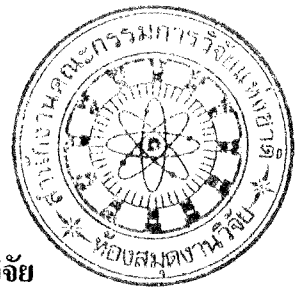


บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัยและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

- สารสกัดจากเปลือกมังคุดได้ความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

- Sodium acetate (Ajax)

- Glacial acetic acid

- Tween 80

- Methanol (Lab Scan)

- Anhydrous disodium hydrogen orthophosphate (Ajax)

- Sodium dihydrogen orthophosphate (Ajax)

- Sodium Chloride (NaCl) (Ajax)

- Dulbecco's modification of Eagle's medium or DMEM (GibThai CO., LTD.)

- DMEM without phenol red (GibThai CO., LTD.)

- Trypsin-EDTA (GibThai CO., LTD.)

- DMSO Analytical Reagent, Lab Scan

- Foetal Bovine serum (GibThai CO., LTD.)

- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide or MTT powder (GibThai CO., LTD.)

- L-Glutamine (GibThai CO., LTD.)

- Phosphate-buffered saline or PBS (GibThai CO., LTD.)

- Acetone Analytical Reagent, Lab Scan

- อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง Soybean casein digest agar (BFEA)

- อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว Soybean casein digest broth (SCDB)

- สารละลาย Peptone 1.5%

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 20 มิถุนายน 2555
เลขทะเบียน 245255
เลขเรียกหนังสือ

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือทดสอบ

- Shimadzu UV-2550 UV-visible spectrophotometer
- Spectrophotometer for MTT assay
- Hot plate
- Shaker bath
- Incubator
- Desicator
- Autoclave capable 121 °C
- ชุดกรอง Anderson 6 ชั้น
- เครื่องปั๊มสุญญากาศ
- เครื่องกำเนิดอนุภาคละอองละเอียด
- ชุดเครื่องแก้ว aerosol chamber
- มาโนมิเตอร์
- Aerosol condenser
- เครื่องวัดความดัน
- Air regulator
- Environmental Chamber
- เครื่องพ่นสารสกัดจากเปลือกมังคุดละอองละเอียด (สร้างขึ้นเอง)
- Scaning electron microscopy (SEM)
- Contact angle instrument
- เครื่อง HPLC Thermo (Thermo Finnigan, USA)
- Water contact angle apparatus

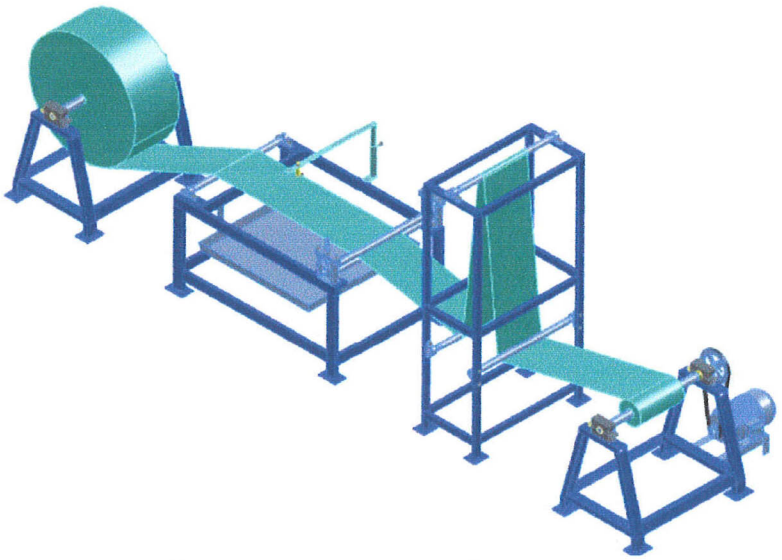
3.3 ขั้นตอนการทำการทดลอง

3.3.1 การสร้างเครื่องพ่นสารสกัดแบบละอองละเอียดกำลังการผลิตสูง

ระบบพ่นสารสกัดสมุนไพรประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ได้แก่ ระบบพ่นอนุภาคละอองละเอียดและระบบทำแห้ง สามารถปรับอุณหภูมิและความเร็วรอบในการม้วนเก็บแผ่นกรองอากาศได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณของสารสกัดที่ฉีดพ่นและความหนาของแผ่นกรองดังแสดงในรูปที่ 5

อุปกรณ์และส่วนประกอบ ระบบฉีดพ่นสารสกัดสมุนไพรจากธรรมชาติประกอบไปด้วยส่วนประกอบหลัก 2 ส่วนได้แก่

- **ระบบลำเลียงและฉีดพ่นสารสกัด** ประกอบด้วย 2 ส่วนย่อย ส่วนแรกคือ ระบบบ่อรองรับสารสกัด (Reservoir) ทำหน้าที่เก็บรองรับสารสกัดเพื่อใช้ทำการฉีดพ่นเพื่อให้สามารถทำการผลิตได้อย่างต่อเนื่อง อีกทั้งทำหน้าที่ลำเลียงสารสกัดไปยังหัวฉีดพ่น ส่วนที่สองคือ หัวฉีดพ่นสารสกัด (ultra fine spray) ทำหน้าที่พ่นสารสกัดในรูปแบบของละลองละเอียดลงบนผิวแผ่นกรองอากาศ
- **ระบบอบแห้งและม้วนเก็บ** ประกอบด้วย 2 ส่วนย่อย ส่วนแรกคือ ระบบอบแห้ง ทำหน้าที่พ่นลมร้อนบนผิวของแผ่นกรองอากาศ ส่วนที่สองคือ ระบบลูกกลิ้งลำเลียงและม้วนเก็บ ทำหน้าที่ลำเลียงแผ่นกรองอากาศที่ทำการพ่นสารสกัดผ่านระบบอบแห้ง และม้วนเก็บส่วนที่แห้งแล้ว เพื่อนำไปทำการผลิตต่อไป



รูปที่ 5 เครื่องต้นแบบในการพ่นสารสกัดจากเปลือกมังคุดลงบนแผ่นกรองอากาศ

ประสิทธิภาพเครื่องโดยสรุปดังนี้

- ขนาดของแผ่นกรองอากาศ 10-80 เมตร
- ความเร็วรอบในการม้วนเก็บ 0-50 rpm
- กำลังขับเคลื่อนด้วยมอเตอร์ ½ แรงม้า
- อุณหภูมิในการเป่าร้อนสูงสุด 120 °C
- ความดันฉีดปั๊มมากสุด 170 psi

3.3.2 กระบวนการพ่นสารสกัดลงบนแผ่นกรองอากาศ

สำหรับสภาวะในการพ่นสารสกัดลงบนแผ่นกรองอากาศ ในการทดลองนี้จะใช้แรงดันฉีด 100 psi (แรงดันสูงสุด) ความเร็วรอบในการม้วนเก็บที่ 5 rpm อุณหภูมิในการอบแห้งประมาณ 65 °C เนื่องจากสภาวะดังกล่าวทำให้การพ่นสารสกัดลงบนแผ่นกรองอากาศได้ทั่วถึงและแผ่นกรองอากาศแห้งทันในการม้วนเก็บพอดี

หลังจากนั้น จะนำแผ่นกรองอากาศไปขึ้นรูปเป็นหน้ากากอนามัย 3 ชั้น ซึ่งประกอบไปด้วย แผ่นกรองด้านหน้า (แผ่น polypropylene spun bond 14 กรัม/เมตร^2) แผ่นกรองชั้นกลาง MB-0 MB-2 และ MB-5 และแผ่นกรองอากาศด้านหลัง (แผ่น polypropylene spun bond 30 กรัม/เมตร^2) โดยกระบวนการเย็บติดด้วยความร้อน ด้วยเครื่องขึ้นรูปอัตโนมัติ ซึ่งสนับสนุนโดยบริษัท เอ็น เอ็น สกายเทรด

3.3.3 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของแผ่นกรองอากาศ

- ลักษณะพื้นผิวของแผ่นกรองอากาศ

นำตัวอย่างแผ่นกรองอากาศที่ใช้ในกระบวนการผลิตทั้งหมด คือแผ่นกรองด้านหน้า แผ่นกรองด้านหลัง MB-0 MB-2 และ MB-5 โดยจะนำแผ่นกรองอากาศดังกล่าวไปเคลือบด้วยไอโลหะ platinum ที่สุญญากาศเป็นระยะเวลา 120 วินาที จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน FE-SEM ที่สภาวะ 10 kV กำลังขยาย 250 เท่า ทำการวัดขนาดเส้นใยของแผ่นกรองอากาศชั้นต่างๆ

- สมบัติของการเปียกผิวของแผ่นกรองอากาศ

นำแผ่นกรองอากาศชนิด MB-0 MB-2 และ MB-5 ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า แล้วนำไปติดบนกระจกสไลด์ นำไปติดตั้งบนเครื่องวัด contact angle หยดน้ำ deionized water ลงบนผิวของแผ่นกรองอากาศปริมาตร 10 µl จากนั้นทำการวัดค่า contact angle ของหยดน้ำภายใน 2 วินาที บันทึกค่าและถ่ายภาพที่ได้แล้วเปลี่ยนตำแหน่งการวัด โดยหยดน้ำที่ตำแหน่งอื่นจนครบ 5 ตำแหน่งแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3.3.4 การศึกษาปริมาณสารสกัดจากเปลือกมังคุดบนแผ่นกรองอากาศ

สร้างกราฟ Calibration curve โดยการนำสารสกัดจากเปลือกมังคุดมาละลายในเอธอนอลบริสุทธิ์ ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงด้วยเอธานอลทำให้ได้ค่าความเข้มข้นที่แตกต่างๆ กัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 318 nm ด้วยเครื่อง UV จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ในแต่ละความเข้มข้นไป plot กราฟระหว่าง ความเข้มข้น vs ค่าการดูดกลืนแสงที่ 318 nm

นำแผ่นกรองอากาศชั้นกลาง MB-0 MB-2 และ MB-5 ชนิดละ 10 ชิ้น ชิ้นงานจะถูกตัดเป็นรูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร โดยการสุ่มหยิบตัวอย่างจากแผ่นกรองอากาศที่ทุกๆ ระยะ 20 เซนติเมตร นำตัวอย่างมาแช่ในสารละลายเอธานอลบริสุทธิ์ ปริมาตร 5 ml ในขวด vial และเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้แน่ใจว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดละลายออกมาจากแผ่นกรองอากาศจนหมด จากนั้นนำไปตรวจสอบหาความเข้มข้นของสารสกัดโดยใช้เครื่อง UV ที่ 318 nm โดยเทียบกับกราฟ calibration curve ที่ได้หาไว้ในตอนแรก

3.3.5 การทดสอบประสิทธิภาพการกรองของแผ่นกรองอากาศ

3.3.5.1 การหาค่าประสิทธิภาพในการกรองอากาศของแผ่นกรองอากาศ (%BFE) ตามมาตรฐานการทดสอบ ASTM F2100

3.3.5.1.1 การเตรียมเชื้อและสารละลายเชื้อ

1. เขี่ยเชื้อ (*s.aureus* ATCC #6538) จากอาหารแข็ง 1 โคโลนี ใส่ลงใน SCDB ปริมาณ 200 ml เก็บในตู้อบ 37 °C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง
2. นำเชื้อที่เตรียมได้ละลายลงในสารละลาย peptone 1.5% ให้มีเชื้อประมาณ 2200 CFU โดยใช้เครื่องวัดความขุ่น
3. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งลงบน plate plastic ให้มีปริมาณ 34±1 ml ต่อ plate
4. ตัดแผ่นกรองอากาศให้มีขนาด 100 mm x100 mm โดยในชิ้นงานตัวอย่างนี้จะรวมแผ่นทั้ง 3 ชั้นไว้ด้วยกัน (ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบคือ แผ่นกรองอากาศสามชั้นที่เคลือบสารสกัดจากเปลือกมังคุด 0% 2% และ 5%)
5. นำชิ้นงานที่ตัดแล้วไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20±2 °C ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 65±2 % เป็นระยะเวลาประมาณ 4 ชั่วโมง
6. เตรียมอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ
7. เริ่มทำการทดสอบโดยทำการพ่นเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งโดยไม่ผ่านแผ่นกรองอากาศ(control sample) โดยใช้แรงดันไปยังเครื่องกำเนิดอนุภาคละอองละเอียด (nebulizer) เป็นระยะเวลา 1 นาทีจากนั้นปิดเครื่องพ่น
8. เปิดเครื่องปั๊มสุญญากาศระยะเวลา 1 นาที เพื่อให้อนุภาคของเชื้อลอยไปติดบนอาหารแข็งที่เตรียมไว้ซึ่งบรรจุอยู่ใน Anderson sampler
9. นำอาหารแข็งที่มีเชื้อไปเก็บในตู้อบ 37 °C
10. ทำการทดลองกับแผ่นกรองอากาศโดยติดตั้งแผ่นกรองอากาศก่อนเข้าสู่ชั้น Anderson sampler จากนั้นเริ่มทำการทดสอบตามขั้นตอนที่ 7-9 จนครบจำนวนตัวอย่าง

3.3.5.1.2. การทดสอบการหา Pressure drop ของแผ่นกรองอากาศ

1. ติดตั้งอุปกรณ์
2. นำชิ้นงานตัวอย่างติดตั้งให้แน่นและปรับมาโนมิเตอร์ไว้ตำแหน่งอ้างอิง
3. ปรับ flow meter ให้มีอัตราการไหลของอากาศที่ 8 ลิตรต่อนาที
4. เริ่มทำการทดสอบ โดยทำการทดสอบโดยการอ่านค่าความดันจากมาโนมิเตอร์ เปลี่ยนพื้นที่การวัด ตำแหน่งอื่นที่ไม่ซ้ำเดิม จำนวน 5 ครั้ง บันทึกผลการทดลอง
5. คำนวนค่าความดันที่ได้

3.3.6 การศึกษาปริมาณสารสำคัญที่เคลือบอยู่บนผิวแผ่นกรองอากาศ

แบ่งตัวอย่างผ้าเป็นชิ้นเล็ก (ขนาดประมาณ 2x2 cm^2) และทำการสุ่มตัวอย่างผ้า 3 ชิ้น ทำการสกัดตัวอย่างผ้าด้วย EtOAc 3 ครั้งๆละ 25 มิลลิลิตร โดยใช้ ultrasonic bath รวมสารสกัดชั้น EtOAc เข้าด้วยกัน แล้วระเหย EtOAc ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator และกำจัดตัวทำละลายที่เหลือด้วยเครื่อง high vacuum pump ได้สารสกัดเป็นของหนืดสีเหลืองน้ำตาล (ทำ 3 ซ้ำ)

ชั่งสารสกัดตัวอย่าง 5.00 มิลลิกรัม ละลายใน acetonitrile ปริมาตร 10.00 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร เจือจางด้วย acetonitrile จนมีปริมาตร 1000 ไมโครลิตร จะได้สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.3.6.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน α-mangostin และ γ-mangostin

เตรียมสารละลายมาตรฐาน ในช่วงความเข้มข้น 20-140 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน acetonitrile สารมาตรฐาน α-mangostin และ γ-mangostin แสดงค่า retention time ที่ 28.773 และ 24.406 นาที ตามลำดับ

3.3.6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ 2 ชนิด ในสารสกัด โดย HPLC

ใช้เครื่อง HPLC Thermo (Thermo Finnigan, USA) ประกอบด้วย Chrom Quest software, Degasser Thermo separation product, Quaternary gradient spectra system P400 และ UV detector spectra system 2000 คอลัมน์ที่ใช้คือ Synergi Hydro RP, 150 x 4.6 มิลลิเมตร, 4ไมโครเมตร

การหาปริมาณ mangostin ในสารสกัดที่ได้ด้วยเทคนิค HPLC ใช้วิธีของ Chaivisuthangkura โดยนำสารสกัดตัวอย่างประมาณ 5 มิลลิกรัม มาละลายด้วย acetonitrile แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางที่ความเข้มข้น 100 ppm กรองแล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยฉีดสารที่ต้องการวัดเข้าไปในระบบ 50 ไมโครลิตร อัตราการไหลของสารที่วัดเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที mobile phase ที่ใช้ คือ A : acetonitrile, B : 2% acetic acid-H_2O และ C : n-butanol โดย mobile phase A:B:C เพิ่มจาก 45:45:10 ถึง 80:15:5 เป็นเวลา 20 นาที ต่อจากนั้นให้เพิ่มจาก 80:15:5 ถึง 80:20:0 เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นเพิ่มจาก 80:20:0 ถึง 95:5:0 เป็นเวลา 8 นาที และสุดท้ายยืนระบบที่ 95:5:0 เป็นเวลา 25 นาที และคำนวณค่าเป็นกรัมของ mangostin ต่อกรัมของสารสกัด

3.3.7 การศึกษาด้านการปลดปล่อยของสารสกัดจากเปลือกมังคุด

3.3.7.1 การเตรียมสารละลาย Acetate buffer/Tween 80/Methanol (A/TM)

Acetate buffer ถูกเลือกมาใช้ในการทดลองนี้ เนื่องจากมี pH ใกล้เคียงกับ ผิวหนังของคน คือ pH 5.5 ในการทดลองนี้ต้องใช้ surfactant (Tween 80) และ methanol เข้ามา ช่วย เนื่องจากสารสกัดจากเปลือกมังคุดไม่ละลายน้ำ ซึ่ง Acetate buffer เตรียมได้โดยใช้ sodium acetate 150 g มาละลายในน้ำกลั่น 250 ml จากนั้นใส่ Glacial acetic acid 15 ml สุดท้ายปรับ ปริมาตรให้ครบ 1000 ml โดยใช้น้ำกลั่น จากนั้นเตรียม Acetate buffer/Tween 80/Methanol โดยใช้ 96.5% v/v ของ Acetate buffer ละลายผสมกับ 0.5% v/v Tween 80 และ 3% v/v methanol

3.3.7.2 การเตรียมสารละลาย Phosphate buffer/Tween 80/Methanol (P/TM)

Phosphate buffer ถูกเลือกมาใช้ในการทดลองนี้ เนื่องจากมี pH ใกล้เคียงกับข้างในร่างกายของคนเรา คือ pH 7.4 ในการทดลองนี้ต้องใช้ surfactant (Tween 80) และ methanol เข้ามาช่วย เนื่องจากสารสกัดจากเปลือกมังคุดไม่ละลายน้ำ ซึ่ง Phosphate buffer เตรียมได้ โดยใช้ Anhydrous disodium hydrogen orthophosphate 6.177 g และ sodium dihydrogen orthophosphate 1.014 g มาละลายในน้ำกลั่น 100 ml จากนั้นนำสารละลายข้างต้นมา 20 ml ผสมกัน NaCl 8.7 g สุดท้ายปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml โดย

ใช้น้ำกลั่น และนำสารละลายมาปรับ pH ให้ ได้ 7.4 จากนั้นเตรียม Phosphate buffer/Tween 80/Methanol โดยใช้ 96.5% v/v ของ Phosphate buffer ละลายผสมกับ 0.5% v/v Tween 80 และ 3% v/v methanol

3.3.7.3 การวัดการปลดปล่อยสารสกัดมังคุดจากเส้นใยแผ่นกรองอากาศ

ในการทดลองนี้วัดการปลดปล่อยของยาโดยแบบ Total immersion ทำได้โดยตัดตัวอย่างให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 cm จากนั้นจุ่มตัวอย่างลงในสารละลาย A/T/M ที่ 32°C และ P/T/M ที่ 37°C ที่มีปริมาตร 40 ml โดยขวดแช่อยู่ใน shaker bath ที่มีจำนวนรอบ 70 rpm ซึ่งจะ ทำการเก็บสารละลาย 1 ml ออกจากขวดและต้องเติม 1 ml ของ A/T/M หรือ P/T/M ใส่ขวดเดิม ซึ่ง จะทำการเก็บสารละลายตั้งแต่ 0-48 ชั่วโมง (0-2880 นาที) ปริมาณของสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่ ถูกปลดปล่อยออกมาจะถูกวัดด้วยเครื่อง Shimadzu UV-2550 UV-visible spectrophotometer ที่ ความยาวคลื่น 318 nm (A/T/M) และ 319 nm (P/T/M) ทำซ้ำ 5 ครั้งต่อ 1 ตัวอย่าง

3.3.8 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั่วไปและเชื้อวัณโรค

2.3.8.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

- **อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว**

ใช้ TSB ในสัดส่วน (30 g TSB : 1000 g Water) เตรียมให้ได้ 100 ml (สำหรับ activation เชื้อเริ่มต้น) นำไป autoclave ที่ อุณหภูมิ 121 °C 20 นาที

- **อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง**

ใช้ TSB ในสัดส่วน (30 g TSB : 1000 g Water) และใช้ Agar ในสัดส่วน (15 g Agar : 1000 g Water) นำไป autoclave ที่ อุณหภูมิ 121 °C 20 นาทีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง เทลงใน petri dish ให้ได้ประมาณ 35 ml ต่อ 1 จาน

3.3.8.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น

- เชื้อแบคทีเรียทั่วไป

ในการทดสอบนี้ตัวแทนเชื้อแบคทีเรียสำหรับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ คือ *S.aurues* ATCC 25923 และ *E.coli* ATCC 25922 ตามลำดับ โดยการเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนี จากอาหารแข็ง นำมาใส่ในอาหารเหลว TSB 100 ml นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 22 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เตรียมได้มาปรับความขุ่นในสารละลาย 1.5% Peptone water ให้มีค่า OD เท่ากับ 0.5 McFarland จะได้เชื้อเริ่มต้นจำนวน 1 x 10^8 CFU/ml

- เชื้อวัณโรคดื้อยา

สำหรับเชื้อวัณโรค MDR-TB ชนิดดื้อยา Rifamipicin, Isoniazid, Ethambutol และ Streptomycin เนื่องจากยาทั้ง 4 ชนิดเป็นยาหลักที่ใช้ในการรักษาวัณโรค ผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาทั้ง 4 ชนิดนี้จะรักษายากและมีโอกาสที่การรักษาจะล้มเหลว ดังนั้นผู้ป่วยสามารถแพร่เชื้อได้ผ่านการ ไอหรือจาม ทำให้มีละอองเสมหะฟุ้งกระจายในอากาศได้ ส่วนขั้นตอนการเตรียมเหมือนกับการเตรียมเชื้อ *S.aurues* และ *E.coli* แต่ปรับความขุ่นของเชื้อโดยใช้น้ำกลั่นแทนและปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ (TB-MDR: Mc. No.1) จะได้เชื้อประมาณ 10^7 – 10^8 CFU/ml (การทำปฏิบัติการกับเชื้อวัณโรคจะทำการศึกษาใน BSL 2plus ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล)

3.3.8.3 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและวัณโรคบนแผ่นกรองอากาศทำการทดสอบ 2 วิธี ดังนี้

- การทดสอบด้วยวิธี Disc Diffusion Method (Clear Zone)

วิธีนี้ดำเนินการทดสอบตาม The disc diffusion method of the US Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ตามมาตรฐาน AATCC 147 นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ประมาณ 10^8 CFU/ml (สำหรับเชื้อ *S.aurues* และ *E.coli.* ใช้ Peptone water แต่เชื้อวัณโรคใช้น้ำกลั่น) นำไม้พันปลายด้วยสำลี จุ่มลงในเชื้อที่เตรียมไว้ให้พอชุ่ม นำมา spread ลงบนผิวของอาหารแข็งให้ทั่ว นำตัวอย่างที่ทำสดสอบ (จะต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยรังสี UV ด้านละ 1 ชั่วโมง) แปะลงไปบนอาหารแข็ง นำไปเก็บไว้ที่ตู้

incubate 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (สำหรับเชื้อวัณโรค ทิ้งไว้นาน 3 สัปดาห์) สังเกตและวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ที่เกิดขึ้นด้วยเวอร์เนีย ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วบันทึกผลการทดลอง

- **การทดสอบด้วยวิธีการหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% reduction)**

วิธีนี้เป็นการจำลองการทดสอบให้ใกล้เคียงกับสภาพการใช้งานจริงตามมาตรฐาน AATCC test method 100-2004 (assessment of antibacterial finished on textiles) นำเชื้อแบคทีเรีย (จำนวนเชื้อ 10^5-10^6 CFU/ml) ปริมาตร 50 ul หยดลงบนแผ่นกรองอากาศชนิด control(ขวดเปล่าไม่มีแผ่นกรองอากาศ) MB-0 MB-2 และ MB-5 ทิ้งไว้ที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อครบเวลาตามที่กำหนดดังกล่าวแล้ว นำไปเขย่าในน้ำเกลือ 5 นาทีเพื่อให้เซลล์แบคทีเรียหลุดออกจากแผ่นกรองมาแขวนลอยอยู่ในสารละลาย จากนั้นดูดสารละลายปริมาณ 100 ul แล้ว spread ลงบนอาการเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง นำไปเก็บไว้ที่ 37 °C เป็นระเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับเชื้อ *S.aureus* และ *E.coli* แต่สำหรับเชื้อวัณโรคเก็บไว้นาน 3 สัปดาห์ (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ) นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเชื้อให้อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนีต่อหนึ่งจานและนำมาคำนวนหา % การยับยั้งด้วยการแทนค่าลงในสูตรต่อไปนี้

$$100(B-A)/B = R$$

โดย R คือ % reduction , A คือ จำนวนเชื้อแบคทีเรียของตัวอย่างที่มีสารต้านเชื้อแบคทีเรีย B คือ จำนวนเชื้อแบคทีเรียของตัวอย่างที่ไม่มีสารต้านเชื้อแบคทีเรีย ที่ระยะเวลาต่างๆ

3.3.9 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity)

3.3.9.1 ความเป็นพิษต่อเซลล์

ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) เป็นเหตุการณ์ที่ซับซ้อนและมีหลาย ปัจจัยเกี่ยวข้อง เช่น การเป็นสารพิษของสารที่ทดสอบ การตอบสนองของเซลล์ไลน์ในวิธีที่ใช้ วิเคราะห์ความเป็นพิษและรูปแบบหรือกลไกการออกฤทธิ์ของสารพิษ ดังนั้นความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงมีความหมายแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะที่ศึกษา อย่างไรก็ตาม ลักษณะความเป็นพิษที่แตกต่าง กัน อาจมีกลไกการออกฤทธิ์และให้ผลของฤทธิ์ยาแตกต่างกัน จึงต้องมีวิธีที่แตกต่างกันใน การศึกษา สารก่อความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxins) อาจให้ผลผันกลับ (reversible) หรือไม่ผันกลับ (irreversible effect) และผล

ดังกล่าวอาจออกฤทธิ์ทันที หรืออาจจะใช้เวลานานเป็นอาทิตย์ ระดับ ความเป็นพิษต่อเซลล์จึงแบ่งออกได้เป็น 3 รูปแบบใหญ่ๆ คือ 1) ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เกิดจากการ ทำลายทางกายภาพเคมี (physical-chemical damage) ที่มีผลให้เซลล์ตายทันที 2) ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ออกฤทธิ์ต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์ และมักออกฤทธิ์ในช่วงเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือเป็นวัน และ 3) ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถแบ่งตัว เช่น การเกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งไม่ปรากฏให้เห็นการลดความมีชีวิตของเซลล์ได้อย่างเด่นชัด

3.3.9.2 ประโยชน์และข้อจำกัด

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงมีประโยชน์คือทำให้สามารควบคุมสภาพแวดล้อมที่ทำการวิเคราะห์ได้ เช่น ความเข้มข้นของสารพิษและช่วงเวลา สัมผัสสารพิษในเซลล์เพาะเลี้ยง สามารถควบคุมได้แม่นยำกว่าในสัตว์ทดลองแม้สารจะไม่เสถียร เนื่องจากในสัตว์ทดลองมีระบบหมุนเวียนระบบขับถ่ายกำจัดสารพิษหรือสารทดสอบ จึงทำให้การ ควบคุมปัจจัยที่ศึกษาได้ยากนอกจากนี้การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงยังเอื้อประโยชน์ต่อการเก็บตัวอย่างได้ สม่ำเสมอ และได้ผลทดลองเหมือนเดิมได้เมื่อทำซ้ำ ส่วนการเก็บตัวอย่างจากสัตว์ทดลองไม่ เหมาะสมต่อการเก็บตัวอย่าง เป็นต้น ดังนั้นการใช้ระบบเซลล์เพาะเลี้ยงในการทดสอบความเป็น พิษ จึงสามารถใช้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ชัดเจน ใช้ทดสอบและเวลาน้อย สามารถทำได้ง่าย ประหยัดและการใช้กับการทดสอบได้ทีละมากๆ กับสารหลายชนิด อย่างไรก็ตาม เซลล์เพาะเลี้ยง ไม่ได้อยู่ในสภาพแวดล้อมจริงตามธรรมชาติ แต่เป็นสภาพที่มีเซลล์ชนิดเดียว ทำให้ไม่สามารถ ศึกษากลไกของยา (pharmacokinetic) ตั้งแต่การรับยา ระยะเวลาและความเข้มข้นของยาที่ออกฤทธิ์ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของยา เมตาบอลิซึม การแทรกซึมในเนื้อเยื่อ การกำจัดยาออกจาก เนื้อเยื่อ และการขับยาออกจากร่างกาย นอกจากนี้เซลล์เพาะเลี้ยงยังขาดปฏิสัมพันธ์กันกับเซลล์ชนิด อื่นที่มีในระบบอวัยวะหรือในร่างกายของสัตว์ ซึ่งอาจให้ผลการศึกษาต่างกัน เช่น สารบางชนิดที่ แสดงความเป็นพิษในเซลล์อาจไม่เป็นพิษในสัตว์ทดลอง หรือ สารที่ไม่เป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยง อาจก่อความเป็นพิษหลังจากการเกิดเมตาโบลิซึมในตับได้ ดังนั้นข้อจำกัดของการใช้เซลล์สัตว์ใน การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ อาจแก้ไขโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับ activated hepatocytes

3.3.9.3 MTT-Based Cytotoxicity Assay

จุดยุติในวิธี microtitration assay เป็นการประมาณหาจำนวนเซลล์ด้วย การนับเซลล์โดยตรง หรือโดยการวัดการนำเข้าของสารไอโซโทป ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีอ้อม การลดลงของ MTT ในการวัดความมีชีวิตของเซลล์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ให้จุดยุติที่เหมาะสม และมีการใช้กัน อย่างแพร่หลาย MTT เป็นสีย้อม tetradizolium เป็นสารสีเหลืองที่ละลายน้ำได้และสามารถเป็น ตะกอนสีฟ้า formazan โดยเซลล์มีชีวิตเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตในช่วงการแบ่งตัวทวีคูณ มีความเหมาะสมใน การตรวจสอบฤทธิ์ยาที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ช่วงระยะเวลาที่เซลล์สัมผัสสารพิษคือ เวลาที่ทำให้เกิดการทำลายสูงสุด ซึ่งอาจมีผลจากความเสถียรของยาได้ หลังจากนำยาทดสอบออกจะปล่อยให้ เซลล์มีการเจริญเติบโตประมาณ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เกิดความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตและความสามารถเจริญเติบโตกับเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตและไม่สามารถเจริญเติบโตออกจากกันได้ จำนวนเซลล์ที่รอดสามารถบอกโดยวิธีอ้อมด้วยดูการลดลงของ MTT ซึ่งคือปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้น และเมื่อละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม จะสามารถวัดได้โดย spectrometer ขั้นตอนการทดสอบ คือ บ่มยาทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กับเซลล์เกาะผิวในถาดเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม เมื่อนำยาทดสอบออกให้เลี้ยงเซลล์ต่อโดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกๆ วัน ให้เซลล์มีการเจริญเติบโต 2-3 ครั้ง และเปลี่ยนอาหารอีกครั้งโดยใส่ MTT ในแต่ละหลุมและบ่มในที่มืดนาน 4 ชั่วโมง แล้วนำอาหารและ MTT ออก จากนั้นละลายผลึก formazan ใน DMSO ปรับ pH โดยการใส่ buffer แล้ว นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงด้วย ELISA plate reader

3.3.9.4 ขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์นี้ เป็นการประยุกต์มาจากมาตรฐานการทดสอบ ISO10993-5 โดยเซลล์ L929 ถูกเลี้ยงในอาหาร DMEM (ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS;Invitrogen Corp., USA), 1% l-glutamine (Invitrogen Corp., USA) and 1% antibiotic และ antimycotic formulation ซึ่งมีสาร penicillin G sodium, streptomycin sulfate และ amphotericin B (Invitrogen Corp., USA)) นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้อบ 37 $^{\circ}$C เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 วัน

จากนั้นเซลล์ L929 จะถูกทำให้แขวนลอยหลุดจากจานเลี้ยงเซลล์โดยกระบวนการ trypsinization ซึ่งใช้สารเคมีที่มีส่วนผสมระหว่าง 0.25% trypsin ที่มีปริมาณ EDTA $1x10^{-4}$ M (Invitrogen Corp.,USA) นับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer คำนวน

หาปริมาตรที่จะต้องนำเซลล์ใส่ลงในหลุมเลี้ยงเซลล์ให้ได้หลุมละ 5,000 เซลล์ นำใส่ตู้อบ 37 °C ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้เซลล์เกาะกับจานเลี้ยงเซลล์

เปลี่ยนอาหารเซลล์ออก แล้วใส่ SFM (ประกอบไปด้วย DMEM ที่มี 1% l-glutamine, 1% lactalbumin และ 1% antibiotic และ antimycotic formulation) ลงไปแทนทุกหลุมเก็บไว้ที่ 37 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำ SFM ในเซลล์ออก ใส่ SFM ที่แช่ลงในตัวอย่าง(ทิ้งไว้ 1 คืน) ใส่ลงไปแทน นำไปอบที่ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน

สำหรับการเตรียมตัวอย่างสำหรับทำการทดสอบ โดยการนำแผ่นกรองอากาศที่เคลือบสารสกัดจากเปลือกมังคุด 0% 2% และ 5% ที่ถูกตัดเป็นรูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร นำมาฉายด้วยรังสี UV ด้านละ 1 ชั่วโมงเพื่อฆ่าเชื้อโรค หลังจากนั้นนำล้างด้วย PBS และ DI water ครั้งละ 1 ml จำนวน 2 รอบ นำ SFM ใส่ลงไปแล้วเก็บตัวอย่างการทดสอบไว้ที่ระยะเวลาต่าง คือ 1 และ 7 วัน หลังจากนี้ จะดูดสารละลาย SFM ที่แช่ในตัวอย่าง ใส่ลงไปแทน SFM ของเซลล์ที่เลี้ยงไว้ดังที่กล่าวมาในตอนแรก

การวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต จะใช้สาร 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ในตอนแรก จะทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ใส่ PBS ลงไปหลุมละ 1 ml แล้วดูดออก จากนั้นเติม MTT 0.5 mg/ml ลงไปทุกหลุม หลุมละ 300 µl นำไปอบที่ 37 °C เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นเติม Eluting Dye (ที่มีส่วนผสมของ DMSO 900 µl ต่อ glycine buffer pH 10.5 ปริมาณ 125 µl ลงไปทุกหลุม นำไปเขย่าที่ 250 rpm เป็นระยะเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วยเครื่อง Thermospectronic Genesis 10 UV-Visible spectrophotometer.

3.3.10 การทดสอบความระคายเคือง

ในการทดสอบการระคายเคืองในมนุษย์ มีขั้นตอนดังนี้ คือ โครงการวิจัยผ่านการพิจารณาและให้การอนุมัติโดยคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (Srinakharinwirot University Institutional Review Board) และการศึกษาวิจัยได้ดำเนินการตามกฎเกณฑ์ของ GCP (Good Clinical Practice) โดยคำนึงถึงสิทธิมนุษยชน การรับรองความปลอดภัยและประสิทธิภาพของหน้ากากอนามัยเคลือบสารสกัดจากเปลือกมังคุด ซึ่งในขั้นตอนการวิจัยได้ดำเนินการดังนี้

1. เสนอโครงการวิจัยให้คณะกรรมการวิจัยในมนุษย์พิจารณา เมื่อได้รับอนุมัติจึงดำเนินการวิจัย
2. รับอาสาสมัคร ที่สมัครใจเข้าร่วมโครงการและเซนต์ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการ

3. ดำเนินการวิจัย ตามตั้งวัตถุประสงค์และตอนการขั้นตอนการวิจัยที่ออกแบบไว้ โดยคำนึงถึงความปลอดภัยเป็นหลัก ในการทดสอบได้ให้ความสำคัญการแพ้ การระคายเคือง การเกิดผื่นแดง การคันเนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ภายนอกร่างกาย โดยเตรียมยาแก้แพ้ และได้ชี้แจงกับอาสาสมัครก่อน การทดสอบว่าให้หยุดการใช้ทันทีเมื่อเกิดการไอ จาม คัน หรือผื่นแดง นอกจากนี้สถานที่ทำการ ทดสอบก็ใกล้สถานพยาบาล ที่สามารถรักษาได้ทันทีเมื่อมีกรณีฉุกเฉิน
4. การทดสอบได้ทำสองครั้ง ข้อมูลได้ถูกรวบรวมและวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์มาตรฐาน

ในการศึกษาครั้งนี้มีอาสาสมัครทั้งชายและหญิง ที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรง จำนวน 30 คน อายุเฉลี่ย 34.3±12.42 ปี ประกอบอาชีพต่างๆ กัน ได้แก่ พยาบาล 1 คน, เภสัชกร 1 คน, นักเทคนิคการแพทย์ 1 คน, นักวิทยาศาสตร์ 2 คน, อาจารย์ 2 คน, ยาม 2 คน, นักธุรกิจ 3 คน, แม่บ้าน 4 คน, นิสิตปริญญาโท 4 คน, นิสิตปริญญาเอก 5 คน, เจ้าหน้าที่/ธุรการ ที่สมัครใจเข้าร่วมโครงการและเซ็นต์ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการ ผู้ที่เป็นโรคทางเดินหายใจหรือภูมิแพ้ หรือผู้ที่ไม่สามารถเซ็นต์ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการได้ จะไม่ถูกคัดเลือกเข้าร่วมโครงการ ในการทดสอบให้อาสาสมัครใส่หน้ากากอนามัยชนิด 1 ที่ไม่มีสารสกัดจากเปลือกมังคุด อย่างน้อย 30 นาที และให้กรอกแบบแบบประเมินทันที หลังจากนั้นให้ทดสอบหน้ากากอนามัยชนิดที่ 2 และชนิดที่ 3 ซึ่งมีสารสกัดจากเปลือกมังคุด 2% และ 5% ตามลำดับ นาน 30 นาที กรอกแบบแบบประเมิน เหมือนการทดสอบกับหน้าอนามัยชนิดที่ 1 ดังนั้น อาสาสมัคร 1 คน ต้องกรอกแบบประเมิน จำนวน 3 ชุด ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบผลการใช้หน้ากากอนามัยทั้ง 3 ชนิด รวบรวมแบบประเมิน และวิเคราะห์ผลการทดสอบโดยใช้โปรแกรม Excel 2007

3.3.10 การทดสอบความเสถียรภาพของผลิตภัณฑ์

การทดสอบความเสถียรภาพของผลิตภัณฑ์ โดยการตรวจสอบปริมาณสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญ คือ สาร α - และ γ –mangostins ที่เคลือบอยู่บนแผ่นกรองอากาศชั้นกลางและตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* และ MDR-TB ที่ระยะเวลา 0 และ 4 เดือน ทำการทดสอบโดยการหยดเชื้อ 10^5 CFU/ml ปริมาตร 50 µl ลงบนแผ่นกรองอากาศชั้นกลาง ทิ้งไว้ที่ภาวะ 25°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง