</table>

ตารางที่ 16 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Candida albicans* โดยการหาค่า minimum fungicidal concentration (MFC) ของตำรับ

Minimum fungicidal concentration (MFC) ของตำรับ	
	
ตำรับ PLX : EX 1 100% (ซ้าย) 50% (ขวา)	ตำรับ PLX : CS : EX 1 100% (ซ้าย) 50% (ขวา)
	
ตำรับ PLX : EX 2.5 100% (ซ้าย) 50% (ขวา)	ตำรับ PLX : CS : EX 2.5 100% (ซ้าย) 50% (ขวา)
	
ตำรับ PLX : EX 5 100% (ซ้าย) 50% (ขวา)	ตำรับ PLX : CS : EX 5 100% (ซ้าย) 50% (ขวา)

บทที่ 4
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาการพัฒนาเจลไคโตซานไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด เพื่อรักษาการติดเชื้อ *Candida albicans* ในช่องปากโดยใช้สารก่อเจลคือ poloxamer 407 ซึ่งความสามารถในการก่อเจลขึ้นกับความเข้มข้นและอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง ทั้งนี้สารละลาย poloxamer สามารถเปลี่ยนสถานะจากสารละลายเป็นเจลได้ในช่องปาก อย่างไรก็ตาม poloxamer มีการเกาะติดเนื้อเยื่อที่ต่ำ จึงมีความจำเป็นต้องใช้พอลิเมอร์ ที่มีคุณสมบัติในการเกาะติดเนื้อเยื่อที่ดีมาช่วยเสริมประสิทธิภาพในการเกาะติดเนื้อเยื่อ โดยพิจารณานำไคโตซานมาเป็นส่วนประกอบในตำรับ พบว่าตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่สามารถก่อเจลได้ในช่องปากของมนุษย์ ที่มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 35.5-37.5 องศาเซลเซียสคือ 18%PLX : 2%CS อัตราส่วน 9 : 1 โดยบรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/กรัม โดยพบว่าตำรับดังกล่าวมีความเป็นกรดอ่อน และมีลักษณะสีเหลืองใส ซึ่งความเข้มข้นของสีแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดในตำรับ จากการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH radical assay พบว่าการตั้งตำรับเจลไคโตซานไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกมังคุด พบว่าในตำรับที่มีไคโตซานเป็นส่วนประกอบจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มากกว่าตำรับที่ไม่มีไคโตซานและตำรับที่มีความเข้มข้นของสารสกัดมากจะมีฤทธิ์นการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าด้วย สำหรับการศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญในระยะเวลา 12 ชั่วโมงในน้ำลายเทียม พบว่าปริมาณสารสำคัญจะถูกปลดปล่อยออกมามากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น โดยตำรับที่บรรจุไคโตซานจะสามารถปลดปล่อยสารสำคัญได้มากกว่าตำรับที่ไม่ได้บรรจุไคโตซาน นอกจากนี้คุณสมบัติในการเกาะติดเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ในน้ำลายเทียมที่ pH 6.8 ± 0.05 ในตำรับที่มีไคโตซานจะสามารถเกาะติดเนื้อเยื่อได้ดีกว่าตำรับที่ไม่มีไคโตซานเป็นส่วนประกอบ จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ Human gingival fibroblast พบว่า ตำรับเจลที่มีไคโตซานเป็นส่วนประกอบมีความเป็นพิษมากกว่าตำรับที่ไม่มีไคโตซานเป็นส่วนประกอบและจากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Candida albicans* พบว่าสารสำคัญสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ *Candida albicans* ได้ที่ความเข้มข้น 6.25 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิตร ตามลำดับ โดยตำรับยาเจลที่บรรจุสารสกัดความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อได้แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ทั้งหมด และถ้าความเข้มข้นต่ำกว่า 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อได้เลย

ผลผลิตที่ให้รับจากโครงการวิจัย (Output)

1. นิสิต นักศึกษา มีความรู้ด้านการวิจัย
2. ได้สูตรตำรับเจลทาแผลในปาก จำนวน 8 สูตร
3. ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัย

1. **Charernsriwilaiwat, N.**, Manatkasemsak, A., Thunyamanorot, K., & Thawornkhun, N. (2019). Formulation of Chitosan-Ethylenediaminetetraacetic Acid/Poloxamer Gel Containing Fruit's Hull of *Garcinia mangostana* Extract. Key Engineering Materials, 819, 57–62.

Key Engineering Materials
ISSN: 1662-9795, Vol. 819, pp 57-62
doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.819.57
© 2019 Trans Tech Publications Ltd, Switzerland
Submitted: 2019-03-29
Revised: 2019-05-02
Accepted: 2019-05-24
Online: 2019-08-29

Formulation of Chitosan-Ethylenediaminetetraacetic Acid/Poloxamer Gel Containing Fruit's Hull of *Garcinia mangostana* Extract

Natthan Charernsriwilaiwat[1,a*], Apichart Manatkasemsak[1,b]
Krittapak Thunyamanorot[1,c] and Nuthaporn Thawornkhun[1,d]

[1]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi 20130, Thailand

[a]natthan@go.buu.ac.th, [b]oammanat@gmail.com, [c]krittapak.knot@gmail.com
[d]nut_kab@hotmail.com

Keywords: chitosan-ethylenediaminetetraacetic acid, poloxamer, *Garcinia mangostana* extract

Abstract. The purpose of this study was to develop the formulation of chitosan-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)/poloxamer containing *Garcinia mangostana* (GM) extract gel for oral cavity. The GM extract with a concentration of 0.5% w/w was incorporated into a gel formulation. The physical appearance, pH, viscosity and percentage label amount of GM extract gel were performed. The in vitro antioxidant activity of gel were evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. The antibacterial activity against Staphylococcus aureus was evaluated by the zone of inhibition method. The mucoadhesive property was investigated using viscosity technique. The results illustrate that the chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel had a yellow colour of GM extract. The pH of a gel was in the range of 4.47 – 6.87. The percentage label amount of gel was in the range of 98.71 – 99.37% and the viscosity of gel were in the range of 9607 – 14784 mPa/s. The Sol-Gel temperature ($T_{Sol-Gel}$) was 35 °C. All gel exhibited antioxidant activity which evaluated by DPPH method. The zone of inhibition of gel against S.aureus was in the range of 8.17 – 10.52 mm. The chitosan-EDTA may improve the mucoadhesive property of gel. In conclusion, the chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel may have the potential for pharmaceutical application.

Introduction

Garcinia mangostana or mangosteen (GM) is a tropical fruit found in Southeast Asia. In Thailand, people have used the hull of GM as a medicine for the cure of diarrhoea, abdominal pain, acne, wound and chronic ulcer. In a previous study, the activities of fruit's hull of GM extract was reported such as antioxidant activities antibacterial activity and wound healing effect [1, 2]. α mangostin was found as the major compounds in the GM extract. Due to the great activities of GM extract, we decided to formulate thermal sensitive in situ gel using poloxamer 407 containing GM extract. However, this gel exhibit low bioavailability due to it can easies removed form buccal cavity [3]. Addition of mucoadhesive polymer is a very much useful technique for improving the bioavailability of gel formulations. Many various polymers such as sodium carboxymethylcellulose, chitosan and carbopol were investigated. Chitosan is the deacetylation of chitin. Chitosan composes of −OH and $-NH_2$ groups which can generate hydrogen and covalent bonds with mucin [4]. chitosan-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was also prepared in aqueous solution without the use of organic solvents.

The objective of this study was to investigate chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel for oral cavity. The physical appearance, pH, viscosity and % label amount of GM extract gel were performed. The $T_{Sol-Gel}$ temperature was measured. The in vitro antioxidant activity of gel were evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. The antibacterial activity against Staphylococcus aureus was evaluated by the zone of inhibition method and the mucoadhesive property was investigated using viscosity technique.

All rights reserved. No part of contents of this paper may be reproduced or transmitted in any form or by any means without the written permission of Trans Tech Publications Ltd, www.scientific.net. (#509112126-10/08/19,15:30:58)

Materials and Methods

Materials:

Fruit's hull of *Garcinia mangostana* extract were harvested form fruit garden in Prachinburi province Thailand. Chitosan (degree of deacethylation 0.85, MW 110 KDa), ethylenediaminetetraacitic acid (EDTA) and Poloxamer 407 were purchased from Sigma-aldrich Chemical Company, USA. All reagents were analytical grade.

Fruit's hull of Garcinia mangostana (GM) extraction and standardization

GM was separately cleaned and cut into small pieces. The GM was dried at 50 ºC overnight. The GM was placed in a 250 ml of ethanol connected with Soxlet apparatus. The ratio of GM to solvent was 1:50 at temperature of 75 ºC for 2 h. After extraction, the supernatant was dried by a rotary evaporator under vacuum [5]. The GM extract was analyzed by the amount of α-mangostin determined by HPLC. A VertiSep® AQS C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 µm particle size) with a C18 guard column was used. The HPLC analysis was performed according to the method of Pothitirat et al., 2009 with a slightly modification [6]. The elution was performed using gradient solvent systems that consisted of acetonitrile (mobile A) and 0.1% v/v ortho phosphoric acid (mobile B) with a flow rate of 1 mL/min at ambient temperature. The gradient program was as follows: 70% A for 0–15 min, 70% A to 75% A in 3 min, 75% A to 80% A in 1 min, constant at 80% A for 6 min, and 80% A to 70% A in 1 min. The wavelength of the UV–visible detector was set at 320 nm.

Formulation and characterization of Chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel

Poloxamer 407 was added slowly into the water at 5 ºC under gentle agitation and the CS-EDTA. The GM extract was incorporated into the gel at concentration of 0.5% w/w. Table 1 shows the formulation of gel with and without GM extract.

For the sol–gel transition temperatures ($T_{sol-gel}$) measurement, 10 g of the gel in the vial containing a magnetic bar was placed in water bath at 15 ºC with a thermosensor immersed in the gel and heated with constant stirring. When the magnetic bar stopped moving due to gelation, the temperature showed by the thermistor was determined as $T_{sol-gel}$.

The pH value of gels were measure using pH meter (Horiba PH-33, Japan). The appearance of the GM extract gels was characterized by visual method. The viscosity of gel were perform using Rheometer (Kinexus Pro, Marvern, England). The % label amount of GM in gel formulation were characterized using HPLC method. The amount of α-mangostin was used as marker to calculate. The % label amount of gel was calculated using Eq 1.

$$\text{Label amount (\%)} = (La/Lt) \times 100 \quad (1)$$

where La is the amount of the GM extracts that are calculate after formulate and Lt is the initial amount of GM extracts that are incorporate into formulation

Table 1. Formulation of chitosan-EDTA/poloxamer gel containing GM extract

Formulation	Amount (g)			
	G1	G2	G3	G4
GM extract	-	-	0.5	0.5
Chitosan	-	0.2	-	0.2
EDTA	-	0.12	-	0.12
Poloxamer	18	16.2	18	16.2
Ethanol	-	-	2	2
Purifled Water add to	100	100	100	100

In vitro antioxidant activity of Chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel

The antioxidant activity of GM extracts gel were evaluated using DPPH method. A 200 μM aliquot of DPPH in ethanol (100 μL) was added to 100 μL of the extract. The gel were dissolved in ethanol and then diluted to the desired concentration with ethanol. The mixture was held at 37 °C for 30 min. The absorbance was measured at 520 nm by a microplate analyzer. The results of the assay were expressed as IC_{50}, which represents the concentration of the extract (μg/mL) required to inhibit 50% of the free radical scavenging activity. The free radical scavenging activity was assessed using Eq 2:

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{control 520 nm}} - A_{\text{sample 520 nm}})/A_{\text{control 520 nm}}] \times 100 \quad (2)$$

where $A_{\text{sample 520 nm}}$ is the absorbance in the presence of the extracts and $A_{\text{control 520 nm}}$ is the absorbance of the control. The IC_{50} values were calculated by linear regression of the plots where the x-axis represented the various concentrations (μg/mL) of the extracts and the y-axis represented the % inhibition.

Antibacterial activity of chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel

The cultured bacteria strains of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus)* (DMST8013) (available from the department of medical sciences, Bangkok, Thailand), were prepared from their respective stored cultures. For zones of inhibition, *S. aureus* was cultivated in tryptone soy broth (TSB) in a shaking incubator at 37°C and 100 rpm for 24 h. The bacterial suspension was diluted until the bacterial concentration reached 1×10^6 CFU/mL. 100 μL of bacterial suspension was spread onto tryptone soy agar (TSA) plates. The TSA plates were drilled with a diameter of 0.5 cm and the gels (0.5 g) were placed into the hole. The plates were incubated for 24 h at 37 °C and zones of inhibition measured with a ruler (n = 3). 1 mg/ml amoxicillin solution was used as a control.

Mucoadhesive properties of chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel

The in vitro mucoadhesive strength of the gel was evaluated by the viscosity method (Kinexus Malvern Rheometer, type KNX2100 (cylindrical probe 25 ml))[7]. 6% w/w of mucin was dissolved in artificial saliva Na_2HPO_4 2.38 g, KH_2PO_4 0.19 g and, NaCl 8 g in distilled water 1 L pH 6.8). For sample preparation, 3 g of mucin solution was mixed with 3 g of gel for 15 minutes. Samples of each formulation were previously packed into the shallow cylindrical probe. Each sample was used at 5 g of sample was at 25 ℃, 37 ℃ and shear rate of 1, 5, 10, 15, 25 s^{-1}. Triplicates of each formulation were analyzed using Eq 3 – 5.

$$\eta_{\text{adhesion}} = \eta_{\text{total}} - \eta_{\text{m}} - \eta_{\text{gel}} \quad (3)$$

$$F = \eta_{\text{adhesion}}\, \sigma \quad (4)$$

$$\sigma = k\gamma^n \quad (5)$$

where η_{adhesion} = viscosity of adhesion, η_{total} = viscosity of total (formulation), η_{m} = viscosity of mucin, η_{gel} = viscosity of gel, γ = shear stress (Pa), σ = shear rate (s^{-1}), k =consistency index, n = dimensionless number

Results and Discussion

Formulation and characterization

After extraction, the GM extract was collected and calculated to % yield. The yield was 16.37 ± 1.76 %. The content of α-mangostin in the GM extracts was 9.11 ± 0.06% w/w. The in vitro antioxidant activity (IC_{50}) of GM extract was 13.67 ± 4.62 μg/ml. The previous study, Natthan et.al. 2013 reported that IC_{50} of GM extract was 14.66 μg/ml [2].These result indicated that the GM extract showed strong antioxidant activity.

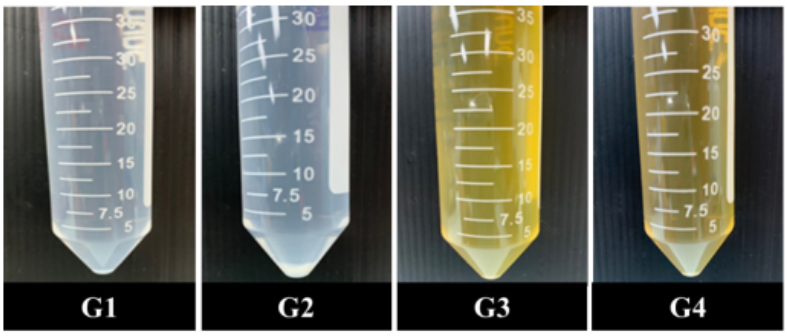


Fig 1. Appearance of chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel

The appearance of chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel is exhibited in Fig 1. The formulation without GM extract (G1 and G2) was clear when the GM extract has loaded the colour of gel change to yellow. The pH value, $T_{sol-gel}$ and % label amount of GM gel shows in table 2. The pH of gel was in the range of 4.47 – 6.87. When incorporating chitosan-EDTA in the formulation the pH value of formulation decreased. The pH value of formulation when loaded GM extract slightly change. These results indicated that the GM extract in gel formulation slightly effects on the pH value of formulation. The % label amount of gel was approximately 98.71 – 99.37%. The amount of GM extract remained in the gel formulation.

The sol-gel transition temperatures ($T_{sol-gel}$) of The chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel was determined by visual inspection method. The effect of the appropriate addition of GM extracts to get transition temperatures closely 37 ºC are shown in Table 2. These results show that the sol-gel transition temperature of the formulation contains 0.5% w/w GM extract decreased may be because of GM extract bind to polyethene oxide chain in P407. This may promote dehydration of polymer that causing adjacent molecule and intermolecular force leading to gelling at the lower temperature [7].

Table 2. The pH values, $T_{sol-gel}$ temperature and label amount (%) of chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel

Formulation	pH	$T_{sol-gel}$ (ºC)	Label amount (%)
G1	6.87 ± 0.06	32.50 ± 0.50	-
G2	4.52 ± 0.08	32.83 ± 0.29	-
G3	5.25 ± 0.11	35.00 ± 0.00	99.37 ± 1.08
G4	4.47 ± 0.01	35.12 ± 0.13	98.71 ± 1.30

The viscosity chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel are exhibited in Fig 2. At 25 ºC, the viscosity of the formulation without and with chitosan-EDTA was 105 - 131 mPa/s and 625 – 627 mPa/s, respectively. The rheology profile of the gel was Newtonian flow. At 37 ºC, The viscosity of gel dramatically increased due to the property of poloxamer. The viscosity of the formulation without and with chitosan-EDTA was 14767 – 14784 mPa/s and 9607 – 9641 mPa/s, respectively. The rheology profile of the gel was pseudoplastic flow [8]. These results indicated that the chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel exhibit the property of in situ gel.

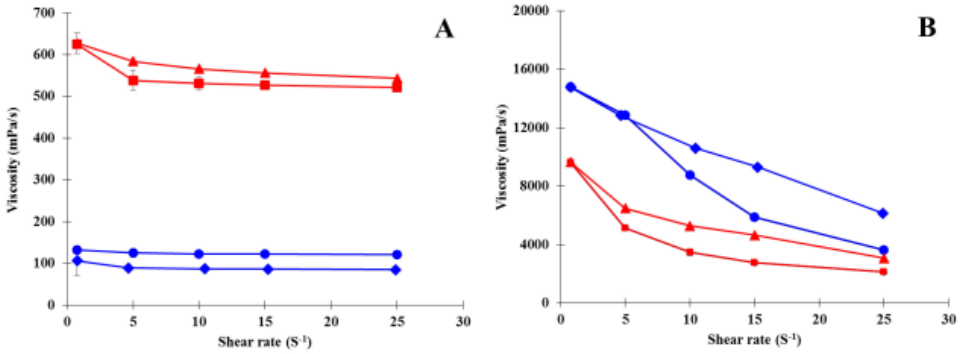


Fig 2. The viscosity at 25 ºC (A) and 37 ºC (B) of formulation G1 (◆), G2 (▲), G3 (●) and G4 (■).

In vitro antioxidant activity and antibacterial activity

Table 3 shows the antioxidant and antibacterial activity of the chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel. The antioxidant activity (IC_{50}) which evaluated by DPPH method of all gel was in the range of 13.20 – 13.57 mg/ml. The formulation of G1 and G0 did not show the antioxidant activity. The antioxidant activity of GM extract gel depended on the concentration of GM extract. This result indicated that the GM extract in gel formulation did not disappear during formulation. The zone of inhibition of gel against S. aureus was in the range of 8.17 – 10.52 mm. The formulation of G1 and G2 did not show the zone of inhibition. This result illustrated that the Chitosan-EDTA containing GM extract gel could inhibit bacterial growth however this study may require further experiments in order to determine the minimum inhibition concentration.

Table 3. The antioxidant and antibacterial activity of of chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel

Formulation	IC_{50} (mg/ml)	Zone of inhibition (mm)
G1	N/A	N/A
G2	N/A	N/A
G3	13.57 ± 0.21	8.17 ± 0.44
G4	13.20 ± 0.40	10.52 ± 0.43

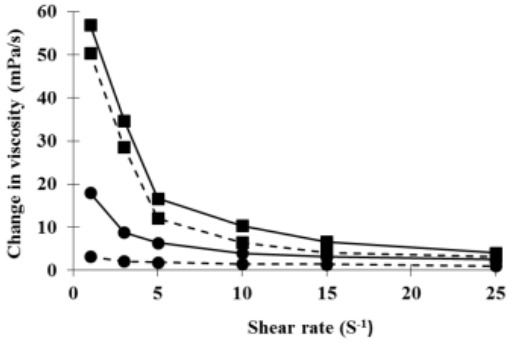


Fig 3. Difference in viscosity between mucin and polymer mixtures at 25 ºC (dash line) and 37 ºC (bold line) of formulation G3 (●) and G4 (■)

Mucoadhesive Properties

From Fig 3., the chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel formulation G4 shown a good mucoadhesive property compared with formulation G3. Even though increasing of shear rate effect to viscosity becomes lower but the formulation G4 stilled higher. These resulted implied that the addition of chitosan-EDTA into in situ gel may improve the mucoadhesive property of gel. The chitosan-EDTA formulation demonstrates excellent adhesion according to chitosan, being positively charged, showed adhesion to mucin (which is negatively charged) that probably measures the more direct molecule-to-surface interactions [9].

Conclusion

The chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel was successfully formulated. The gel was clear and had a yellow colour when loaded GM extract. The pH values and Tsol-gel temperature did not change when loaded GM extract. The viscosity of gel slightly decreases when loaded GM extract. The chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel exhibit both antioxidant and antibacterial activity. The addition of chitosan-EDTA into in situ gel may improve the mucoadhesive property of gel. In conclusion, the chitosan-EDTA/poloxamer containing GM extract gel may have the potential for pharmaceutical application.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no.10/2562)

References

[1] M.Y. Ibrahim, N.M. Hashim, A.A. Mariod, S. Mohan, M.A. Abdulla, S.I. Abdelwahab, α-Mangostin from Garcinia mangostana Linn: An updated review of its pharmacological properties. Arab J Chem. 9 (2016) 317-329.

[2] N. Charernsriwilaiwat, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat, M. Sukma, P. Opanasopit, Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with Garcinia mangostana extracts. Int J Pharm. 452 (2013) 333-343.

[3] B. Mizrahi, A.J. Domb, Mucoadhesive polymers for delivery of drugs to the oral cavity. Recent Pat Drug Deliv Formul. 2 (2008) 108 - 119.

[4] N. Sahatsapan, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat, P. Opanasopit, P. Tonglairoum, 6-Maleimidohexanoic acid-grafted chitosan: A new generation mucoadhesive polymer. Carbohydr Polym. 202 (2018) 258-264.

[5] N. Yoswathana, M.N. Eshtiaghi, Optimization of subcritical ethanol extraction for xanthone from mangosteen pericarp, Int J Chem Eng Appl. 6 (2015) 115-119.

[6] W. Pothitirat, M.T. Chomnawang, R. Supabphol, W. Gritsanapan, Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruit rind at two stages of maturity, Fitoterapia. 80 (2009) 442-447.

[7] D.S. Jones, M.L. Bruschi, O. de Freitas, M.P.D. Gremião, E.H.G. Lara, G.P. Andrews, Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity, Int J Pharm. 372 (2009) 49-58.

[8] S.B. De Souza Ferreira, T.D. Moco, F.B. Borghi-Pangoni, M.V. Junqueira, M.L. Bruschi, Rheological, mucoadhesive and textural properties of thermoresponsive polymer blends for biomedical applications, J Mech Behav Biomed Mater. 55 (2015) 164-178.

[9] K. Garala, P. Joshi, M. Shah, A. Ramkishan, J. Patel, Formulation and evaluation of periodontal *in situ* gel, Int J Pharm Investig. 3 (2013) 29-41.

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 23416 สัญญาเลขที่ 10/2562

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้งานเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาเจลไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกมังคุดสำหรับแผลในปาก

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ภก.ผศ.ดร. ณัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2561 ถึง 31 มีนาคม พ.ศ. 2563

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 6 เดือน

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 303,100 บาท เมื่อวันที่ 25 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562

งวดที่ 2 (40%) 242,480 บาท เมื่อวันที่ 22 พฤษภาคม พ.ศ. 2562

งวดที่ 3 (10%) 60,620 บาท ยังไม่ได้รับ

รวม 606,200 บาท

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	150,000 บาท	150,000 บาท	0 บาท
2. ค่าใช้สอย	90,000 บาท	90,743 บาท	เกิน 743 บาท
3. ค่าวัสดุ	305,580 บาท	304,867.35 บาท	ขาด 712.65 บาท
4. ค่าสาธารณูปโภค	60,620 บาท	60,620 บาท	0 บาท
รวม	606,200 บาท	606,230.35บาท	เกิน 30.35 บาท

(ภก.ผศ.ดร.ณัฐธัญ เจริญศรีวิไลวัฒน์)

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

1. คูวัฒนสุชาติ. จ. จุลชีววิทยาช่องปาก และที่มาของโรคฟันผุ โรคปริทันต์ และโรคในช่องปาก. พิมพ์ครั้งที่ 3. คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2549.

2. บัวจีบ ว. การวินิจฉัยและการรักษารอยโรคช่องปาก Oral ulcerative and vesiculobullous lesion. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2553.

3. Scully C, Gorsky M, Lozada-Nur F. The diagnosis and management of recurrent aphthous stomatitis: a consensus approach. Journal of the American Dental Association (1939). 2003;134(2):200-7.

4. เถียรไพศาล ร. แบคทีเรียในช่องปาก Oral bacteriology. พิมพ์ครั้งที่ 1. สงขลา: คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2550.

5. Barrons RW. Treatment strategies for recurrent oral aphthous ulcers. American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists. 2001;58(1):41-50; quiz 1-3.

6. Mirowski GW. Aphthous Stomatitis [Internet]. 2016 [cited 2016 July 16]. Available from: http://emedicine.medscape.com/article/1075570-overview#showall.

7. risdapong S, Sheiham A, Tsakos G. Impacts of recurrent aphthous stomatitis on quality of life of 12- and 15-year-old Thai children. Quality of life research : an international journal of quality of life aspects of treatment, care and rehabilitation. 2012;21(1):71-6.

8. C. S. Handbook of Oral Disease: Diagnosis and Management London: Martin Dunitz; 2001.

9. Samet N, Laurent C, Susarla SM, Samet-Rubinsteen N. The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: a pilot study. Clinical oral investigations. 2007;11(2):143-7.

10. Nirmal H.B. BSR, Pawar S.P. In-Situ gel: New trends in Controlled and Sustained Drug Delivery System. International Journal of PharmTech Research. 2010;2:1398-408.

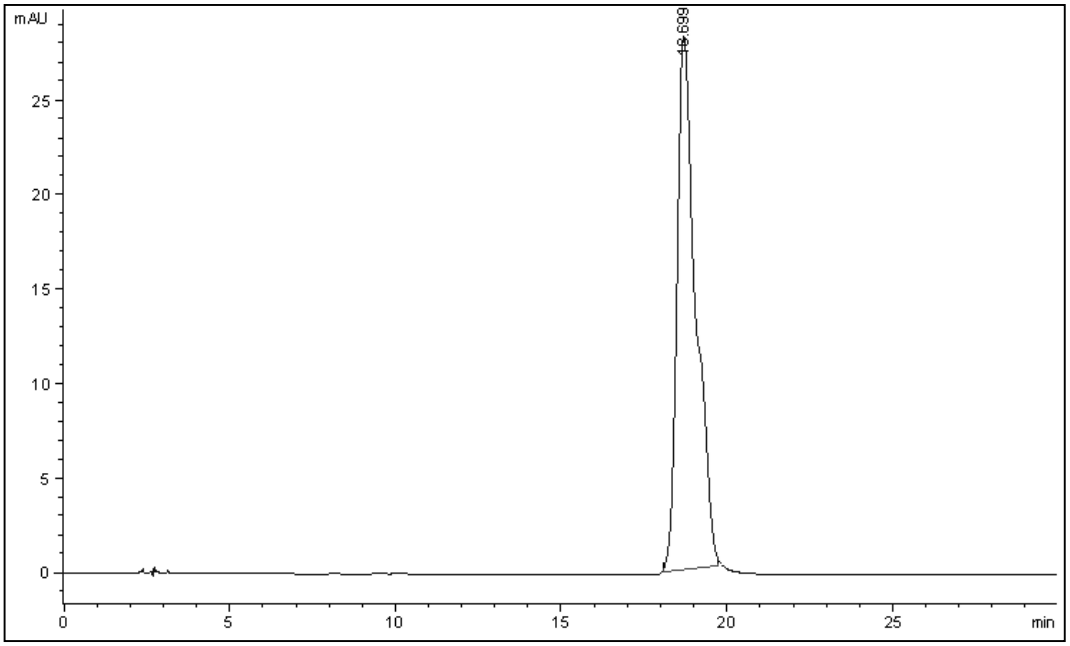
11. Bukka R, Prakasam K, Patel CD. Preparation and Evaluation of Intraoral Drug Delivery System for Rasagiline mesylate nternational Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research. 2010;2(4):294-301.

12. มังคุด [Online]. 2000 [cited 2010 May 25]; Available from: URL: http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/garcinia.html

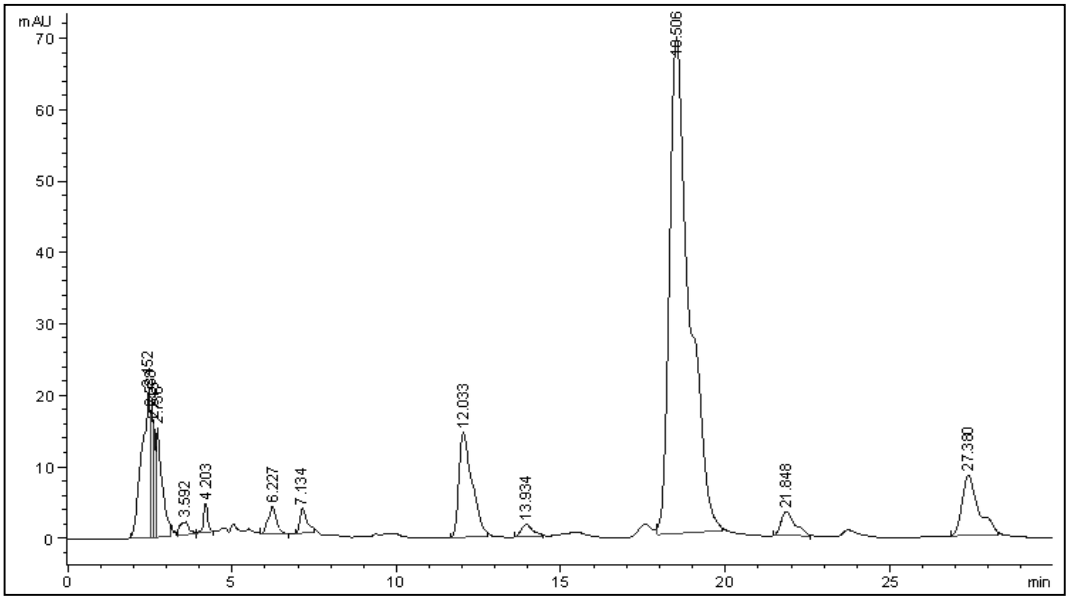
13. มังคุดราชินีของผลไม้ [Online]. n.d. [cited 2010 May 25]; Available from: URL: http://www.nfi.or.th/mangosteen/th/WhatMangosteen.asp

14. Sakagami Y., Iinuma M. , Piyasena KGNP, Dharmaratne HRW. Antibacterial activity of a-mangostin against vancomycin resistant Enterococci (VRE) and synergism with antibiotics. Phytomedicine 2005;12:203–8.
15. Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS, W. G. Effect of Garcinia mangostana on inflammation caused by *Propionibacterium acnes*. Fitoterapia 2007;78:401-8.
16. Chomnawang MT, Surassmo S, Wongsariya K, Bunyapraphatsara N. Antibacterial Activity of Thai Medicinal Plants against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Fitoterapia. 2009;80:102–4
17. Yu L, Zhao M, Yang B, Zhao Q, Jiang. Y. Phenolics from hull of Garcinia mangostana fruit and their antioxidant activities. Food Chemistry 2007;104:176-81.
18. Pothitirat W, Chomnawang MT, Supabphol R, Gritsanapan W. Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruit rind at two stages of maturity. Fitoterapia. 2009;80:442-7.
19. Charernsriwilaiwat N, Rojanarata T, Ngawhirunpat T, Sukma M, Opanasopit P. Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with Garcinia mangostana extracts. Int J Pharm. 2013;452(1-2):333-43.

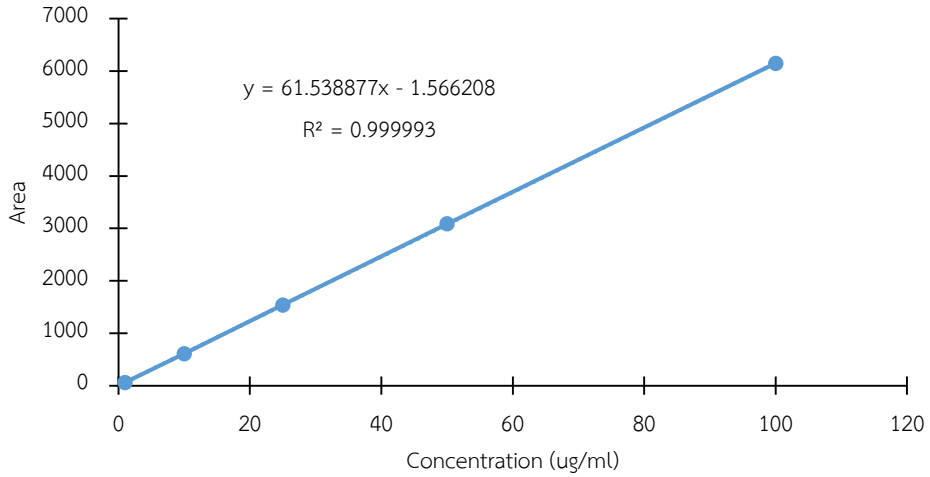
ภาคผนวก



รูปที่ 1 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน แอลฟาแมงโกสติน



รูปที่ 2 แสดงโครมาโตรแกรมของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด



รูปที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐานของค่า Area กับ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานแอลฟาแมงโกสติน

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณสารสกัดที่ได้จากการสกัดเปลือกผลมังคุด

รายการ	Batch 1	Batch 2	Batch 3
น้ำหนักสารตัวอย่าง (g)	50.0015	50.0008	50.0008
ปริมาตร solvent (ml)	250.00	250.00	250.00
น้ำหนัก Round bottom flask (g)	165.2969	165.9399	165.8038
น้ำหนัก Round bottom flask + สารสกัด (g)	174.4572	173.3877	173.7506
น้ำหนักสารสกัด (g)	9.1603	7.4478	7.9468
%yield	18.32	14.89	15.89
%yield เฉลี่ย±SD	16.37±1.76		

ตารางที่ 2 แสดง % content ของแอลฟาแมงโกสตินในสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

สารสกัด (µg/ml)	**พื้นที่ใต้กราฟ (AUC)**				**%content**
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย±SD	
100	1566.628	1575.676	1588.54	1576.95 ±11.01	9.11±0.06

ตารางที่ 3 แสดงผลการวัดความหนืดของตำรับยาเจลที่ไม่มีไคโตซาน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Shear rate (s^{-1})	Shear viscosity (mPa s) เฉลี่ย±SD			
	PLX	PLX:EX5	PLX:EX2.5	PLX:EX1
1.37	47766.67 ± 386.82	33810.00 ± 1285.57	45580.00 ± 2017.03	24660.00 ± 3591.53
3.74	30603.33 ± 375.28	21780.00 ± 1052.28	28806.67 ± 1451.80	14943.33 ± 2512.81
6.97	15896.67 ± 196.30	11840.00 ± 608.93	14806.67 ± 798.58	7679.00 ± 1108.03
10.19	10966.67 ± 109.70	8391.00 ± 464.72	10331.67 ± 593.77	5365.33 ± 587.90
13.41	8485.67 ± 71.59	6543.33 ± 384.36	8019.67 ± 460.31	4230.67 ± 494.95
16.63	6934.00 ± 48.50	5360.33 ± 313.92	6621.00 ± 372.50	3528.00 ± 432.65
19.86	5827.67 ± 36.95	4545.00 ± 255.91	5673.67 ± 326.75	3022.67 ± 371.26
23.08	5020.67 ± 49.07	3954.67 ± 224.86	4968.00 ± 297.31	2635.67 ± 325.46
26.3	4417.00 ± 48.50	3501.67 ± 208.28	4419.67 ± 272.66	2347.00 ± 284.56
29.53	3956.33 ± 35.80	3147.00 ± 201.68	3957.33 ±243.64	2115.00 ± 260.07
32.75	3590.67 ± 23.09	2856.33 ± 188.11	3576.67 ± 210.09	1927.33 ± 241.16
35.97	3283.33 ± 13.28	2613.67 ± 170.14	3270.33 ± 202.00	1775.33 ± 229.67
39.2	3018.33 ± 2.89	2410.67 ± 156.67	3003.33 ± 184.51	1643.00 ± 218.02
42.42	2794.67 ± 9.81	2240.00 ± 148.36	2772.33 ± 159.51	1526.67 ± 196.18
45.64	2614.67 ± 8.08	2093.67 ± 141.20	2589.67 ± 148.53	1416.33 ± 167.22
48.86	2449.00 ± 10.39	1967.33 ± 135.08	2431.33 ± 138.03	1318.33 ± 137.23
52.09	2303.00 ± 17.32	1856.00 ± 129.05	2284.67 ±c131.13	1239.00 ± 117.58
55.31	2177.67 ± 9.24	1755.67 ± 124.02	2156.00 ± 129.73	1168.67 ± 105.50
58.53	2064.33 ± 2.89	1666.67 ± 118.50	2043.00 ± 128.50	1113.33 ± 105.52
61.76	1961.67 ± 2.89	1585.00 ± 113.01	1942.33 ± 125.54	1072.87 ± 116.65
64.98	1862.67 ± 2.89	1510.67 ± 108.01	1849.67 ± 119.52	1036.60 ± 128.96
68.2	1770.67 ± 4.62	1443.67 ± 105.01	1765.33 ± 111.02	997.70 ± 133.11
71.42	1692.00 ± 5.20	1383.33 ± 101.51	1688.67 ± 100.52	959.97 ± 131.54
74.65	1619.33 ± 7.51	1328.00 ± 98.06	1618.33 ± 95.51	924.50 ± 127.44
77.87	1540.67 ± 18.48	1276.33 ± 96.62	1553.33 ± 91.51	890.93 ± 123.30
81.09	1470.33 ± 28.29	1228.00 ± 94.14	1492.33 ± 87.56	857.87 ± 118.30
84.32	1416.67 ± 27.14	1183.67 ± 90.67	1436.67 ± 86.12	827.60 ± 114.04
87.54	1370.67 ± 25.40	1143.33 ± 88.19	1385.33 ± 84.76	801.23 ± 111.48
90.76	1327.33 ± 23.09	1106.00 ± 85.16	1339.67 ± 82.40	777.23 ± 109.74
93.98	1285.33 ± 21.36	1070.60 ± 83.23	1298.33 ± 80.93	754.40 ± 108.26
97.21	1245.33 ± 19.63	1037.70 ± 81.54	1259.00 ± 79.30	732.73 ± 106.70

ตารางที่ 4 แสดงผลการวัดความหนืดของตำรับยาเจลที่มีไคโตซาน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

Shear rate (s^{-1})	Shear viscosity (mPa s) เฉลี่ย±SD			
	PLX:CS	PLX:CS:EX5	PLX:CS:EX2.5	PLX:CS:EX1
1.37	57.32 ± 13.21	88.04 ± 6.81	71.61 ± 6.34	69.67 ± 9.30
3.74	77.22 ± 4.74	99.86 ± 5.21	82.68 ± 4.08	78.24 ± 3.86
6.97	71.73 ± 5.44	93.05 ± 3.82	77.18 ± 4.32	73.06 ± 3.97
10.19	69.91 ± 5.53	90.67 ± 3.36	75.30 ± 4.36	71.26 ± 3.98
13.41	69.05 ± 5.53	89.52 ± 3.15	74.44 ± 4.29	70.40 ± 3.99
16.63	68.49 ± 5.55	88.80 ± 2.96	73.89 ± 4.31	69.87 ± 3.99
19.86	68.15 ± 5.58	88.27 ± 2.87	73.52 ± 4.23	69.55 ± 3.98
23.08	67.88 ± 5.54	87.88 ± 2.82	73.24 ± 4.23	69.25 ± 3.99
26.3	67.66 ± 5.55	87.59 ± 2.76	73.02 ± 4.21	69.05 ± 3.99
29.53	67.48 ± 5.55	87.34 ± 2.71	72.85 ± 4.19	68.89 ± 3.99
32.75	67.34 ± 5.55	87.13 ± 2.68	72.72 ± 4.18	68.75 ± 3.99
35.97	67.22 ± 5.53	86.95 ± 2.65	72.61 ± 4.16	68.65 ± 4.00
39.2	67.11 ± 5.52	86.79 ± 2.62	72.50 ± 4.15	68.56 ± 3.99
42.42	67.01 ± 5.50	86.64 ± 2.61	72.40 ± 4.13	68.48 ± 3.99
45.64	66.93 ± 5.49	86.50 ± 2.57	72.33 ± 4.11	68.40 ± 4.00
48.86	66.84 ± 5.46	86.36 ± 2.52	72.27 ± 4.11	68.33 ± 3.99
52.09	66.79 ± 5.45	86.22 ± 2.52	72.21 ± 4.11	68.28 ± 3.99
55.31	66.72 ± 5.43	86.09 ± 2.49	72.16 ± 4.10	68.24 ± 4.00
58.53	66.66 ± 5.43	85.93 ± 2.46	72.12 ± 4.09	68.19 ± 3.99
61.76	66.62 ± 5.41	85.84 ± 2.42	72.09 ± 4.08	68.16 ± 3.98
64.98	66.60 ± 5.39	85.75 ± 2.40	72.04 ± 4.07	68.15 ± 4.00
68.2	66.53 ± 5.38	85.63 ± 2.36	71.98 ± 4.08	68.10 ± 3.99
71.42	66.51 ± 5.37	85.56 ± 2.33	72.00 ± 4.07	68.07 ± 3.99
74.65	66.50 ± 5.37	85.45 ± 2.30	71.97 ± 4.06	68.06 ± 3.99
77.87	66.46 ± 5.38	85.36 ± 2.28	71.94 ± 4.07	68.05 ± 4.02
81.09	66.38 ± 5.36	85.24 ± 2.26	71.87 ± 4.08	67.97 ± 4.00
84.32	66.34 ± 5.34	85.12 ± 2.23	71.83 ± 4.08	67.93 ± 3.99
87.54	66.30 ± 5.35	85.04 ± 2.21	71.79 ± 4.09	67.91 ± 4.01
90.76	66.29 ± 5.35	84.99 ± 2.21	71.79 ± 4.10	67.91 ± 4.01
93.98	66.28 ± 5.34	84.95 ± 2.18	71.78 ± 4.11	67.90 ± 4.02
97.21	66.29 ± 5.34	84.93 ± 2.16	71.81 ± 4.11	67.90 ± 4.02

ตารางที่ 5 แสดงผลการวัดความหนืดของตำรับยาเจลที่ไม่มีไคโตซาน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Shear rate (s^{-1})	Shear viscosity (mPa s) เฉลี่ย±SD			
	PLX	PLX:EX5	PLX:EX2.5	PLX:EX1
1.37	77026.67 ± 2689.62	60923.33 ± 3485.53	76803.33 ± 1685.12	71573.33 ± 5718.95
3.74	52376.67 ± 1254.96	40360.00 ± 2220.56	51146.67 ± 1695.47	49160.00 ± 2021.56
6.97	27200.00 ± 75.50	20920.00 ± 1433.56	26493.33 ± 1220.87	25446.67 ± 937.57
10.19	18503.33 ± 262.74	14396.67 ± 1055.67	17956.67 ± 1006.20	17263.33 ± 657.29
13.41	14120.00 ± 285.83	11012.67 ± 897.44	13583.33 ± 770.02	13110.00 ± 555.07
16.63	11433.33 ± 205.99	8942.00 ± 766.51	11006.67 ± 536.31	10600.00 ± 431.39
19.86	9634.33 ± 169.06	7548.67 ± 623.50	9331.00 ± 326.12	8951.00 ± 340.59
23.08	8370.33 ± 147.79	6562.00 ± 528.34	8077.00 ± 281.90	7768.00 ± 293.95
26.3	7435.67 ± 128.24	5806.67 ± 464.79	7139.33 ± 232.64	6883.33 ± 264.47
29.53	6693.33 ± 112.08	5213.67 ± 411.07	6413.33 ± 188.81	6195.00 ± 237.67
32.75	6086.67 ± 90.67	4735.33 ± 366.62	5809.67 ± 168.47	5639.33 ± 218.84
35.97	5582.00 ± 80.89	4339.33 ± 330.25	5315.33 ± 145.61	5185.33 ± 201.93
39.2	5148.67 ± 78.91	4005.67 ± 299.43	4902.33 ± 132.00	4806.00 ± 189.94
42.42	4782.33 ± 60.35	3721.33 ± 276.77	4548.00 ± 127.18	4483.33 ± 179.49
45.64	4476.33 ± 49.54	3482.67 ± 252.90	4247.00 ± 129.01	4206.33 ± 170.57
48.86	4213.33 ± 45.94	3276.67 ± 232.14	3988.33 ± 130.58	3962.67 ± 164.09
52.09	3975.33 ± 42.52	3095.00 ± 218.63	3764.67 ± 130.21	3747.33 ± 157.84
55.31	3767.67 ± 44.88	2934.33 ± 208.57	3570.33 ± 128.22	3555.00 ± 151.81
58.53	3586.67 ± 49.12	2791.67 ± 198.60	3397.33 ± 124.36	3382.00 ± 146.48
61.76	3420.67 ± 50.06	2665.67 ± 189.23	3242.00 ± 120.33	3226.33 ± 141.00
64.98	3265.67 ± 51.98	2551.33 ± 182.39	3101.67 ± 116.54	3086.33 ± 135.43
68.2	3124.67 ± 52.70	2448.00 ± 175.52	2974.00 ± 114.25	2958.33 ± 131.47
71.42	3000.00 ± 54.67	2355.33 ± 167.57	2858.00 ± 109.78	2841.33 ± 125.91
74.65	2884.33 ± 55.10	2270.33 ± 163.10	2750.67 ± 105.19	2733.67 ± 120.79
77.87	2778.67 ± 54.56	2190.67 ± 160.26	2652.00 ± 101.17	2634.67 ± 117.20
81.09	2679.33 ± 53.46	2117.33 ± 155.53	2559.67 ± 98.31	2542.00 ± 114.07
84.32	2587.00 ± 52.72	2048.67 ± 150.82	2474.00 ± 96.15	2455.67 ± 110.65
87.54	2503.67 ± 50.95	1985.00 ± 147.60	2394.67 ± 93.29	2375.67 ± 106.69
90.76	2426.00 ± 48.77	1926.00 ± 144.01	2321.00 ± 91.00	2300.67 ± 103.72
93.98	2352.33 ± 47.60	1871.33 ± 140.05	2252.67 ± 87.21	2231.33 ± 101.04
97.21	2283.67 ± 46.07	1819.67 ± 136.84	2187.33 ± 85.14	2166.67 ± 97.53

ตารางที่ 6 แสดงผลการวัดความหนืดของตำรับยาเจลที่มีไคโตซาน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Shear rate (s^{-1})	Shear viscosity (mPa s) เฉลี่ย±SD			
	PLX:CS	PLX:CS:EX5	PLX:CS:EX2.5	PLX:CS:EX1
1.37	608.27 ± 176.80	2893.33 ± 1352.15	1179.07 ± 405.27	757.60 ± 440.45
3.74	441.30 ± 76.25	2299.67 ± 1053.29	791.77 ± 221.41	474.80 ± 233.16
6.97	290.87 ± 46.38	1385.27 ± 637.58	491.80 ± 105.18	298.60 ± 120.29
10.19	256.87 ± 35.66	1054.37 ± 470.24	410.40 ± 80.89	251.23 ± 90.86
13.41	235.80 ± 28.93	898.97 ± 378.92	366.13 ± 74.50	218.07 ± 66.56
16.63	225.17 ± 24.29	797.10 ± 320.47	352.03 ± 74.38	201.80 ± 54.38
19.86	218.60 ± 20.60	729.00 ± 284.40	341.57 ± 73.26	190.90 ± 46.64
23.08	212.77 ± 17.85	679.47 ± 261.01	330.60 ± 69.07	181.93 ± 40.36
26.3	208.53 ± 15.53	641.97 ± 244.08	324.10 ± 61.36	177.13 ± 37.83
29.53	203.93 ± 13.89	612.97 ± 232.09	317.93 ± 51.87	171.87 ± 35.07
32.75	199.97 ± 12.92	590.50 ± 224.19	312.27 ± 42.43	167.20 ± 32.16
35.97	196.53 ± 11.93	572.13 ± 217.69	306.70 ± 34.84	162.97 ± 29.58
39.2	193.47 ± 10.97	556.53 ± 211.56	301.30 ± 29.55	159.10 ± 27.32
42.42	190.93 ± 10.18	542.90 ± 205.46	296.03 ± 26.22	155.73 ± 25.31
45.64	188.67 ± 9.43	530.83 ± 199.62	290.50 ± 24.34	152.67 ± 23.41
48.86	186.77 ± 8.77	520.13 ± 194.01	285.07 ± 23.26	150.03 ± 21.76
52.09	185.13 ± 8.06	510.27 ± 188.50	279.90 ± 22.70	147.90 ± 20.35
55.31	183.53 ± 7.37	501.07 ± 182.98	275.10 ± 22.26	146.00 ± 19.21
58.53	182.03 ± 6.72	492.47 ± 177.59	270.37 ± 21.51	144.43 ± 18.21
61.76	180.60 ± 6.24	484.27 ± 172.28	265.53 ± 19.98	143.10 ± 17.46
64.98	179.17 ± 5.66	476.37 ± 167.01	261.37 ± 18.83	142.00 ± 16.91
68.2	177.70 ± 5.17	468.03 ± 161.04	257.60 ± 18.37	140.90 ± 16.31
71.42	176.33 ± 4.86	460.23 ± 155.74	254.17 ± 18.14	139.93 ± 15.92
74.65	175.07 ± 4.45	453.03 ± 151.41	251.00 ± 17.85	139.20 ± 15.57
77.87	173.67 ± 4.12	445.90 ± 146.90	248.07 ± 17.62	138.40 ± 15.12
81.09	172.40 ± 3.83	438.27 ± 141.74	245.13 ± 17.40	137.50 ± 14.68
84.32	171.13 ± 3.58	430.90 ± 136.86	242.40 ± 17.18	136.63 ± 14.19
87.54	169.97 ± 3.45	424.33 ± 132.88	239.90 ± 17.02	135.87 ± 13.69
90.76	168.83 ± 3.31	417.97 ± 128.91	237.43 ± 16.83	135.10 ± 13.30
93.98	167.73 ± 3.22	411.70 ± 125.11	235.17 ± 16.64	134.50 ± 12.86
97.21	166.73 ± 3.17	405.87 ± 121.83	233.00 ± 16.45	133.93 ± 12.52

ตารางที่ 7 แสดงค่า AUC ที่ความยาวคลื่น 320 nm และ %content ของตำรับยาเจล

ตำรับยาเจล	พื้นที่ใต้กราฟ (AUC)				%content
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย±SD	
PLX : EX 1	133.9	135.8	139.6	136.43±2.90	124.54±1.76
PLX : EX 2.5	410.0	403.7	425.6	413.10±11.27	116.57 ± 2.72
PLX : EX 5	803.7	776.7	781.5	787.30±14.40	103.54 ± 1.74
PLX : CS : EX 1	119.6	114.2	118.4	118.40±3.75	114.09 ± 2.28
PLX : CS : EX 2.5	258.0	292.6	288.8	279.80±18.97	84.71 ± 4.60
PLX : CS : EX 5	559.4	581.4	560.7	567.17±12.34	77.31 ± 1.50

ตารางที่ 8 แสดงผลการต้านอนุมูลอิสระของตำรับเจลที่ไวต่ออุณหภูมิที่บรรจุและไม่บรรจุสารสกัดจากเปลือกมังคุด ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical assay

ตำรับยาเจล	IC_{50} (mg/ml)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย±SD
PLX	N/A	N/A	N/A	N/A
PLX:EX5	13.8	13.4	13.5	13.57 ± 0.21
PLX:EX2.5	30	28	30	29.33±1.15
PLX:EX1	58	56	62	58.67±3.05
PLX:CS	N/A	N/A	N/A	N/A
PLX:CS:EX5	13.6	13.2	12.8	13.20 ± 0.40
PLX:CS:EX2.5	38	39	38	38.33±0.58
PLX:CS:EX1	81	85	81	82.33±2.31

ตารางที่ 9 ปริมาณการปลดปล่อยสาร alpha-mangostin ของตำรับ 18% poloxamer 407 กับสารสกัด 5 mg/g

ระยะเวลา (hr)	ปริมาณสาร alpha – mangostin(AUC)			%Cumulative			% Cumulative เฉลี่ย±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
1	10.40	10.00	9.90	0.29	0.29	0.29	0.29 ± 0.00
2	26.38	27.73	23.83	0.37	0.37	0.36	0.37 ± 0.00
4	35.70	30.10	29.20	0.41	0.39	0.39	0.39 ± 0.01
8	61.00	36.70	44.10	0.50	0.41	0.44	0.45 ± 0.05
12	111.50	83.90	86.20	0.69	0.58	0.60	0.62 ± 0.06

ตารางที่ 10 ปริมาณการปลดปล่อยสาร alpha-mangostin ของตำรับ 18% poloxamer 407, 2% chitosan (CS) และ สารสกัด 5 mg/g

ระยะเวลา (hr)	ปริมาณสาร alpha – mangostin(AUC)			%Cumulative			% Cumulative เฉลี่ย±SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
1	58.60	63.40	50.60	0.47	0.48	0.44	0.46 ± 0.02
2	72.00	50.00	59.60	0.55	0.47	0.50	0.50 ± 0.04
4	75.00	62.40	67.00	0.56	0.51	0.53	0.53 ± 0.03
8	93.80	85.00	95.60	0.63	0.59	0.63	0.62 ± 0.02
12	131.40	112.60	130.70	0.77	0.70	0.77	0.75 ± 0.04

ตารางที่ 11 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

PLX (mg/ml)	% cell viability						
	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	mean	SD
0	106.561	103.688	103.209	97.4617	89.0805	100	6.93949
100	124.042	113.506	121.887	123.084	113.985	119.3008	5.13145
200	115.182	121.648	123.803	121.169	113.027	118.9655	4.61053
300	106.082	113.266	110.872	113.266	106.322	109.9617	3.56953
400	101.293	100.575	99.1379	100.335	101.533	100.5747	0.94277
500	96.5038	96.0249	91.954	91.2356	88.3621	92.81609	3.42692

ตารางที่ 12 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : EX 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

PLX : EX 1 (mg/ml)	% cell viability						
	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	mean	SD
0	97.2763	98.5733	91.7639	107.328	105.058	100	6.25651
100	125.811	124.514	127.108	117.704	118.029	122.633	4.44831
200	121.271	127.756	121.271	122.244	119.974	122.503	3.04523
300	132.62	123.865	129.053	115.11	129.053	125.94	6.81165
400	121.92	125.811	119.001	114.786	137.808	123.865	8.77586
500	45.3956	35.668	39.559	47.0169	39.8833	41.5045	4.63695

ตารางที่ 13 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : EX 5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

PLX : EX 5 (mg/ml)	% cell viability						
	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	mean	SD
0	106.154	93.4066	102.198	99.5604	98.6813	100	4.69322
100	122.418	119.78	116.484	114.286	117.582	118.11	3.11825
200	115.165	120.22	118.242	120.22	121.758	119.121	2.53939
300	135.604	132.747	128.571	128.132	126.593	130.33	3.72655
400	27.4725	26.5934	27.4725	27.2527	26.3736	27.033	0.51543
500	30.989	30.1099	27.4725	27.4725	26.1538	28.4396	2.02389

ตารางที่ 14 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : CS ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

PLX : CS (mg/ml)	% cell viability						
	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	mean	SD
0	100.089	103.648	99.8665	92.5267	103.87	100	4.58692
100	125.445	133.007	124.778	127.669	121.441	126.468	4.28296
200	132.117	140.792	131.673	133.452	129.671	133.541	4.27428
300	128.559	135.676	129.004	131.005	136.566	132.162	3.743
400	136.121	158.363	139.235	135.231	137.011	141.192	9.71341
500	28.2473	32.9181	28.6922	30.2491	30.694	30.1601	1.85157

ตารางที่ 15 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : CS : EX 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

PLX : CS : EX 1 (mg/ml)	% cell viability						
	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	mean	SD
0	101.268	105.826	99.6829	98.2957	94.9267	100	4.00935
100	133.175	134.76	132.977	132.58	129.608	132.62	1.87693
200	140.507	142.885	136.346	139.715	135.949	139.08	2.92403
300	151.209	153.983	144.075	147.444	142.687	147.88	4.7426
400	25.763	28.3393	27.5466	27.9429	27.1502	27.3484	0.99088
500	26.5557	30.1229	29.132	29.7265	27.5466	28.6167	1.51317

ตารางที่ 16 ร้อยละการอยู่รอดของ human gingival fibroblast เซลล์ ในตำรับเจล PLX : CS : EX 5 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

PLX : CS : EX 5 (mg/ml)	% cell viability						
	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	mean	SD
0	100.063	99.4371	90.0563	106.004	104.44	100	6.22413
100	118.199	99.1245	119.137	122.577	103.502	112.508	10.4634
200	130.707	148.218	158.224	128.205	117.261	136.523	16.4449
300	39.7123	41.5885	40.6504	41.2758	38.4615	40.3377	1.27017
400	45.3408	42.8393	44.7154	45.0281	43.7774	44.3402	1.02285
500	41.5885	40.9631	42.8393	41.2758	41.5885	41.651	0.71306