รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาแผ่นเส้นใยนาโนผสมสารสกัดมังคุดเพื่อใช้รักษาแผล

โดย รศ.ดร.ปราณีต โอปณะโสภิต และ คณะ

กรกฎาคม 2557

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำวิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) ซึ่งให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยนี้ และขอขอบคุณ ศ.ดร. พิชญ์ ศุภผล วิทยาลัยปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้ความอนุเคราะห์ในการหาเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำเส้นใยโดยวิธี electrospinning พร้อมทั้งให้คำแนะนำวิธีการเตรียมแผ่นเส้นใย ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์สำหรับการวิจัย

คณะผู้ทำวิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

รหัสโครงการ DBG5480004

ชื่อโครงการวิจัย การพัฒนาแผ่นเส้นใยนาโนผสมสารสกัดมังคุดเพื่อใช้รักษาแผล

ชื่อผู้วิจัยและสถาบัน รศ.ดร. ปราณีต โอปณะโสภิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร praneet@su.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี (31 กค 2554 ถึง 30 กค 2557)

บทคัดย่อ

เส้นใยนาโนเตรียมจากไคโตซานรูปเกลือละลายน้ำผสมกับพอลิไวนิลแอลกฮอลล์ (PVA) ด้วยวิธีอิเล็กโตรสปินนิ่ง เตรียมโดยละลายไคโตซาน (CS) กับไฮดรอกซีเบนโซไตรอะโซล (HOBt) ไทอะมีนไพโรฟอสเฟต (TPP) และเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด (EDTA) ในน้ำกลั่นโดยไม่ใช้ตัวทำละลายที่เป็นพิษหรืออันตราย จากนั้นผสมไคโตซานรูปเกลือละลายน้ำนี้กับ PVA ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักต่างๆ และศึกษาผลของเกลือและอัตราส่วนของสารละลายต่อคุณลักษณะของเส้นใยที่เตรียมได้ โดยทดสอบเส้นใยทางเชิงพื้นผิว เชิงเคมี และ เชิงกล ประเมินคุณสมบัติการพองตัว ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ความเป็นพิษต่อเซลล์ และการสมานแผล พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย CS/PVA อยู่ในช่วง 94 ถึง 228 นาโนเมตร แผ่นเส้นใยนาโนมีคุณสมบัติเชิงกล การพองตัว และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์บ่งชี้ว่าแผ่นเส้นใยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของมนุษย์ แผ่นเส้นใยนาโน CS-HOBt/PVA และ CS-EDTA/PVA แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ การทดสอบการสมานแผลในสัตว์ทดลองพบว่า แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA สามารถลดขนาดของแผลเฉียบพลันในสัปดาห์แรกหลังจากเกิดบาดแผลได้ดีกว่าผ้าก๊อซ นำแผ่นเส้นใยนาโนที่เตรียมจากไคโตซานนี้มาประยุกต์ใช้โดยบรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดลงในแผ่น เนื่องจาก CS-EDTA/PVA มีคุณสมบัติที่ดีจึงเลือกเป็นพอลิเมอร์ เตรียมโดยบรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ แอลฟา-แมงโกสตินโดยน้ำหนัก ลงในสารละลาย CS-EDTA/PVA และเตรียมเป็นเส้นใยนาโนด้วยวิธีอิเล็กโตรสปินนิ่ง ศึกษาสมบัติต่างๆ ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น วิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในแผ่นโดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography ประเมินการปลดปล่อยสารสกัดจากแผ่นและความคงตัวของแผ่นเส้นใยนาโน ผลการศึกษาพบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยที่บรรจุสารสกัดอยู่ในระดับนาโนเมตรและไม่พบผลึกของสารสกัดบนแผ่นเส้นใยในทุกความเข้มข้น แผ่นเส้นใยนาโนมีคุณสมบัติเชิงกลและการพองตัวที่เหมาะสม สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดสามารถบรรจุในแผ่นเส้นใยนาโนได้ดีและปลดปล่อยอย่างรวดเร็ว แผ่นเส้นใยที่ได้ยังคงมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อแบคทีเรียและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ การศึกษาการสมานแผลพบว่า แผ่นเส้นใยสามารถเร่งอัตราการสมานแผลเมื่อเปรียบเทียบกับผ้าก๊อซ การศึกษาความความคงตัว

พบว่าแผ่นเส้นใยนาโนยังคงมีแอลฟา-แมงโกสตินร้อยละ 90 เป็นเวลา 3 เดือน สรุปได้ว่าแผ่นเส้นใยนาโนที่เตรียมจากไคโตซานที่สลายตัวง่ายเข้ากันได้กับร่างกายและไม่เป็นพิษที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดนี้ มีศักยภาพสำหรับนำมาใช้เป็นวัสดุปกปิดบาดแผลและเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการเร่งการรักษาบาดแผล

กุญแจคำ ไคโตซาน อิเล็กโตรสปินนิ่ง เส้นใยนาโน มังคุด การสมานแผล

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project code DBG5480004

Research Title: Development of mangosteen extracts nanofiber patch for wound healing

Investigator: Assoc. Prof. Dr. Praneet Opanasopit

Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, praneet@su.ac.th

Project period: 3 years (31 July 2011- 30 July 2014)

Abstract

Chitosan (CS) blended with polyvinyl alcohol (PVA) nanofibre patches were prepared by electrospinning. Chitosan was dissolved with hydroxybenzotriazole (HOBt), thiamine pyrophosphate (TPP) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in distilled water without the use of toxic or hazardous solvents. The chitosan salts were blended with PVA at different weight ratios, and the effect of salts and solution ratios on properties of patches were investigated. The geometrical, chemical and mechanical properties of the fibers were characterized. The swelling, antioxidant, antibacterial, cytotoxicity and wound healing properties were evaluated. The diameters of CS/PVA fiber were in the range of 94 to 228 nm. The nanofiber patches show good mechanical, swelling and antioxidant activity. Cytotoxicity studies indicated that the CS/PVA nanofiber patches were nontoxic to normal human fibroblast cells. The CS-HOBt/PVA and CS-EDTA/PVA nanofiber patches demonstrated satisfactory antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, and an *in vivo* wound healing test showed that the CS-EDTA/PVA nanofiber patches had better performance than gauze in decreasing acute wound size during the first week after tissue damage. The application of these CS nanofiber patches was extended by incorporating the extract from the fruit hull of *Garcinia mangostana* (GM) into the patches. Due to the excellent properties, CS-EDTA/PVA was selected as the polymers. The GM extracts with 1, 2 and 3% wt α-mangostin were incorporated into the CS-EDTA/PVA solution and electrospun to obtain nanofibers. The properties of GM extracts loaded CS-EDTA/PVA nanofiber patches were analyzed as description above. The amount of GM extracts was determined using high-performance liquid chromatography. The extracts release and stability of the nanofiber patches were evaluated. The results indicated that the diameters of the fibers were in the nanoscale and that no crystals of the extract were observed in the mats at any concentrations. The nanofiber patches provided suitable mechanical and swelling properties. The GM extracts was incorporated well into the

patches and rapidly released from the patches. All of the nanofiber patches remained antioxidant, antibacterial activity and were nontoxic. During the *in vivo* wound healing test, the mats accelerated the. The nanofiber patches maintained 90% of their content of α-mangostin for 3 months. In conclusion, the biodegradable, biocompatible and nontoxic chitosan nanofiber patches loaded with GM extracts have potential for use as wound dressing materials and provide a good alternative for accelerating wound healing.

Key words: chitosan, electrospinning, nanofibers, *garcinia mangostana*, wound healing

Executive Summary

1. รหัสโครงการ DBG5480004
2. ชื่อโครงการ การพัฒนาแผ่นเส้นใยนาโนผสมสารสกัดมังคุดเพื่อใช้รักษาแผล
   Development of mangosteen extracts nanofiber patch for wound healing
3. คณะผู้วิจัย
   1. ภญ.รศ.ดร.ปราณีต โอปณะโสภิต (หัวหน้าโครงการ)
   2. ภก.รศ.ดร. ธีรศักดิ์ โรจนราธา (ผู้ร่วมวิจัย)
4. สถาบันต้นสังกัด/สถานที่ติดต่อ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
5. ระยะเวลาโครงการ 3 ปี
6. งบประมาณโครงการ 1,200,000 บาท
7. บทสรุปโครงการวิจัย

ปัจจุบันการศึกษาค้นคว้าและวิจัยเพื่อพัฒนาสารออกฤทธิ์จากสมุนไพร เพื่อใช้เป็นยาและเครื่องสำอางได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง ด้วยความคาดหวังที่จะนำมาใช้แทนสารสังเคราะห์เนื่องจากความปลอดภัยกับร่างกายที่มีมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ ส่งผลให้ความนิยมผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมีเพิ่มสูงขึ้น มูลค่าของสมุนไพรและยาในอุตสาหกรรมต่างๆ เพิ่มขึ้น เมื่อมีการนำนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้กับการเตรียมเส้นใยอิเลคโตรสปันของสารสกัดจากธรรมชาติ ด้วยการพัฒนาในรูปแบบผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอางสำหรับผิวหนัง ทำให้ประสิทธิภาพในการนำส่งสารออกฤทธิ์สูงขึ้น เนื่องจากมีความสามารถที่จะทำการขึ้นรูปเส้นใยอิเลคโตรสปันให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในระดับนาโนเมตรได้ ซึ่งเส้นใยนาโนนี้มีพื้นที่ผิวสัมผัสมาก ซึ่งช่วยให้การแพร่ผ่านของสารออกฤทธิ์เกิดขึ้นได้ง่ายขึ้น และสามารถส่งผ่านสารออกฤทธิ์ได้ในปริมาณที่มากขึ้นด้วย นอกจากนี้การเตรียมในรูปแบบเส้นใยยังช่วยให้สารออกฤทธิ์มีความคงตัวอยู่ได้นานขึ้น สามารถเก็บกักปริมาณสารออกฤทธิ์ ควบคุมการออกฤทธิ์ของสารสำคัญได้ตามต้องการ ทั้งยังอาจช่วยลดผลข้างเคียงของสารออกฤทธิ์ได้ นอกจากนี้การนำสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่มีสารออกฤทธิ์ที่ดี มาผสมกับเส้นใยพอลิเมอร์เพื่อให้เป็นผลิตภัณฑ์ยังเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทยเหล่านี้

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ทำให้คณะผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะนำสารสกัดจากสมุนไพรไทยคือ สารสกัดจากเปลือกผลมังคุด มาใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เส้นใยอิเลคโตรสปันเพื่อใช้สมานแผล จากการศึกษาในเชิงเภสัชวิทยาของสารสกัดของสมุนไพรไทยพบว่า สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ต้านเชื้อแบคทีเรีย ลดการอักเสบ จึงช่วยในการสมานแผลได้ ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการเตรียมเส้นใยนาโนเพื่อใช้ในการรักษาแผล โดยเลือกใช้พอลิเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถช่วยสมานแผลได้ คือไคโตซาน ซึ่งเป็นพอลีแซคคาไรด์จากธรรมชาติ หน่วยย่อยของไคโตซาน คือ D-glucosamine ไคโตซานมีคุณสมบัติที่ดี คือสามารถเข้าได้กับสารในร่างกาย (biocompatibility) มีความเป็นพิษต่ำ ราคาไม่แพง และ

สามารถสลายตัวได้ (biodegradation) แต่เนื่องจากไคโตซานมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (มีค่า pKa 6.5) แต่ละลายได้ดีในสารละลายกรดอ่อน (pH 1-6) เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เป็นต้น จึงไม่สะดวกในการนำมาใช้ประโยชน์ ในการศึกษาวิจัยนี้จึงเตรียมโดยละลายไคโตซาน (CS) กับไฮดรอกซีเบนโซไตรอะโซล (HOBt) ไทอะมีนไพโรฟอสเฟต (TPP) และเอทิลีนไดเอมีนเตตระอะซิติกแอซิด (EDTA) ในน้ำกลั่นโดยไม่ใช้ตัวทำละลายที่เป็นพิษหรืออันตราย จากนั้นผสมไคโตซานรูปเกลือละลายน้ำนี้กับ polyvinyl alcohol (PVA) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถขึ้นรูปเตรียมเป็นเส้นใยได้ง่าย โดยเตรียมละลายไคโตซาน กับ PVA ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักต่างๆ และศึกษาผลของเกลือและอัตราส่วนของสารละลาย ต่อคุณลักษณะของเส้นใยที่เตรียมได้ โดยทดสอบเส้นใยทางเชิงพื้นผิว เชิงเคมี และ เชิงกล ประเมินคุณสมบัติการพองตัว ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ความเป็นพิษต่อเซลล์ และการสมานแผล พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใย CS/PVA อยู่ในช่วง 94 ถึง 228 นาโนเมตร แผ่นเส้นใยนาโนมีคุณสมบัติเชิงกล การพองตัว และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์บ่งชี้ว่าแผ่นเส้นใยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของมนุษย์ แผ่นเส้นใยนาโน CS-HOBt/PVA และ CS-EDTA/PVA แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ การทดสอบการสมานแผลในสัตว์ทดลองพบว่า แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA สามารถลดขนาดของแผลเฉียบพลันในสัปดาห์แรกหลังจากเกิดบาดแผลได้ดีกว่าผ้าก๊อซ นำแผ่นเส้นใยนาโนที่เตรียมจากไคโตซานนี้มาประยุกต์ใช้โดยบรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดลงในแผ่น เนื่องจาก CS-EDTA/PVA มีคุณสมบัติที่ดีจึงเลือกเป็นพอลิเมอร์ เตรียมโดยบรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ แอลฟา-แมงโกสติน โดยน้ำหนัก ลงในสารละลาย CS-EDTA/PVA และเตรียมเป็นเส้นใยนาโนด้วยวิธีอิเล็กโตรสปินนิ่ง ศึกษาสมบัติต่างๆ ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น วิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในแผ่นโดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography ประเมินการปลดปล่อยสารสกัดจากแผ่นและความคงตัวของแผ่นเส้นใยนาโน ผลการศึกษาพบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยที่บรรจุสารสกัดอยู่ในระดับนาโนเมตรและไม่พบผลึกของสารสกัดบนแผ่นเส้นใยในทุกความเข้มข้น แผ่นเส้นใยนาโนมีคุณสมบัติเชิงกลและการพองตัวที่เหมาะสม สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดสามารถบรรจุในแผ่นเส้นใยนาโนได้ดีและปลดปล่อยอย่างรวดเร็ว แผ่นเส้นใยที่ได้ยังคงมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อแบคทีเรียและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ การศึกษาการสมานแผลพบว่า แผ่นเส้นใยสามารถเร่งอัตราการสมานแผลเมื่อเปรียบเทียบกับผ้าก๊อซ การศึกษาความความคงตัวพบว่าแผ่นเส้นใยนาโนยังคงมีแอลฟา-แมงโกสตินร้อยละ 90 เป็นเวลา 3 เดือน

สรุปได้ว่าแผ่นเส้นใยนาโนที่เตรียมจากไคโตซานที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดนี้ มีศักยภาพสำหรับนำมาใช้เป็นวัสดุปกปิดบาดแผลและเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการเร่งการรักษาบาดแผล โดยแปะแผลแล้วไม่ต้องลอกแผ่นปิดแผลนี้ออกเนื่องจากสามารถสลายตัวได้เอง เป็นการลดปริมาณขยะติดเชื้อลง

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
Executive Summary	vi
สารบัญเรื่อง	viii
สารบัญตาราง	ix
สารบัญรูป	xi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	xv
บทที่ 1 บทนำ	1
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
- วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	8
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	9
- สารเคมี	9
- อุปกรณ์	12
- ระเบียบวิธีวิจัย	14
บทที่ 3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	24
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย	68
เอกสารอ้างอิง	70
ผลรับที่ได้จากโครงการ	76
ภาคผนวก	78

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารละลายไคโตซานเกลือชนิดต่างๆ แสดงเป็นค่า MIC (Minimum inhibition concentration) และ ค่า MBC (Minimum bactericidal concentrations) ต่อ *S. aureus* และ *E. coli*	27
ตารางที่ 2	ค่าพารามิเตอร์ของสารสะลายไคโตซานชนิดต่างๆ ที่ผสมกับสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอลล์ ในอัตราส่วนต่างๆ กัน และความสามารถในการเกิดเส้นใยด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิ่ง	30
ตารางที่ 3	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นเส้นใย ไคซาน/PVAเกลือและอัตราส่วนต่างๆ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=100)	31
ตารางที่ 4	ข้อมูลที่ได้จาก DSC thermograms ของแผ่นเส้นใยนาโน ไคโตซาน/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ ของ CS-HOBt/PVA, CS-TPP/PVA และ CS-EDTA/PVA	36
ตารางที่ 5	คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน/PVA ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)	39
ตารางที่ 6	แสดงค่า Minimum inhibition concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) ของแผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-HOBt/PVA 30/70 CS-TPP/PVA และ 30/70 CS-EDTA/PVA ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* เปรียบเทียบกับแผ่นเส้นใยนาโน PVA	44
ตารางที่ 7	ปริมาณสารออกฤทธิ์ต่างๆ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)	49
ตารางที่ 8	ค่าพารามิเตอร์ของสารละลายก่อนอิเล็กโตรสปินนิ่ง ของสารละลายไคโตซานผสมที่มีและไม่มี สารสกัดจากเปลือกผลมังคุด (0, 1, 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)	51
ตารางที่ 9	แสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด (0 1 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)	52
ตารางที่ 10	คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0, 1, 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)	56

ตารางที่ 11 % loading efficacy ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0 1 2 และ 3%wtแอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) 56

ตารางที่ 12 แสดง The total antioxidant capacity และ galvinoxyl radical scavenging ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0, 1, 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) 59

ตารางที่ 13 แสดง The superoxide, hydroxyl radical scavenging และ metal ion chelating ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0, 1, 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) 59

ตารางที่ 14 Minimum inhibition concentrations (MIC) และ minimum bactericidal concentrations (MBC) ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0, 1, 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) 61

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 FTIR spectrum ของสารละลายไคโตซานเกลือต่างๆ (a) CS-HOBt, (b) CS-TPP และ (c) CS-EDTA 24

รูปที่ 2 ^{1}H-NMR spectrum ของสารละลายไคโตซานเกลือต่างๆ (a) CS-HOBt, (b) CS-TPP และ (c) CS-EDTA 25

รูปที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Scavenging activity (n = 3) ของไคโตซานเกลือต่างๆ ต่ออนุมูล Superoxide: (□) CS-HOBt, (△) CS-TPP และ (○) CS-EDTA *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) 25

รูปที่ 4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Scavenging activity (n = 3) ของไคโตซานเกลือต่างๆ ต่ออนุมูล hydroxyl: (□) CS-HOBt, (△) CS-TPP และ (○) CS-EDTA *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) 26

รูปที่ 5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Metal ion chelating activity (n = 3) ของไคโตซานเกลือต่างๆ: (□) CS-HOBt, (△) CS-TPP และ (○) CS-EDTA *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) 26

รูปที่ 6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Reducing power (n = 3) ของไคโตซานเกลือต่างๆ: (□) CS-HOBt, (△) CS-TPP และ (○) CS-EDTA *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) 27

รูปที่ 7 แสดง Bacteria growth inhibition (n = 3) ของไคโตซานเกลือต่างๆ: (□) CS-HOBt, (△) CS-TPP และ (○) CS-EDTA ต่อเชื้อ *S.aureus* 28

รูปที่ 8 แสดง Bacteria growth inhibition (n = 3) ของไคโตซานเกลือต่างๆ: (□) CS-HOBt, (△) CS-TPP และ (○) CS-EDTA ต่อเชื้อ *E.coli* 28

รูปที่ 9 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (5000x) ของ ไคโตซาน/PVA เกลือต่างๆ และที่อัตราส่วนต่างๆ 32

รูปที่ 10 แสดงแผนภูมิการกระจายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไคโตซาน/PVA เกลือต่างๆ: (□) CS-HOBt/PVA, (■) CS-TPP/PVA และ (■) CS-EDTA/PVA ในอัตราส่วน (a) 10/90, (b) 20/80, (c) 30/70, (d) 40/60 และ (e) 50/50 33

รูปที่ 11 DSC thermograms ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-HOBt/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ: (a) 0/100, (b) 10/90, (c) 30/70, (d) 50/50 และ (e) ผงไคโตซาน 34

รูปที่ 12 DSC thermograms ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-TPP/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ: (a) 0/100, (b) 10/90, (c) 30/70, (d) 50/50 และ (e) ผงไคโตซาน 35

รูปที่ 13 DSC thermograms ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ: (a) 0/100, (b) 10/90, (c) 30/70, (d) 50/50 และ (e) ผงไคโตซาน 35

รูปที่ 14 FTIR สเปกตรัมของแผ่นเส้นใยนาโน CS-HOBt/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ: (a) 0/100, (b) 10/90, (c) 30/70, (d) 50/50 และ (e) ผงไคโตซาน 37
รูปที่ 15 FTIR สเปกตรัมของแผ่นเส้นใยนาโน CS-TPP/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ: (a) 0/100, (b) 10/90, (c) 30/70, (d) 50/50 และ (e) ผงไคโตซาน 37
รูปที่ 16 FTIR สเปกตรัมของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ: (a) 0/100, (b) 10/90, (c) 30/70, (d) 50/50 และ (e) ผงไคโตซาน 38
รูปที่ 17 Degree of swelling (%) ของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ ของเกลือ (□) CS-HOBt/PVA, (■) CS-TPP/PVA และ (■) CS-EDTA/PVA ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) 40
รูปที่ 18 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี (a) superoxide radical scavenging, (b) hydroxyl radical scavenging, (c) metal ion chelating and (d) reducing power ของแผ่นเส้นใยนาโน (○) 30/70 CS-HOBt/PVA, (□) 30/70 CS-TPP/PVA, (△) 30/70 CS-EDTA/PVA และ (◇) PVA *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) 42
รูปที่ 19 OD 550 nm ของเชื้อ (a) *S. aureus* และ (b) *E. coli* ในสารละลายของแผ่นเส้นใยนาโน: (○) 30/70 CS-HOBt/PVA, (□) 30/70 CS-TPP/PVA, (△) 30/70 CS-EDTA/PVA และ (◇) PVA หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) 43
รูปที่ 20 Cell viability ของเซลล์ NHF เมื่อสัมผัสกับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ของแผ่นเส้นใยนาโน (▨) PVA และ CS-HOBt/PVA ที่อัตราส่วนต่างๆ: (□) 10/90, (■) 30/70 และ (■) 50/50 ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน(n=5) 45
รูปที่ 21 Cell viability ของเซลล์ NHF เมื่อสัมผัสกับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ของแผ่นเส้นใยนาโน (▨) PVA และ CS-TPP/PVA ที่อัตราส่วนต่างๆ: (□) 10/90, (■) 30/70 และ (■) 50/50 ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=5) 46
รูปที่ 22 Cell viability ของเซลล์ NHF เมื่อสัมผัสกับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ของแผ่นเส้นใยนาโน (▨) PVA และ CS-EDTA/PVA ที่อัตราส่วนต่างๆ: (□) 10/90, (■) 30/70 และ (■) 50/50 ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=5) 46
รูปที่ 23 Wound area (%) ในวันที่ 1 4 7 และ 10 หลังจากรักษาด้วย (■) แผ่นเส้นใยนาโน PVA, (□) ผ้ากอซ (negative control), (▧) แผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-HOBt/PVA, (▩) แผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-TPP/PVA, (▩) แผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-EDTA/PVA และ (■) ผ้ากอซบรรจุยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ขายในท้องตลาด (Sofra-tulle®) (positive control) *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมี 47

นัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=6)

รูปที่ 24 ภาพบาดแผลระหว่างการรักษาในวันที่ 1, 4, 7 และ 10 หลังจากรักษาด้วย (a) ผ้ากอซ (negative control), (b) แผ่นเส้นใยนาโน PVA, (c) แผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-HOBt/PVA, (d) แผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-TPP/PVA, (e) แผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-EDTA/PVA และ (f) ผ้ากอซบรรจุยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ขายในท้องตลาด (Sofra-tulle®) (positive control) 48

รูปที่ 25 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (5000x) ของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ: (a) 0 %wt แอลฟ่าแมงโกสติน (b) 1%wt แอลฟ่าแมงโกสติน (c) 2%wt แอลฟ่าแมงโกสติน และ (d) 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน 52

รูปที่ 26 การกระจายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ: (a) 0%wt แอลฟ่าแมงโกสติน (b) 1%wt แอลฟ่าแมงโกสติน (c) 2%wt แอลฟ่าแมงโกสติน และ (d) 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน 53

รูปที่ 27 DSC thermograms แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0, 1, 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) และสารมาตรฐานแอลฟ่าแมงโกสติน thermal behavior 54

รูปที่ 28 FTIR สเปกตรัมของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0 1 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) และสารมาตรฐานแอลฟ่าแมงโกสติน 55

รูปที่ 29 การปลดปล่อยแอลฟ่าแมงโกสตินจากแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ: (△) 1%wt แอลฟ่าแมงโกสติน, (□) 2%wt แอลฟ่าแมงโกสติน และ (○) 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) 57

รูปที่ 30 Degree of swelling (%) ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0 1 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) 58

รูปที่ 31 OD 550 nm ของเชื้อ (a) *S. aureus* และ (b) *E. coli* ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ: (◇) 0%wt แอลฟ่าแมงโกสติน (△) 1%wt แอลฟ่าแมงโกสติน (□) 2%wt แอลฟ่าแมงโกสติน และ (○) 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3) 60

รูปที่ 32 Cell viability ของเซลล์ NHF เมื่อสัมผัสกับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ของ 62

แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่ความเข้มข้นต่างๆ: (□) 0%wt แอลฟ่าแมงโกสติน (■) 1%wt แอลฟ่าแมงโกสติน (▤) 2%wt แอลฟ่าแมงโกสติน และ (▩) 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=5)

รูปที่ 33 Wound area (%) ในวันที่ 1, 4, 7 และ 10 หลังจากรักษาด้วย (□) ผ้ากอซ (negative control), (▨) ผ้ากอซบรรจุยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ขายในท้องตลาด (Sofra-tulle®) (positive control), (▤) แผ่นเส้นใยนาโน 0%wt แอลฟ่าแมงโกสติน และ (■) แผ่นเส้นใยนาโน 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=6) 63

รูปที่ 34 ภาพบาดแผลระหว่างการรักษาในวันที่ 1, 4, 7 และ 10 หลังจากรักษาด้วย (a) ผ้ากอซ (negative control), (b) ผ้ากอซบรรจุยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ขายในท้องตลาด (Sofra-tulle®) (positive control), (c) แผ่นเส้นใยนาโน 0%wt แอลฟ่าแมงโกสติน และ (d) แผ่นเส้นใยนาโน 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน 64

รูปที่ 35 ภาพถ่ายชิ้นเนื้อเยื่อของบาดแผลในวันที่ 11 หลังจากรักษาด้วย (a) ผิวหนังปกติ, (b) ผ้ากอซ (negative control), (c) ผ้ากอซบรรจุยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ขายในท้องตลาด (Sofra-tulle®) (positive control), (d) แผ่นเส้นใยนาโน 0%wt แอลฟ่าแมงโกสติน และ (e) แผ่นเส้นใยนาโน 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน 65

รูปที่ 36 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะภายนอกของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน เมื่อเก็บในสภาวะปกติ (a, b และ c) (25°C 40%RH) เปรียบเทียบกับสภาวะเร่ง (d, e และ f) (45°C 75%RH) เป็นเวลา 0, 3 และ 6 เดือนตามลำดับ 66

รูปที่ 37 คุณสมบัติต่างๆ ของ แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน (a) average diameter, (b) remaining α-mangostin (%), (c) IC50 DPPH และ (d) remaining tensile strength (%) เมื่อเก็บภายใต้สภาวะปกติ (○) (25°C 40%RH) เปรียบเทียบกับสภาวะเร่ง (□) (45°C 75%RH) เป็นเวลา 6 เดือน 67

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

%w/v	Percent weight by volume
%w/w	Percent weight by weight
^{o}C	Degree Celsius
^{o}K	Degree Kelvin
µg	Microgram
µL	Microliter
µm	Micrometer
µM	Micromolar
^{1}H-NMR	Proton nuclear magnetic resonance
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid)
BSA	Bovine serum albumin
CFU	Colony-forming unit
cm	Centimeter
CS-EDTA	Chitosan-ethylenediaminetetraacetic acid
CS-HOBt	Chitosan-hydroxybenzotriazole
CS-TPP	Chitosan-thiamine pyrophosphate
DD	Degree of deacetylation
DPPH	2,2-di(4-*tert*-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DSC	Differential scanning calorimeter
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
et al.	and others
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum
FRAP	Ferric ion reducing antioxidant parameter
FTIR	Fourier transform infrared
g	Gram
GAE	Gallic acid equivalent
GlcN	Glucosamine
GlcNAc	N-acetyl glucosamine

GM	*Garcinia mangostana*
h	Hour(s)
HOBt	Hydroxybenzotriazole
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
MRSA	Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*
MtOH	Methanol
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
Mw	Millijoule/second
MW	Molecular weight
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NBT	Nitrotetrazolium blue chloride
NHF	Normal human fibroblast cell
ng	Nanogram
nm	Nanometer
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffer solution
pH	Potentia hydrogenii (lat.)
pKa	-log10Ka
PMS	Phenazonium methyl sulfate
ppm	Parts per million
PVA	Poly vinyl alcohol

rpm	Round per minute
s	second
SD	Standard deviation
SEM	Scanning electron microscope
SFM	Serum free medium
TAE	Tannic acid equivalence
TBA	Thiobarbituric acid
TCA	Trichloroacetic acid
TFA	Trifluoroacetic acid
TPP	Thiamine pyrophosphate
TPTZ	Tripyridyl-s-triazine
UV	Ultraviolet
VRE	Vancomycin resistant *Enterococci*
XRD	X-ray diffractometry

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อุตสาหกรรมด้านสุขภาพและการแพทย์ นับได้ว่ามีส่วนสำคัญต่อการพัฒนาประเทศเป็นอย่างยิ่ง โดยส่วนใหญ่แล้วยังต้องมีการนำผลิตภัณฑ์ต่างๆ เข้ามาจากต่างประเทศและราคาสูงมาก ทั้งนี้เนื่องมาจากค่าใช้จ่ายในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ด้านการแพทย์ขึ้นมาสักอย่างนั้น ต้องอาศัยการดำเนินการวิจัยที่ต่อเนื่องด้วยเงินลงทุนจำนวนมหาศาล ซึ่งยังเป็นไปได้ยากสำหรับวงการวิจัยในประเทศไทย ปัจจุบันด้วยนโยบายการพัฒนาและปฏิรูปรูปแบบการบริหารการวิจัยที่เอาจริงเอาจังและต่อเนื่อง มีการสนับสนุนการทำวิจัยในประเทศอย่างจริงจัง จึงทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะดำเนินการวิจัยเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ด้านสุขภาพและการแพทย์ขึ้นมาเพื่อทดแทนการนำเข้า ปัจจุบันตลาดยาและเครื่องสำอางมีการเจริญเติบโตอย่างมาก และนับได้ว่าเป็นหนึ่งในสินค้าที่มีศักยภาพในการเป็นรายได้สำคัญของประเทศ นาโนเทคโนโลยีซึ่งได้รับความสนใจและมีการตื่นตัวเป็นอันมากในเรื่องนี้ในปัจจุบัน จะเป็นปัจจัยกระตุ้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูงและมีระบบการทดสอบที่ได้มาตรฐาน ซึ่งจะนำไปสู่การได้รับความนิยมและเชื่อถือจากประชาชน สามารถใช้สินค้าที่ผลิตได้ในประเทศ การพัฒนายาจากวัตถุดิบที่มีอยู่ภายในประเทศนั้นนอกจากจะช่วยลดการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศปัจจุบันด้วย จึงทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะดำเนินการวิจัยเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ด้านสุขภาพและการแพทย์ขึ้นมาเพื่อทดแทนการนำเข้า

ปัจจุบันการศึกษาค้นคว้าและวิจัยเพื่อพัฒนาสารออกฤทธิ์จากสมุนไพรเพื่อใช้เป็นยาและเครื่องสำอางได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง ด้วยความคาดหวังที่จะนำมาใช้แทนสารสังเคราะห์ เนื่องจากความปลอดภัยกับร่างกายที่มีมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ดังกล่าว ส่งผลให้กระแสความนิยมผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมีเพิ่มสูงขึ้น มูลค่าของสมุนไพรและยาในอุตสาหกรรมต่างๆ เพิ่มขึ้น เมื่อมีการนำนาโนเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้กับการเตรียมเส้นใยอิเลคโตรสปันของสารสกัดจากธรรมชาติด้วยการพัฒนาในรูปแบบผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอางสำหรับผิวหนัง จะทำให้ประสิทธิภาพในการนำส่งสารออกฤทธิ์สูงขึ้น เนื่องจากมีความสามารถที่จะทำการขึ้นรูปเส้นใยอิเลคโตรสปันให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในระดับนาโนเมตรได้ ซึ่งเส้นใยนาโนนี้ จะมีพื้นที่ผิวสัมผัสมาก ซึ่งอาจช่วยให้การแพร่ผ่านของสารออกฤทธิ์ผ่านผิวหนังเกิดขึ้นได้ง่ายขึ้น และสามารถส่งผ่านสารออกฤทธิ์ได้ในปริมาณที่มากขึ้นด้วย นอกจากนี้การเตรียมในรูปแบบเส้นใยยังช่วยให้สารออกฤทธิ์มีความคงตัวอยู่ได้นานขึ้น สามารถเก็บกักปริมาณสารออกฤทธิ์ ควบคุมการปลดปล่อยและการออกฤทธิ์ของสารสำคัญได้ตามต้องการ ทั้งยังอาจช่วยลดผลข้างเคียงของสารออกฤทธิ์ได้ นอกจากนี้การนำสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่มีสารออกฤทธิ์ที่ดี มาผสมกับเส้นใยพอลิเมอร์เพื่อให้เป็นวัสดุควบคุมการ

ปลดปล่อยสารสกัดเหล่านี้ ยังเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทยเหล่านี้

เส้นใยอิเลคโตรสปัน คือ เส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในระดับนาโนเมตรหรือเรียกอีกอย่างว่านาโนไฟเบอร์ โดยทั่วไปนาโนไฟเบอร์จะผลิตขึ้นจากพอลิเมอร์ชนิดต่างๆ และกำหนดให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 100 นาโนเมตร[1] คุณสมบัติที่โดดเด่นคือมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง มีรูขนาดเล็ก มีความพรุนมาก มีค่าแรงต้านทานแรงดึงตามยาวสูง เป็นต้น การผลิตนาโนไฟเบอร์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น drawing, template synthesis, phase separation, self-assembly และ electrospinning ซึ่งกระบวนการอิเลคโตร สปินนิ่ง เป็นกระบวนการที่อาศัยแรงทางไฟฟ้าจากแหล่งกำเนิดศักย์ไฟฟ้ากำลังสูงในการปั่นสารละลายพอลิเมอร์ ด้วยไฟฟ้าสถิตจนทำให้สารละลายพอลิเมอร์กลายเป็นนาโนไฟเบอร์ที่มีขนาดเล็กมาก[2] กระบวนการ ดังกล่าวประกอบ ด้วยส่วนสำคัญสามส่วนคือ แหล่งกำเนิดศักย์ไฟฟ้ากำลังสูง (high voltage dc supply) หลอดบรรจุสารละลายที่ติดเข็มโลหะ (syringe with metal needle) และวัสดุรองรับ (collector) เป็นระบบที่มีความซับซ้อนน้อย ต้นทุนต่ำ สามารถควบคุมขนาดและปริมาณการเกิดเส้นใยให้ต่อเนื่องได้มากยิ่งขึ้น โดยการควบคุมกระบวนการและพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง ทำให้เกิดเป็นเส้นใยของพอลิเมอร์ที่มีขนาดเล็กมากทำให้เส้นใยมีค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อน้ำหนักที่สูงมาก[1] ลักษณะเด่นดังกล่าวทำให้มีการวิจัยและพัฒนาเพื่อนำเส้นใยดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในงานด้านต่างๆ เช่น วัสดุอุปกรณ์ทางการแพทย์ วัสดุควบคุมการปลดปล่อยยา วัสดุทางการเกษตร โดยควบคุมการปลดปล่อยยาฆ่าแมลงให้แก่พืช ส่วนประกอบของเสื้อผ้าที่ป้องกันสารเคมีหรือจุลินทรีย์ได้ เส้นใยเสริมแรงในวัสดุเชิงประกอบ ทำให้ได้วัสดุที่มีน้ำหนักเบาและมีความแข็งแรงสูง และใช้ผลิตเป็นวัสดุกรองสำหรับแยกอนุภาคที่มีขนาดเล็กออก เป็นต้น[3] กระบวนการเตรียมดังกล่าว เป็นกระบวนการที่อาศัยแรงทางไฟฟ้าในการทำให้สารละลายพอลิเมอร์ หรือพอลิเมอร์หลอมเหลวเกิดการยืดตัว โดยควบคุมสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสม จนได้เส้นใยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระดับนาโนเมตร รูปแบบการนำส่งยาแบบเส้นใยนาโน โดยการเตรียมเส้นใยอิเลคโตรสปันของตัวยา เป็นการพัฒนารูปแบบนำส่งยาแบบใหม่ที่มีจุดประสงค์การเตรียมเพื่อเพิ่มการละลายหรือควบคุมการปลดปล่อยตัวยา เส้นใยนาโนนี้มีพื้นที่ผิวสัมผัสมาก ส่งผลให้ช่วยเพิ่มการละลายของตัวยาที่ละลายน้ำยากได้ เพิ่มความคงตัวของตัวยา เพิ่มความสามารถในการเก็บกักยา และสามารถควบคุมการปลดปล่อยและการออกฤทธิ์ของตัวยาได้ตามต้องการ รวมทั้งยังอาจช่วยลดผลข้างเคียงของยาได้[4]

Electrospinning เป็นกระบวนที่เกิดขึ้นมา 60 ปีแล้ว แต่พึ่งได้รับความสนใจศึกษากันอย่างจริงจังเมื่อประมาณ 10 ปีที่ผ่านมานี้เอง ในปี ค.ศ. 1934 Formhals ได้จดสิทธิบัตรกระบวนการและเครื่องมือที่ใช้แรงทางไฟฟ้าในการสังเคราะห์เส้นใย ในปี ค.ศ. 1969 Taylor ได้ตีพิมพ์ผลงาน ที่อธิบายถึงปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้น ในขณะที่สารละลายพอลิเมอร์พุ่งออกจากเข็มโลหะที่ให้ศักย์ไฟฟ้ากำลังสูงว่ามีการเปลี่ยนรูปร่างของสารละลายจากทรงกลมเป็นลักษณะของสามเหลี่ยมคล้ายโคน เมื่อแรงสนามไฟฟ้ามีค่าเท่ากับแรงตึงผิวของสารละลายพอลิเมอร์ซึ่งต่อมามีการเรียกลักษณะนี้ว่า Taylor

cone โดยการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น Taylor cone จะขึ้นกับความหนืดของสารละลายพอลิเมอร์ ปี ค.ศ. 1971 Baumgarten เริ่มทำการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงสารละลายพอลิเมอร์และพารามิเตอร์ในกระบวนการ ทำให้ทราบว่าพารามิเตอร์ต่างๆ มีผลต่อสัณฐานวิทยาของนาโนไฟเบอร์ที่ได้ ปี ค.ศ. 1995 Reneker ได้ทำการศึกษาอย่างเป็นระบบมากขึ้น ทำให้ electrospinning ได้รับความสนใจจากนักวิจัยต่างๆ ทั่วโลก เห็นได้จากจำนวนผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติเรื่อต่างๆ ที่เกี่ยวกับ electrospinning เพิ่มจากประมาณ ปีละไม่ถึง 10 เรื่อง ตั้งแต่ปี ค.ศ.1995 ถึงปี ค.ศ.2000 เป็น 500 เรื่องในปี ค.ศ. 2007 กระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่งมีขั้นตอนต่างๆ ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งส่งผลต่อลักษณะสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติของนาโนไฟเบอร์ที่ได้[5-6] พบว่ามีพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องดังนี้ศักย์ไฟฟ้า อัตราการไหล ระยะทางระหว่างปลายเข็มจนถึงฉากรับ ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเมอร์ส่งผลต่อความหนืดและแรงตึงผิวของสารละลาย ความสามารถในการนำไฟฟ้าของสารละลาย ความสามารถในการระเหยของตัวทำละลาย[7] ในการนำนาโนไฟเบอร์มาประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์และสุขภาพ มักจะเลือกใช้พอลิเมอร์ที่เข้ากันได้กับร่างกาย(biocompatibility) และ/หรือสามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย (biodegradability) ตัวอย่าง เช่น poly L-lactic acid (PLLA), chitosan (CS), polycaprolactone (PCL), polyethylene-co-vinyl acetate (PEVA) เป็นต้น การประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์และสุขภาพได้แก่

1. โครงร่างวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue engineering scaffolds) การประยุกต์ใช้ทางด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อ จะใช้นาโนไฟเปอร์เป็นโครงร่างเพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์เนื่อเยื่อ โดยการใช้นาโนไฟเบอร์เป็นโครงร่าง จะมีข้อดีกว่าไมโครไฟเบอร์คือมีพื้นที่ให้เซล์ยึดเกาะได้มากกว่า ทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าและโครงสร้างของนาโนไฟเบอร์ยังมีลักษณะคล้ายกับ extra-cellular matrix อีกด้วย จึงมีผู้วิจัยทำการศึกษานาโนไฟเบอร์ที่นำไปใช้ทางด้านโครงร่างวิศวกรรมเนื้อเยื่อกันมากในปัจจุบัน [8]

2. Medical prostheses เป็นการนำไปใช้ในการเป็นอวัยวะเทียม หลอดเลือดเทียม เนื้อเยื่อเทียมสำหรับซ่อมแซมกระดูกอ่อน และเส้นประสาท โดยตัวอย่างของการนำไปใช้ เช่น the new technology of Virginia commonwealth university ได้ศึกษาการขึ้นรูปนาโนไฟเบอร์โดยใช้คอลลาเจนเป็นหลอดเลือดเทียม นำไปใช้ในการผ่าตัดทำ bypass หัวใจโดยแทนที่การใช้หลอดเลือดจากขา Professor Gerald E. Scheider และ Rutledge Ellis-Behnke ได้ทำการศึกษา นาโนไฟเบอร์ที่เกิดขึ้นได้เองจากอาร์จินิน (argenen) อะลานิน (alanine)และ กรดกลูตามิค (glutamic acid) 16 โมเลกุลเรียงซ้ำไปมาและมีโครงร่างแบบ β-sheet ที่สามารถช่วยให้การเจริญเติบโตของ axon ขึ้นมาใหม่ เมื่อฉีดสารละลายของกรดอะมิโนเหล่านี้เข้าไปในสมองหนูที่ถูกทำลาย เนื่องจากนาโนไฟเบอร์เข้าไปช่วยเสริมในสมองส่วนที่ถูกทำลาย เมื่อเซลล์ประสาทเข้าไปอยู่ในโครงร่างนาโนไฟเบอร์ทำให้มีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น งานวิจัยนี้ถือเป็นความหวังใหม่ในการซ่อมแซมเซลล์สมองของมนุษย์ [9-10]

3. สิ่งตกแต่งแผล (Wound dressing) นาโนไฟเบอร์มีคุณสมบัติที่โดดเด่นในด้านพื้นที่ผิว

ดังนั้นในการนำเป็นสิ่งตกแต่งแผลจะมีข้อดีกว่าผ้าก๊อซธรรมดาคือมีพื้นที่ผิวในการดูดซับของเหลวได้มากกว่าทำให้แผลแห้งเร็ว และยังเป็นโครงร่างทำให้เซลล์ใหม่เจริญเติบโตได้ดีทำให้แผลหายเร็วและสามารถป้องกันการเกิดแผลเป็นได้ดีกว่า นอกจากนี้ด้วยรูที่มีขนาดเล็กของนาโนไฟเบอร์ยังเป็นสิ่งกีดขวางไม่ให้แบคทีเรียผ่านเข้าไปได้ แต่ยังระบายอากาศได้ดี นิยมใช้พอลิเมอร์ที่มีคุณสมบัติสลายได้เองในร่างกายโดยสามารถ spray โดยตรงไปที่แผล หรือทำเป็นแผ่นสำหรับติดแผล พอลิเมอร์ที่นิยมใช้ เช่น คอลลาเจน ไคโตซาน เป็นต้น[11-12]

4. เครื่องสำอาง (Cosmetic) โดยใช้เป็นเครื่องมือในการนำส่งเครื่องสำอางเข้าสู่ผิว ในลักษณะของแผ่นมาส์ก เนื่องจากแผ่นเส้นใยมีพื้นที่ผิวมาก ทำให้การบรรจุสารต่างๆ ลงในแผ่นได้ปริมาณมาก สารที่นิยมใช้ เช่น สารทำความสะอาด สารเพิ่มความชุ่มชื้น สารแอนติออกซิเดชัน เป็นต้น นอกจากจะสามารถใส่สารในแผ่นมาส์กนาโนไฟเบอร์ได้ในปริมาณมากแล้วการปลดปล่อยยังเกิดได้รวดเร็วในระยะแรกอีกด้วย ทำให้ได้รับปริมาณสารปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้น[13]

5. ระบบนำส่งยา (Drug delivery system) ด้วยเหตุผลเดียวกันการประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางทำให้สามารถบรรจุยาได้มาก มีการปลดปล่อยยาที่รวดเร็ว และยังสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาได้ หากใช้เทคนิค coaxial electrospinning โดยสามารถควบคุมปริมาณยาปลอยปล่อยได้โดยการควบคุมอัตราการไหลของตัวยาในสารละลายที่อยู่ใน capillary ด้านใน ทำให้แกนมีปริมาณมากหรือน้อยตามต้องการ ตัวอย่างยาที่มีการศึกษาวิจัย เช่น ยาในกลุ่มต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ในการป้องกันการติดเชื้อหลังผ่าตัด โดยเมื่อผ่าตัดเสร็จแล้วจะฝังนาโนไฟเบอร์ที่สลายได้ในร่างกายที่มียาต้านเชื้อแบคทีเรียอยู่ลงไป ยาต้านมะเร็งใช้การฝังเข้าไปในอวัยวะที่เป็นมะเร็ง ยาแก้ปวดและต้านการอักเสบมีการศึกษาโดยการพัฒนาเป็นแผ่นแปะผิวหนัง เป็นต้น[14]

ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มีความสำคัญเป็นอันดับ 2 รองจากเซลลูโลส สกัดได้จากเปลือกของสัตว์กลุ่มคัสเตเซียน เช่น พวกปู กุ้ง เป็นต้น ซึ่งเปลือกของสัตว์เศรษฐกิจเหล่านี้ถือเป็นของเหลือใช้ จึงมีการนำมาสกัดเป็นไคติน และผ่านกระบวนการ deacetylation กลายเป็นไคโตซาน (เมื่อมีเปอร์เซ็นต์การ deacetylation มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป) ไคโตซานพอลิเมอร์นับว่าเป็นพอลิเมอร์ที่เข้ามามีบทบาทในด้านการแพทย์มากมาย เนื่องจากคุณสมบัติที่โดดเด่นหลายประการ เช่น สามารถเข้ากับได้กับร่างกาย (biocompatibility) สามารถสลายตัวได้ในร่างกาย (biodegradability) มีความเป็นพิษต่ำ มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีผู้วิจัยสนใจนำไคโตซานมาใช้ทางการแพทย์ เช่น ระบบนำส่งยานาโนพาทิเคิล วัสดุโครงร่างวิศวกรรมเนื้อเยื่อนาโนไฟเบอร์ วัสดุปิดแผล ในส่วนของนาโนไฟเบอร์นั้นเนื่องจากโครงสร้างของไฟเบอร์มีลักษณะคล้ายกัน extra-cellular matrix และไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่เข้ากันได้กับร่างกาย มีความเป็นพิษต่ำ จึงมีผู้วิจัยสนใจเตรียมนาโนไฟเบอร์จากไคโตซาน โดยวิธีกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่ง ปัญหาที่ไม่สามารถเตรียมไคโตซานนาโนไฟเบอร์ด้วยอิเล็กโตรสปินนิ่งได้คือ (a) ประจุของสารละลายไคโตซาน เนื่องจากไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วย poly (b-(1-4)-N-acetyl-D-

glucosamine) ในสายโมเลกุลของไคโตซานจะมีหมู่ NH_2 ขึ้นอยู่กับ degree of deacetylation ของไคโตซาน เมื่อละลายไคโตซานในสารละลายกรด หมู่ NH_2 จะแตกตัวให้ประจุบวกทำให้สายพอลิเมอร์ไคโตซานจัดเรียงตัวเป็นเส้นตรง (stretched conformation) เนื่องจากแรงคูลอมบ์ (Coulomb forces) ทำให้ไม่สามารถผ่านกระบวนการอิเล็กเล็กโตรสปินนิ่งได้ เพราะประจุของสายพอลิเมอร์จะไปขัดขวางการจัดเรียงตัวของเส้นใยในช่วง whipping instability ของกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่ง (b) ความเข้มข้นและความหนืดของสารละลายไคโตซาน เนื่องจากสารละลายไคโตซานในกรดที่เจือจางจะมีความหนืดสูงที่ความเข้มข้นต่ำ ปรากฏการณ์นี้เกิดเนื่องจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซีกับหมู่อะมิโน บนโครงร่างของพอลิเมอร์ ปรากฏการณ์ดังกล่าว ทำให้พอลิเมอร์มีปริมาณของสายโมเลกุลไม่พอในการเกิดเป็นเส้นใย ระหว่างกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่ง และความหนืดที่สูงจะไปขัดขวางทำให้การไหลผ่านของสารละลายพอลิเมอร์ใน capillary tip ที่ใช้ในกระบวนการด้วย (c) แรงตึงผิวของสารละลายไคโตซาน สารละลายไคโตซานในกรดที่เจือจางจะมีแรงตึงผิวสูง จะไปขัดขวางกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่งในส่วนของ taylor cone (ช่วงหนึ่งของกระบวนการที่แรงจากศักย์ไฟฟ้าที่ให้กับสารละลายมีค่าเท่ากับแรงตึงผิวของสารละลาย) ก่อนที่จะเกิดการพุ่งออกของสารละลายพอลิเมอร์ ทำให้สารละลายที่มีแรงตึงผิวสูงไม่สามารถผ่านกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่งได้ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้พยายามเตรียมนาโนไฟเบอร์จากไคโตซานโดยกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่ง เนื่องจากคุณสมบัติที่โดดเด่นของไคโตซานที่กล่าวข้างต้น เพื่อที่จะแก้ปัญหาของสารละลายไคโตซานที่ไม่เหมาะสม ผู้วิจัยประสบความสำเร็จสามารถเตรียมนาโนไฟเบอร์ได้จากกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่ง โดยอาศัยเทคนิคต่างๆ เช่น ใช้กรดความเข้มข้นสูงเป็นตัวทำละลาย [15] ใช้พอลิเมอร์ชนิดอื่นมาผสม เช่น poly vinyl alcohol (PVA), poly ethylene oxide (PEO), collagen, poly acrylamide (PAAm), poly lactide-co-glycolide (PLGA) และ poly vinyl pyrrolidone (PVP) เป็นต้น[16-19] และใช้ไคโตซานที่มีการดัดแปลงโครงสร้าง[20-21] เป็นต้น

มังคุด (Mangosteen) มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Garcinia mangostana L.* อยู่ในวงศ์ Guttiferae (Clusiaceae) เป็นไม้ยืนต้นสูง 10-20 เมตร ทุกส่วนมียางสีเหลือง ใบมีขนาดใหญ่ยาวรูปไข่หรือรูปวงรีเป็นใบเดี่ยวออกตรงข้าม เนื้อใบค่อนข้างหนาและเหนียว ออกดอกเป็นดอกเดี่ยวหรือดอกคู่ที่ซอกใบใกล้ปลายกิ่ง กลีบเลี้ยงสีเขียวอมเหลือง กลีบดอกสีแดงฉ่ำน้ำ ผลค่อนข้างกลมผิวกลมเกลี้ยงเมล็ดมีรกสีขาวหุ้มซึ่งเป็นส่วนที่ใช้รับประทาน มังคุดเป็นผลไม้ยอดนิยมที่สุดชนิดหนึ่งของคนไทย[22] ประโยชน์ของมังคุดมิได้มีอยู่แค่เนื้อในของมังคุดที่เราใช้เป็นอาหารเท่านั้น เปลือกผลมังคุดกับมีประโยชน์มากมายที่สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรคอย่างได้ผล คนไทยรู้จักการใช้ประโยชน์จากเปลือกมังคุดมาเป็นยารักษาโรคมานานแล้ว เพราะคนไทยสมัยโบราณค้นพบว่าเปลือกผลมังคุดมีฤทธิ์ฝาดสมาน จึงนำเปลือกผลมังคุดมาใช้เป็นยาแก้ท้องเสีย แก้ท้องร่วงเรื้อรัง ถ่ายเป็นมูกเลือด โดยการใช้เปลือกผลมังคุดสดหรือเปลือกผลแห้งฝนกับน้ำรับประทาน หรือจะใช้เปลือกแห้งต้มกับน้ำรับประทานก็ได้ผลเช่นเดียวกัน เปลือกผลมังคุดยังมีสรรพคุณในการสมานแผล ช่วยให้แผลหายเร็ว

เช่นใช้รักษาบาดแผลผุพอง แผลเน่าเปื่อย แผลเป็นหนอง โดยการใช้เปลือกผลมังคุดฝนกับน้ำปูนใส ทาบริเวณแผล น้ำต้มเปลือกผลมังคุดแห้งต้มน้ำล้างแผลใช้แทนการด้วยน้ำยาล้างแผลหรือด่างทับทิม ได้ด้วย สรรพคุณที่โดดเด่นอีกอย่างหนึ่งของเปลือกผลมังคุดที่มีการใช้กันมาตั้งแต่อดีต ก็คือการใช้เปลือกมังคุดรักษาโรคผิวหนัง เช่น กลากเกลื้อน บรรเทาอาการผดผื่นทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ได้เป็นอย่างดี โดยใช้เปลือกผลมังคุดแห้งต้มน้ำอาบหรือใช้น้ำต้มเปลือกมังคุดทาบริเวณที่มีอาการ สรรพคุณในการรักษาโรคผิวหนังของเปลือกผลมังคุดนี้ ได้รับการพิสูจน์และยืนยันจากการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่ค้นพบว่า รสฝาดในเปลือกผลมังคุดนี้มีสารแทนนิน (tannin) และสารแซนโทน (xanthone) ที่มีชื่อเรียกเฉพาะชื่อเดียวกับมังคุดว่า สารแมงโกสติน (mangostin) สารแทนนินมีฤทธิ์สมานแผลช่วยให้แผลหายเร็วขึ้น สารแมงโกสตินมีฤทธิ์ช่วยลดอาการอักเสบ และต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง สารแซนโทนในเปลือกผลมังคุดยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังและกลากได้ ในปี พ.ศ. 2526 จากผลการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารเคมีในเปลือกผลมังคุดของวิลาวัลย์ มหาบุษราคัม[23] ที่ศึกษาสารประกอบกลุ่ม xanthones 5 ชนิด คือ mangostin, β-mangostin, γ-mangostin, gartanin และ 8-deoxygartanin mangostin เป็นสารหลักที่สกัดได้ในปริมาณมาก เมื่อศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* สามารถสรุปได้ว่า สารแมงโกสตินเป็นสารที่ออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* นอกจากนั้นยังพบว่าสารแมงโก สตินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราเดอร์มาโตฟัยท์ คือ *Trichophyton mentagrophyte, Microsporum gypseum* และ *Epidermophyton floccosum* แต่ไม่มีผลต่อ *Candida albicans* เลย(24)

ในปี ค.ศ. 1985 Mahabusarakam และคณะ [25] พบว่าสารเคมีที่สกัดจากเปลือกผลมังคุดที่แห้งและบดละเอียดโดยใช้เบนซินเป็นตัวทำละลายเป็นสารประกอบกลุ่ม xanthones และเมื่อศึกษาฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสาร 5 ชนิด คือ mangostin, gartanin, γ-mangostin, ι-isomangostin และ 3-isomangostin ผลปรากฏว่าสารทั้ง 5 ชนิดแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ทั้งต่อสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาเพนนิซิลลิน สารแมงโกสตินแสดงฤทธิ์ดีที่สุดและให้ค่า MIC (minimum inhibitory concentration) ใกล้เคียงกับยาเมทิซิลลินซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย นอกจากนั้นยังพบว่า mangostin, γ-mangostin และ gartanin ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoforman* แต่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Trichophyton mentagrophyte* และ *Microsporum gypseum* ได้ในระดับปานกลาง

ในปี พ.ศ. 2539 Iinuma M. และคณะ[26] ได้ทำการวิจัยถึงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลลิน ผลปรากฏว่าสารแมงโกสตินแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลลินได้โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 1.57-12.5 mcg/ml ซึ่งมีฤทธิ์เทียบเท่ายาปฏิชีวนะ เช่น แวนโคมัยซิน ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 3.13-6.25 mcg/ml และยังพบว่าเมื่อนำโมเลกุลของแวนโคมัยซินมาเชื่อมกับโมเลกุลของแมงโกสตินจะได้สารที่

มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยาเมทิซิลลิน (MRSA) มากกว่าเดิม นอกจากนี้ยังพบว่ามีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อรา[27] และเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*)[28] ดังนั้นการพัฒนายาจากสารกลุ่ม xanthones นี้เพื่อใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ เชื่อว่าน่าจะมีผลในแง่ของการลดพิษภัยหรืออาการข้างเคียงจากการใช้กลุ่มยาปฏิชีวนะลง

มีรายงานฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด สารออกฤทธิ์คือ แอนโทไซยานิน แมงโกสติน อัลฟา- และแกมมา-แมงโกสติน สารแกมมา-แมงโกสตินแสดงฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันแรงกว่า BHA และ alpha-tocopherol [29] นอกจากนี้ยังพบว่าแมงโกสตินสามารถต้านออกซิเดชันของไขมันชนิด LDL ในหลอดทดลองได้จึงเชื่อว่าจะสามารถลดความเสี่ยงการเกิดเส้นเลือดอุดตันจากไขมันได้[30]

มีรายงานผลการต้านการอักเสบของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดโดยพบว่า แมงโกสตินและอนุพันธ์ของแมงโกสตินสามารถต้านการอักเสบที่อุ้งเท้าหนูขาวเมื่อให้ทางปากและฉีดเข้าช่องท้อง[31] มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ของสาร mangostin ในการยับยั้งการหลั่งฮีสตามีน เอนไซม์ cyclooxygenase และ prostaglandin E2[32-35] นอกจากนี้สาร mangostin จากเปลือกผลมังคุดยังมีผลรักษาแผลในหนูขาว[36] มีรายงานผลการต้านการอักเสบของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดโดยพบว่า แมงโกสตินและอนุพันธ์ของแมงโกสตินสามารถต้านการอักเสบที่อุ้งเท้าหนูขาวเมื่อให้ทางปากและฉีดเข้าช่องท้อง[31] มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ของสาร mangostin ในการยับยั้งการหลั่งฮีสตามีน เอนไซม์ cyclooxygenase และ prostaglandin E2[32-35] นอกจากนี้สาร mangostin จากเปลือกผลมังคุดยังมีผลรักษาแผลในหนูขาว[36]

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ทำให้คณะผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะนำสารสกัดจากสมุนไพรไทยคือสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด มาใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เส้นใยอิเล็กโตรสปันเพื่อใช้งานทางด้านยาและเครื่องสำอาง จากการศึกษาในเชิงเภสัชวิทยาของสารสกัดของสมุนไพรไทยพบว่า สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ช่วยในการสมานแผลได้ ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการเตรียมเส้นใยนาโนเพื่อใช้ในการรักษาแผล โดยเลือกใช้พอลิเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถช่วยสมานแผลได้ คือไคโตซาน และเติมสารที่มีฤทธิ์ช่วยฆ่าเชื้อได้ดี และลดการอักเสบ คือสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด จากนั้นทำการเตรียมและขึ้นรูปเส้นใยนาโน และศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของแผ่นแปะที่ได้ คือ รูปร่างและขนาดของเส้นใยที่เตรียมได้ ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเตรียมและการบรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด การปลดปล่อยสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ตลอดจนความคงตัวของสารสกัด การมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อทั้งก่อนและหลังเตรียมเส้นใยนาโน และการสมานแผล

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาเส้นใยนาโนที่เตรียมจากไคโตซานและบรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด เพื่อพัฒนาเป็นแผ่นปิดแผลที่มีฤทธิ์ในการช่วยสมานแผล
2. ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของแผ่นปิดแผลที่เตรียมได้
3. ศึกษาฤทธิ์ฆ่าเชื้อ รวมทั้งความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้
4. ศึกษาการสมานแผลของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้

เป้าหมาย

เพื่อพัฒนาไคโตซานอย่างเป็นระบบเพื่อให้ได้เกลือไคโตซานที่ละลายน้ำได้ดี มีพิษต่ำและมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดี สามารถนำอนุพันธ์ไคโตซานที่มีประโยชน์เหล่านี้มาพัฒนาเป็นเส้นใยนาโนที่บ รรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด เพื่อพัฒนาเป็นแผ่นปิดแผลที่มีฤทธิ์ในการช่วยสมานแผล เป็นการเพิ่มมูลค่าเพิ่มของไคโตซาน สามารถนำไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์ และทดแทนการนำเข้าไคโตซานและผลิตภัณฑ์ปิดแผลจากต่างประเทศ สามารถเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมไทย

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. เผยแพร่ผลงานในงานประชุมระดับชาติ และระดับนานาชาติ
2. ตีพิมพ์วารสารวิชาการระดับนานาชาติ อย่างน้อย 3 เรื่อง
3. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้นำไปทดสอบในมนุษย์ต่อไปนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์แผ่นปิดแผลที่มีคุณภาพสูงราคาต่ำสามารถผลิตในประเทศไทยได้

บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

สารเคมี

1.1 สารเคมีที่ใช้เตรียมแผ่นนาโนไฟเบอร์

- Chitosan (degree of deacethylation = 0.85, molecular weight = 110 kDa) (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Polyvinyl alcohol (PVA) (degree of polymerization ~ 1600, degree of hydrolysis ~97.5 – 99.5 mol%) (Fluka, Buchs, Switzerland)
- Hydroxybenzotriazole (HOBt) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Thiamine pyrophosphate (TPP) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)

1.2 สารเคมีในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ ดังนี้

- Dulbecco's modified eagle medium (DMEM medium) (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)
- Fetal bovine serum (FBS) (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)
- L-Glutamine-200 mM (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)
- Penicillin G sodium for injection (sterile) (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)
- Sodium Pyruvate 100 mM (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)
- Sterile water for irrigation (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)
- Streptomycin sulfate (sterile) (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)
- Trypan blue stain 0.4% w/v (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)
- Trypsin-EDTA (0.25%) solution (GIBCO™, Grand Island, NY, USA)
- Tryptone soy broth (TSB) (Lab M Limited, Bury, Lancashire, UK)

1.3 สารเคมีอื่น ๆ

- 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl(DPPH)(Sigm a-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-

Aldrich®, St. Louis, MO, USA)

- 2,4,6-tripyridyl-s-triazine complex (TPTZ) (Fluka, Buchs, Switzerland)
- Acetic acid (Fisher Scientific, UK Limited, UK)
- Acetronite HPLC grade (RCI Labscan Limited, Bangkok, Thailand)
- Acetone (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Ascorbic acid (Fluka, Buchs, Switzerland)
- Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Deoxyribose (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Dimethyl sulphoxide (Fisher Scientific, UK Limited, UK)
- Ethanol absolute (Scharlau Chemie S.A., Spain)
- Ferric Chloride ($FeCl_3$) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Ferrous Chloride ($FeCl_2$) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Ferrozine (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Folin-Ciocalteu (Fluka, Buchs, Switzerland)
- Gallic acid (Fluka, Buchs, Switzerland)
- Hydrochloric acid (Scharlau Chemie S.A., Spain)
- Hydrogen peroxide (H_2O_2) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Methanol (RCI Labscan Limited, Thailand)
- Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Nitrotetrazolium blue chloride (NBT) (Fluka, Buchs, Switzerland)
- Non-essential amino acids (100X) (Biochrom AG, Berlin, Germany)
- Phenazonium methyl sulfate (PMS) (Fluka, Buchs, Switzerland)
- Orthophosphoric acid (Fluka, Buchs, Switzerland)
- Potassium bromide (IR grade) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Potassium chloride monobasic (Ajax Finechem Australia, New Zealand)
- Potassium ferricyanide (Merck, Darmstadt, Germany)
- Potassium persulfate (Fluka, Buchs, Switzerland)
- Potassium phosphate (Ajax Finechem Australia, New Zealand)
- Sodium bicarbonate (BDH AnalaR®, VWR International Ltd. England)
- Sodium chloride (Ajax Finechem Australia, New Zealand)
- Sodium dodecylsulfate (Fisher Scientific, UK Limited, UK)
- Sodium hydroxide pellet (Ajax chemicals, New South Wales, Australia)

- Sodium phosphate (Ajax Finechem Australia, New Zealand)
- Tannic acid (Merck, Darmstadt, Germany)
- Thiobarbituric acid (TBA) (Fluka, Buchs, Switzerland)
- Trichloroacetic acid (TCA) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Triethanolamine (Ajax Finechem Australia, New Zealand)

1.4 สารสกัดสมุนไพร

ผลมังคุดสด (mangosteen, *Garcinia Mangostana*) ซื้อจากห้าง Tesco Lotus อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม

1.5 เซลล์เพาะเลี้ยง และเชื้อแบคทีเรีย

- Normal human foreskin fibroblast (NHF) cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA).
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P and *Escherichia coli* ATCC 10536 were obtained from Department of Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhonpathom, Thailand.

1.6 สัตว์ทดลอง

- Male Wistar rat ซื้อจาก National Laboratory Animal Center มหาวิทยามหิดล นครปฐม การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติโดย An Investigational Review Board (Animal Studies Ethics Committee, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Approval No. 2-2553).

วัสดุอุปกรณ์

- 1.5 mL Eppendorf® tubes (CORNING; Corning Incorporated, NY, USA)
- 15, 50 mL centrifuge tubes-sterile (Biologix Research Company, KS, USA)
- mL Cryogenic tube (Sorenson™, BioScience, Inc., PA, USA)
- 25, 75 cm^2 tissue culture flask (CORNING; Corning Incorporated, NY, USA)
- Analytical balance (Sartorius CP224S, Sartorius CP3202S; Scientific Promotion Co.,Ltd, Bangkok, Thailand)
- Automatic Autoclave (Model: LS-2D; Scientific Promotion Co.,Ltd, Bangkok, Thailand)
- Brookfield viscometer (Model DV-III ultra, Brookfield Engineering Laboratories, Inc., MA, USA)
- Beaker (Pyrex, USA)
- Centrifuge (HERMLE Z300K: Labnet; Lab Focus Co., Ltd., Bangkok, Thailand)
- CO_2 Incubator (Heraeus HERA Cell 240, Heraeus Holding GmbH., Germany)
- Conductivity meter (Eutech Instruments Pte Ltd, Ayer Rajah Crescent, Singapore)
- Cylinder (Pyrex, USA)
- Differential Scanning Calorimeter (DSC, Pyris Sapphire DSC, PerkinElmer instrument, USA)
- Drop shape analyzer (FTA 100, First Ten Angstroms Inc, Portsmount, VA, USA)
- Flat-bottomed 96-well cell culture plates (Costar; Corning Incorporated, NY, USA)
- Fluorescence 96 well plates (Bottom) (Costar; Corning Incorporated, NY, USA)
- Fluorescence-UV spectrophotometer (Fusion Universal Microplate Analyzer, Model AOPUS01 and A153601, PACKARD Instrument Company, Inc., Illinois, USA).
- Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR, Nicolet 4700, Becthai, USA)
- Freezer/Refrigerator -20°C, -80°C
- Glass Syringe 5 mL
- Hemocytometer 0.1 mm deep chamber (BOECO, Germany)
- High Performance Liquid Chromatography (HPLC) instrument (Agilent 1100 series, Agilent Technologies, USA)
- High voltage power supply (Gamma High Voltage Research, USA)
- Inverted Microscope (ECLIPSE TE 2000-U; Model: T-DH Nikon®, Japan)
- Laminar air flow (BIO-II-A, Telstar Life Science Solutions, Spain)

- Magnetic stirrer and magnetic bar
- Measuring pipettes (2, 5, 10 mL)
- Micropipettor 2-20 μL, 20- 200 μL, 100-1000 μL
- Multipoint pipettor with 8 channels aspiration manifold 20- 200 μL (Bio-Active Co., Ltd., Bangkok, Thailand)
- pH Meter (HORIBA compact pH meter B-212, Japan)
- Pipette aid (POWERPETTE Plus; Bio-Active Co., Ltd., Bangkok, Thailand)
- Sartorius filter set and sterilization filter 0.22 μm
- Scanning electron microscopy (SEM, Camscan Mx2000, England)
- Shaking Incubator (SHEL LAB, Model: SI4, Gibtahi Co., Ltd., Bangkok, Thailand)
- Sonics Vibra Cell^{TM} (VCX 134 PB, Sonics & Materials Inc., CT, USA)
- Syringe and sterilization filter 0.22 μm
- Syringe pump (NE-300, New Era Pump Systems, Inc., NY, USA)
- Texture analyzer (TA.XT plus, Stable Micro Systems, UK)
- UV-Vis spectrophotometer (Agilent model 8453 E, Germany)
- Vortex mixer (VX100, Labnet, NJ, USA)
- Water bath (HETOFRIG CB60; Heto High Technology of scandinevia, Birkerod, Denmark)

ระเบียบวิธีวิจัย

1. เตรียมสารละลายสำหรับอิเล็กโตรสปินนิ่ง

เตรียมสารละลายไคโตซาน 2% w/v โดยละลายไคโตซาน (degree of deacethylation 0.85, MW 110 kDa) ในน้ำกลั่นกับ HOBt, TPP และ EDTA ในอัตราส่วน CS:HOBt (1:1), CS:TPP (1:1) และ CS:EDTA (2:1) โดยน้ำหนัก ปั่นผสมจนสารละลายใส ตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีของสารละลายด้วย Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR, Nicolet 4700, Thermo scientific, USA) และ ^{1}H-nuclear magnetic resonance spectrometer (Bruker 300 MHz NMR) การตรวจสอบคุณลักษณะด้วย FT-IR และ NMR นั้นจะนำสารละลายไคโตซานเกลือชนิดต่างๆ ไปทำให้แห้งด้วย Freeze dry จากนั้นชั่งผงไคโตซานเกลือชนิดต่างมาใช้ต่อไป เตรียมสารละลาย PVA (degree of polymerization ≈ 1600, degree of hydrolysis ≈ 97.5-99.5 mol%, MW 72,000 kDa) 10% w/v ในน้ำกลั่นที่ 80 °C ปั่นผสมจนละลายหมดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำสารละลาย 2% w/v CS-HOBt, CS-TPP และ CS-EDTA ผสมกับสารละลาย 10% w/v PVA ที่อัตราส่วนตั้งแต่ 10/90 ถึง 90/10 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ วัดค่าความหนืดโดยใช้เครื่อง Brookfield viscometer (Model DV-III ultra, Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Massachusetts, USA) วัดค่าความนำไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง EUTECH ECtestr11+ conductivity meter (Eutech Instruments Pte Ltd, Singapore) วัดค่าแรงตึงผิวโดยใช้เครื่อง Drop shape analyzer (FTA 100, USA) และวัดค่า pH ของสารละลายสำหรับอิเล็กโตรสปินนิ่งโดยใช้เครื่อง pH meter (Horiba compact-B212)

2. อิเล็กโตรสปินนิ่ง

บรรจุสารละลายสำหรับอิเล็กโตรสปินนิ่งใส่ในหลอดฉีดยาแก้วขนาด 5 มิลลิลิตร ที่ต่อเข้ากับเข็มโลหะขนาด 20G (เส้นผ่านศูนย์กลาง = 0.9 มิลลิเมตร). เข็มโลหะต่อเข้ากับขั้วบวกของเครื่อง Gamma High Voltage Research ที่ให้ศักย์ไฟฟ้า ค่าความต่างศักย์ตั้งไว้ที่ 15 กิโลโวลต์ ส่วนรองรับเส้นใยเป็นแบบหมุนที่ห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยด์ ระยะห่างระหว่างปลายเข็มโลหะและส่วนรองรับเส้นใยอยู่ที่ประมาณ 20 เซนติเมตร อัตราการไหลของสารละลายตั้งไว้ที่ 0.25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง กระบวนการเกิดที่อุณหภูมิห้องโดยระยะเวลาการปั่นเส้นใยแต่ละตัวอย่างอยู่ที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งได้แผ่นเส้นใยที่มีความหนาประมาณ 20 – 30 ไมโครเมตร

3. การตรวจสอบคุณลักษณะแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน

3.1 การตรวจสอบคุณลักษณะเชิงพื้นผิว (Geometrical characterizations)

ตรวจสอบคุณลักษณะสัณฐานวิทยาและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM; Camscan Mx2000, England) โดยตัดตัวอย่างเส้นใยนาโนไฟเบอร์ให้มีขนาด 0.5 X 0.5 cm จากนั้นนำไปเคลือบทองก่อนที่จะนำไปถ่ายภายใต้อิเล็กตรอน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยโดยใช้โปรแกรม JmicroVision โดยสุ่มวัด 100 ครั้งในแต่ละตัวอย่างและสร้างกราฟการกระจายขนาดจากข้อมูลที่ได้จากโปรแกรม JmicroVision คุณลักษณะภายใต้ความร้อนของแผ่นเส้นใยนาโนประเมินโดยในเครื่อง DSC (Pyris Sapphire DSC, PerkinElmer instrument, USA) ภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน เก็บข้อมูลที่อุณหภูมิ 25 – 250 องศาเซลเซียส อัตราการให้ความร้อนที่ 5 องศาเซสเซียสต่อนาที

3.2 การตรวจสอบคุณลักษณะเชิงเคมี (Chemical characterizations)

ตรวจสอบคุณลักษณะโครงสร้างทางเคมีของแผ่นเส้นใยนาโนโดยใช้เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR, Nicolet 4700, Thermo scientific, USA) ในช่วง 400 – 4000 cm^{-1}

3.3 การตรวจสอบคุณลักษณะเชิงกล (Mechanical characterizations)

ตรวจสอบค่า Tensile strength ของแผ่นเส้นใยนาโนโดยใช้ texture analyzer (TA.XT plus, Stable Micro Systems, UK) ต่อเข้ากับโหลดเซลล์ 5 kg ใช้ tensile grips holder. ตัดตัวอย่างเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 5 × 25 มิลลิเมตร ความหนา 20-30 ไมโครเมตร

4. การประเมินคุณสมบัติแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน

4.1 การประเมินคุณสมบัติการพองตัว (% Degree of swelling)

การพองตัวของแผ่นเส้นใยนาโนทำที่อุณหภูมิห้องโดยแช่แผ่นเส้นใยนาโนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนก่อนและหลังจากแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง คำนวณเปอร์เซ็นค่าการพองตัว ตามสมการที่ 1:

$$\text{Degree of swelling}(\%) = \frac{(M - M_d)}{M_d} \times 100 \qquad (1)$$

โดย M คือ น้ำหนักของตัวอย่างหลังจากแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นเวลา *1* ชั่วโมง,

M_d คือ น้ำหนักเริ่มต้นของแผ่นเส้นใยนาโนไฟเบอร์ในขณะที่แห้ง

4.2 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานประเมินโดยใช้วิธีทางเคมีหลายวิธี เช่น Superoxide radicals scavenging, hydroxyl radicals scavenging, metal ion chelating และ reducing power.

4.2.1 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Superoxide radical scavenging assay

ปฏิกิริยาการเกิด Superoxide radical ทำได้โดยผสม PMS (30 μM), NADH (338 μM) และ NBT (72 μM) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1M pH 7.4) จากนั้นผสมสารละลายตัวอย่างจากแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ ปั่นผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Vis spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร คำนวณประสิทธิภาพการจับอนุมูลอิสระ (% scavenging effect) ตามสมการที่ 2

$$\text{Scavenging effect}\,(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}\,560\ \text{nm}}}{A_{\text{control}\,560\ \text{nm}}}\right) \times 100 \qquad (2)$$

4.2.2 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hydroxyl radical scavenging assay

สารละลายตัวอย่างจากแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ นำไปบ่มผสมรวมกับ deoxyribose (3.75 mM), H_2O_2 (1mM), $FeCl_3$ (100 μM), EDTA (100 μM) และ ascorbic acid (100 μM) ในสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (20 mM, pH7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย TBA (1% w/v) 1 มิลลิลิตร และสารละลาย TCA (2% w/v) 1 มิลลิลิตร ผสมในเข้ากัน นำไปให้ความร้อนในน้ำเดือดจัดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็น แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร คำนวณประสิทธิภาพการจับอนุมูลอิสระ (% scavenging effect) ตามสมการที่ 3

$$\text{Scavenging effect}\,(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}\,535\ \text{nm}}}{A_{\text{control}\,535\ \text{nm}}}\right) \times 100 \qquad (3)$$

4.2.3 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Metal ion chelating assay

การวัดความสามารถการจับไอออนเหล็กทำได้โดย การวัดค่าดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของ ferrous iron-ferrozine ที่ค่าความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ปฏิกิริยาทำได้โดยผสม

สารละลายตัวอย่างจากแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ กับ $FeCl_2$ (2 mM) และ ferrozine (5mM) ปรับปริมาตรด้วยน้ำ 0.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากับแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร คำนวณประสิทธิภาพการจับไอออนเหล็ก (% chelating effect) ตามสมการที่ 4

$$\text{Chelating effect (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}}{}_{562\ nm}}{A_{\text{control}}{}_{562\ nm}}\right) \times 100 \quad (4)$$

4.2.4 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Reducing power

สารละลายตัวอย่างจากแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ นำมาผสมกับ 2.5 มิลลิลิตร ของสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (200 mM pH 6.6) และ 2.5 มิลลิลิตร ของ 1% w/v potassium ferricyanide นำสารผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซสเซียสเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม 2.5 มิลลิลิตร 10% w/v trichloroacetic acid ลงในสารผสมและปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดส่วนบนมา 5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ 5 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร ของ 0.1% ferric chloride นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่มากแสดงถึงค่า reducing power ที่มากด้วย

4.3 การประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity)

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานทำการทดสอบด้วยเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ในการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) เลี้ยงเชื้อ *S.aureus* และ *E.coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (TSB) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่แขวนตัวอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไปเจือจางจนได้ความเข้มข้น 1×10^6 cfu/mL และ ปิเปต 1 มิลลิลิตรลงใน 24 well plate นำแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานชั่งน้ำหนักให้แตกต่างกันใส่ลงใน well ที่มีเชื้อ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง MIC คือ ค่าความเข้มข้นน้อยสุดที่เชื้อไม่เจริญเติบโตหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หาค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ทำโดยวัดค่า optical density (OD) ที่ 550 นาโนเมตร โดยเครื่อง microplate reader วัดค่า OD_{550} 3 ครั้ง ส่วนการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) นำอาหารเหลวใน well ที่เชื้อไม่เจริญเติบโต (หลุมที่ใส) มา spread บน plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 100 ไมโครลิตร นำ plate ที่ spread แล้วไปบ่มที่ 37 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากไม่พบโคโลนีของเชื้อก็แสดงว่า ความเข้มข้นในหลุมนั้นเป็นค่า MBC การหาค่า MIC และ MBC ทำซ้ำ 3 ครั้ง ใช้ เพนนิซิลิน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเป็น positive control

4.4 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

ความเป็นพิษต่อเซลล์ของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน ประเมินโดยใช้ MTT assay ดัดแปลงจากวิธีมาตรฐาน (ISO 10993-5 indirect contact) นำแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานไปผ่านแสงอัลตร้าไวโอเลท เพื่อฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นละลายแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน ใน อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากซีรั่ม (SFM) ที่ประกอบด้วย Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 1% l-glutamine 1% lactalbumin และ 1% antibiotic และ antimycotic ให้ได้ความเข้มข้น Normal human foreskin fibroblast (NHF) เซลล์ใน DMEM ที่มี 10% ซีรั่ม ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ 8000 เซลล์ใน 100 ไมโครลิตร หยอดลงใน 96-well plates นำไปเพาะเลี้ยงจนเซลล์เกาะที่ก้น plate เป็นเวลา 2 วัน ใน incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเซลล์เกาะที่ก้น plate แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วแทนที่ด้วยอาหารที่มีแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานละลายอยู่ นำไป incubate เป็นเวลา 1 วัน หลังจากเซลล์ได้สัมผัสกับสารละลายของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานจนครบเวลาแล้ว 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 โดยหลุมที่ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานละลายอยู่ (SFM) เป็นกลุ่มควบคุม (100% cell viability)

4.5 ศึกษาประสิทธิภาพการสมานแผล (In vivo wound healing)

เตรียมสัตว์ทดลองโดยใช้หนู Wistar rat เพศผู้ น้ำหนักตัวประมาณ 240-280 กรัม ทำการสลบหนูโดยการฉีดยา pentobarbital sodium หลังจากหนูสลบแล้ว ทำการโกนขนบริเวณด้านหลังคอของหนู จากนั้นปั้มผิวหนังหนูให้เป็นรอยวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.8 ตารางเซนติเมตร จากนั้นตัดผิวหนังออกให้เป็นแผล โดยหนู 1 ตัวตัดได้ 2 แผล จากนั้นปิดบาดแผลด้วย ตัวอย่างแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานชนิดต่างๆ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยรังสีอัลตร้าไวโอเลตเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือ ผ้าก๊อซ (negative control) หรือ แผ่นแปะแผลที่มีสารฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Sofra-tulle; positive control) เมื่อแปะแผลแล้ว วันถัดไปต้องวัดขนาดแผลเป็นประจำทุกวันจนกว่าบาดแผลจะหาย โดยวิธี planimetry คำนวณหา %wound healing ตามสมการ $A/A_i \times 100\%$, โดย A_i คือ ขนาดของบาดแผลเริ่มต้น และ A คือ ขนาดของบาดแผลที่เวลาต่างๆ

5. แผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานผสมสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดสำหรับสนามแผล

5.1 การเตรียมสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

นำเปลือกมังคุดมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นอบที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเปลือกมังคุดที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียด ชั่งผงเปลือกมังคุดที่แห้ง 50 กรัม นำมาสกัดด้วย 70% acetone ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งได้สารสกัด จากนั้นกรองกากออกด้วยกระดาษกรอง นำส่วนใสมาระเหยแห้งด้วย rotary evaporator สกัดตัวอย่าง 3 ครั้งคำนวณเปอร์เซ็นต์ yield แสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

5.2 การควบคุมคุณภาพสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

5.2.1 การหาปริมาณสาร แอลฟ่าแมงโกสตินในสารสกัด

เตรียมสารละลายสต๊อกของสารมาตรฐาน แอลฟ่าแมงโกสตินโดยชั่ง แอลฟ่าแมงโกสติน10 มิลลิกรัมละลายใน 10 มิลลิลิตร ของเมทานอล ในขวดวัดปริมาตรเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 200, 100, 50, 25, 10 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายตัวอย่างเตรียมจากการเจือจาง สารละลายสต๊อกของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิเคราะห์หาปริมาณ แอลฟ่าแมงโกสตินในสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดด้วย HPLC (Agillent technology, USA) ใช้คอลัมน์ C18 (250×4.6 mm, 5 µm particle size) (VertiSep® AQS) เป็นวัฏภาคคงที่ วิเคราะห์โดยใช้ระบบสารละลาย แบบ gradient โดยวัภาคเคลื่อนที่ คือ acetonitrile (mobile A) และ 0.1% v/v ortho phosphoric acid (mobile B) ใช้อัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ตั้งโปรแกรม gradient ดังนี้ 70% A ตั้งแต่ 0–15 นาที จาก 70% A ถึง 75% A ใน 3 นาที 75% A ถึง 80% A ใน 1 นาที 80% A ต่อไปถึง 6 นาที ลดจาก 80% A ถึง 70% A ใน 1 นาที ใช้ตัวตรวจวัดสัญญาณเป็น UV–visible ตั้งความยาวคลื่นไว้ที่ 320 นาโนเมตร คำนวณค่าปริมาณของแอลฟ่าแมงโกสตินและแสดงค่าเป็น กรัมต่อ 100 กรัม ของสารสกัด (gram per 100 g of the extract)

5.2.2 การหาปริมาณสารฟีนอลลิกในสารสกัด (Total phenolic content)

หาปริมาณของสารประกอบฟีนอลลิกโดยใช้วิธีการ Folin-Ciocalteu ทำได้โดยผสมสารสกัดตัวอย่าง 50 ไมโครลิตรใน 2.5 มิลลิลิตรของ Folin-Ciocalteu reagent (10% v/v) และ 2 มิลลิลิตรของ sodium bicarbonate solution (7.5% w/v) ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่ 45 องศาเซสเซียสเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณ

ค่าประมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดแสดงค่าเป็น grams of gallic acid equivalents (GAE)/100g of the extract

5.2.3 การหาปริมาณสารแทนนิกในสารสกัด (Total tannic content)

หาปริมาณของสารประกอบแทนนิกโดยวิธีการตกตะกอนโปรตีน ใช้ 2 มิลลิกรัม โบวีนซีรั่ม อัลบูมิน ผสมกับสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสด้านบนออก ละลายตะกอนด้วย ส่วนผสมของ sodiumdodecylsulfate และ triethanolamine 4 มิลลิลิตร เติม Ferric chloride 1 มิลลิลิตรตั้งทิ้งไว้อีกประมาณ 15 นาที หลังจากนั้น นำไป วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณค่าประมาณสารประกอบแทนนิกทั้งหมดแสดงค่าเป็น grams of tannic acid equivalents (TAE)/100g of the extract

5.2.4 การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5.2.4.1 การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ในเอทานอล จากนั้นผสมสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตรกับสารละลายตัวอย่างในปริมาตรที่เท่ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลท (Microplate Analyzer) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง %Inhibition ตามสมการที่ 5

$$\%\,\text{Inhibition} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}\,550\,\text{nm}}}{A_{\text{control}\,550\,\text{nm}}}\right) \times 100 \qquad (5)$$

ค่า IC_{50}, คำนวณได้จากกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้น แสดงเป็นค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งได้ 50 เปอร์เซ็นจากนั้น แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

5.2.4.2 การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

เตรียมสารละลาย ABTS โดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง 7 มิลลิโมลาร์ ABTS กับ 4.95 มิลลิโมลาร์ potassium persulfate เก็บสารผสมไว้ในที่มืด 12 – 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนจะนำมาใช้ให้เจือจางสารละลายในฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7 จนมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.7±0.02 ที่ความยาวคลื่น

734 นาโนเมตร ได้เป็น working solution จากนั้น ผสม working solution 3.9 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาทีที่ อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง %Inhibition ตามสมการที่ 6

$$\%\,\text{Inhibition} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}\,734\,\text{nm}}}{A_{\text{control}\,734\,\text{nm}}}\right) \times 100 \qquad (6)$$

คำนวณค่า IC_{50} ตามที่ได้อธิบายไว้ใน วิธี DPPH

5.2.4.3 การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

เตรียมสารละลาย FRAP โดยผสมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 3.6 (a) สารละลาย ferric chloride 20 มิลลิโมลาร์ (b) สารละลาย TPTZ 10 มิลลิโมลาร์ (c) ในอัตราส่วน 10:1:1 (a:b:c) เริ่มปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ในสารละลาย FRAP 950 ไมโครลิตร บ่มสารผสมเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องและวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย $FeSO_4{\cdot}H_2O$ แสดงค่าเป็น EC1 หมายถึงค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่า 1 มิลลิโมลาร์ $FeSO_4{\cdot}H_2O$

5.2.4.4 การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี galvinoxyl radicals

เตรียมสารละลาย galvinoxyl 1 มิลลิโมลาร์ ในเมทานอล ปฏิกิริยาเริ่มโดยผสมสารละลาย galvinoxyl 900 ไมโครลิตร ในสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร นำสารผสมบ่มที่ 37 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 20 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง %Inhibition ตามสมการที่ 7

$$\%\,\text{Inhibition} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}\,420\,\text{nm}}}{A_{\text{control}\,420\,\text{nm}}}\right) \times 100 \qquad (7)$$

คำนวณค่า IC_{50} ตามที่ได้อธิบายไว้ใน วิธี DPPH

5.2.5 การประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity)

การประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทำเช่นเดียวกับวิธีที่อธิบายไว้ในข้อ 4.3 โดยใช้เชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*

5.3 การเตรียมแผ่นเส้นใยนาโนจากสารละลายไคโตซานที่ใส่สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิ่ง

ปิเปตสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ลงในสารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างปั่นผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สารละลายที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่ความเข้มข้นต่างๆ นำมาเตรียมเป็นเส้นใยนาโน ตามวิธีที่อธิบายไว้ในข้อ 2

5.4 การตรวจสอบคุณลักษณะของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

ตรวจสอบคุณลักษณะเชิงพื้นผิว เชิงเคมี และเชิงกล ตามที่อธิบายไว้ในข้อ 3

5.5 การหาปริมาณและการปลดปล่อยสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดจากแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน

ละลายแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด 5 มิลลิกรัม ในส่วนผสมของอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.5 กับเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 5 มิลลิลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายดังกล่าว 1 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ แอลฟ่าแมงโกสตินในแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานแล้วคำนวณกลับเป็นปริมาณสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

ศึกษาการปลดปล่อยสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดจากแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน โดยใช้ Franz's diffusion cells ใช้ media เป็นอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.5 กับเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 ตัดแผ่นเส้นใยนาโนให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับเซลล์ที่ใช้ นำไปชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนเพื่อนำไปใช้คำนวณ จากนั้นติดตั้งบนเซลล์โดยใช้ membrane เป็นตัวกั้น ใช้น้ำที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสหล่อเซลล์ เมื่อเติม media จนสัมผัสกับแผ่นเส้นใยนาโน ให้เริ่มจับเวลา หลังจากนั้นสุ่มตัวอย่างออกมา 1 มิลลิลิตรที่เวลาต่างๆ จนถึง 480 นาที เมื่อสุ่มตัวอย่างออกมาแล้วให้ใส่ media ใหม่ลงไปแทนที่ นำสารละลายตัวอย่างที่สุ่มออกมาไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดโดยใช้ HPLC ข้อมูลที่ได้นำมาคำนวณหาปริมาณการปลดปล่อยสะสมในแต่ละช่วงเวลา ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

5.6 การประเมินแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

ประเมินคุณสมบัติของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ตามหัวข้อต่างๆ เช่นเดียวกับที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 4 สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดจะศึกษาโดยใช้วิธีที่ทำในแผ่นเส้นใยนาโนไคซาน และสารสกัดจากเปลือกมังคุด

นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังได้ทำการทดลองทางด้าน histology โดยหมูจะถูกกำจัดในวันที่ 11 ของการศึกษา ตัดเนื้อเยื่อในส่วนบาดแผลของหนูตรึงด้วย 10% formalin buffer และ embedded ใน paraffin ตัดที่ความหนา 5 μm ย้อมส่วนที่เป็นนิวเคลียสด้วย hymatoxylin ล้างด้วนน้ำประปา ตามด้วย 0.3% acid alcohol ล้างด้วยน้ำประปาอีกครั้ง จากนั้นย้อมด้วย eosin เป็นเวลา 2 นาที แล้วทำให้แห้งนำไปใส่ในสไลด์แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Nikon Inverted-Eclipse TE2000-U, Japan)

5.7 การศึกษาความคงตัวของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

การศึกษาความคงตัวทำในสภาวะเร่ง (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75) เปรียบเทียบกับสภาวะปกติ (อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 40) เป็นเวลา 6 เดือน โดยประเมินลักษณะภายนอก ปริมาณของสาร แอลฟ่าแมงโกสติน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ tensile strength ของแผ่นเส้นใยนาโนทุกๆ เดือน และลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยนาโนภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนทุกๆ 3 เดือน

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ Statistical analysis

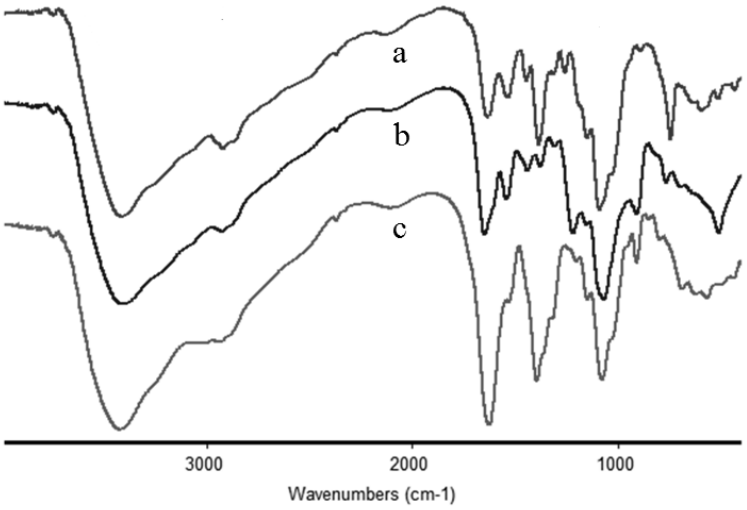
ข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาจากการทำซ้ำ 3 ครั้ง ข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ใช้สถิติ one-way analysis of variance (ANOVA) สำหรับวิเคราะห์ความแตกต่าง กำหนดระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม (SPSS version 10.0 for Windows (SPSS Inc., USA))

บทที่ 3

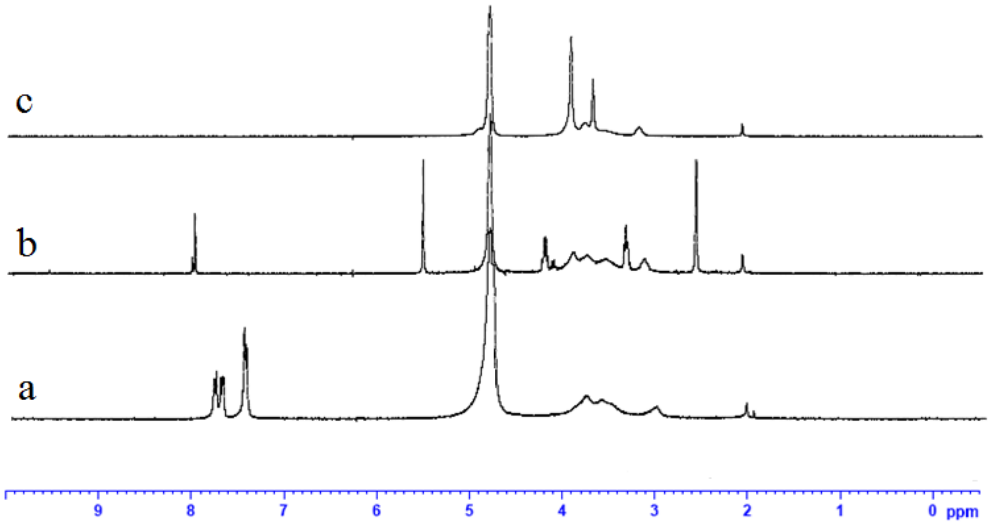
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การเตรียมสารละลายสำหรับอิเล็กโตรสปินนิ่ง

เตรียมสารละลายไคโตซาน 2% w/v โดยละลายไคโตซานในน้ำกลั่นกับ HOBt, TPP หรือ EDTA ในอัตราส่วน CS:HOBt (1:1), CS:TPP (1:1) และ CS:EDTA (2:1) โดยน้ำหนัก ปั่นผสมจนสารละลายใส ทำให้แห้งด้วย Freeze dry นำมาตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมีของสารละลายด้วย FT-IR และ NMR ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ จากรูปที่ 1 และ 2 แสดงให้เห็นว่า ไคโตซานกับสารที่ช่วยละลายไคโตซานสามารถผสมกันได้ในระดับโมเลกุลทั้ง HOBt, TPP และ EDTA สังเกตได้จาก FTIR spectrum พบว่า สเปกตรัมของสารละลายไคโตซานที่ละลายกับเกลือชนิดต่างๆ จะเปลี่ยนแปลงไป เช่นเดียวกับผลของ ^{1}H-NMR สเปกตรัม

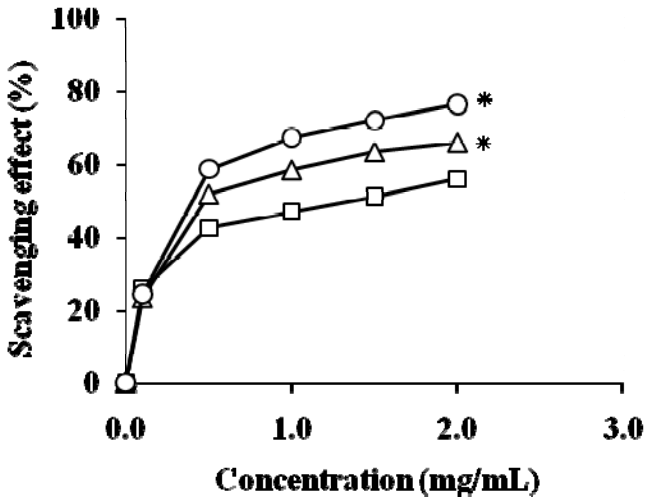


รูปที่ 1 FTIR spectrum ของสารละลายไคโตซานเกลือต่างๆ: (a) CS-HOBt, (b) CS-TPP และ (c) CS-EDTA

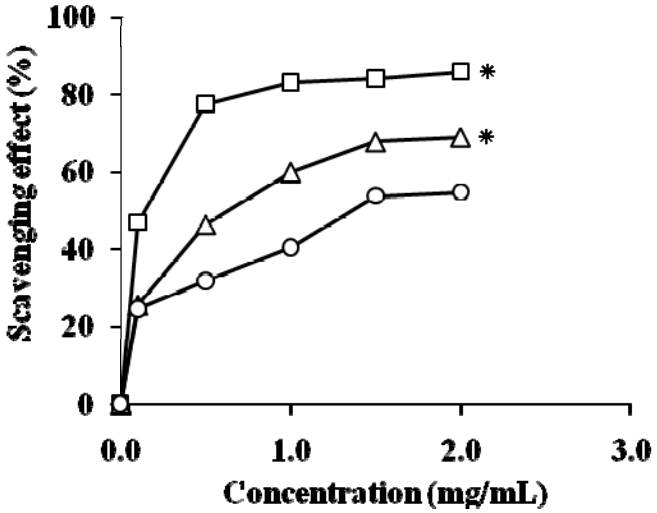


รูปที่ 2 ^{1}H-NMR spectrum ของสารละลายไคโตซานเกลือต่างๆ: (a) CS-HOBt, (b) CS-TPP และ (c) CS-EDTA

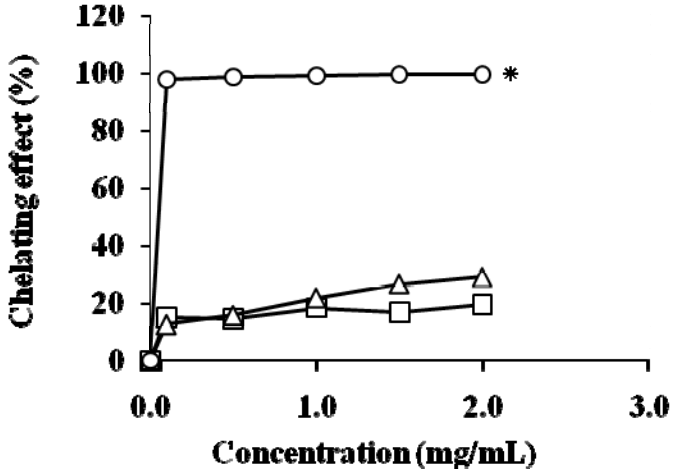
นอกจากนี้นำสารละลายไคโตซานเกลือต่างๆ นี้นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แสดงในรูปที่ 3-6 และฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรียแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 7-8 ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารละลายไคโตซานเกลือต่างๆ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันขึ้นกับวิธีการทดสอบ ส่วนฤทธิ์การฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกันขึ้นกับเกลือที่ใช้เตรียมโดยเรียงลำดับดังนี้ CS-EDTA > CS-HOBt > CS-TPP



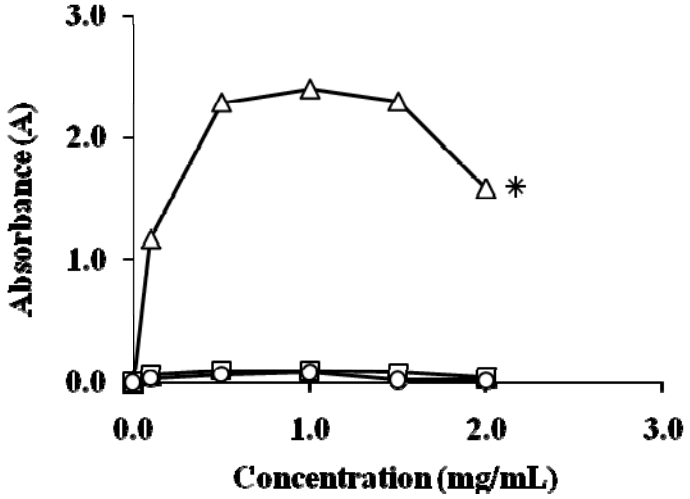
รูปที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Scavenging activity (n = 3) ของไคโตซานเกลือต่างๆ ต่ออนุมูล Superoxide: CS-HOBt (□), CS-TPP (△) and CS-EDTA (○) *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



รูปที่ 4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Scavenging activity (n = 3) ของไคโตซานเกลือต่างๆ ต่ออนุมูล hydroxyl: CS-HOBt (□), CS-TPP (△) and CS-EDTA (○) *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



รูปที่ 5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Metal ion chelating activity (n = 3) ของไคโตซานเกลือต่างๆ: CS-HOBt (□), CS-TPP (△) and CS-EDTA (○) *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

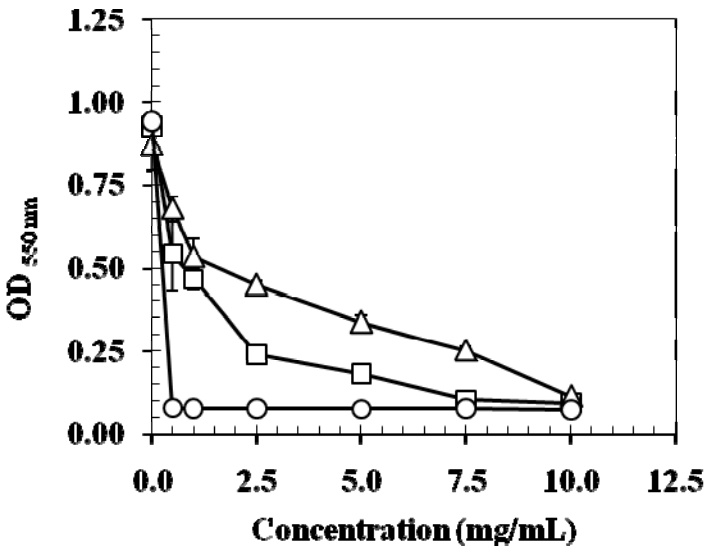


รูปที่ 6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Reducing power (n = 3) ของไคโตซานเกลือต่างๆ: CS-HOBt (□), CS-TPP (△) and CS-EDTA (○) *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

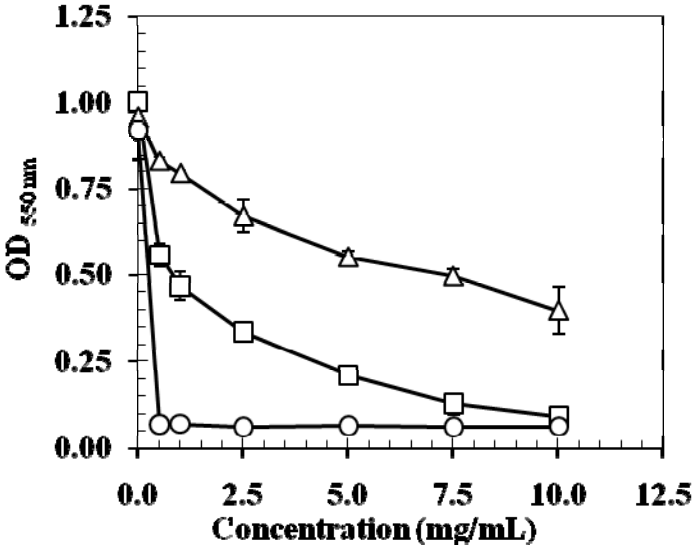
ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารละลายไคโตซานเกลือชนิดต่างๆ แสดงเป็นค่า MIC (Minimum inhibition concentration) และ ค่า MBC (Minimum bactericidal concentrations) ต่อ *S.aureus* และ *E.coli*

Bacteria	Minimum inhibition and bactericidal concentrations (mg mL^{-1})[a] of CS solution		
	CS-HOBt	CS-TPP	CS-EDTA
S.aureus	7.5	>10.0	0.5
E.coli	7.5	>10.0	0.5

[a]MIC and MBC of CS solution had the same values



รูปที่ 7 Bacteria growth inhibition (n = 3) ของไคโตซานเกลือต่างๆ: CS-HOBt (□), CS-TPP (△) and CS-EDTA (○) ต่อเชื้อ *S.aureus*



รูปที่ 8 Bacteria growth inhibition (n = 3) ของไคโตซานเกลือต่างๆ: CS-HOBt (□), CS-TPP (△) and CS-EDTA (○) ต่อเชื้อ *E.coli*

2. การเตรียมแผ่นเส้นใยนาโนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิ่ง

การศึกษาขั้นต้น (Preliminary study) พบว่าไม่สามารถเตรียมเส้นใยได้จากสารละลาย CS-HOBt, CS-TPP และ CS-EDTA โดยแทนที่จะเกิดเป็นเส้นใย สารละลายพุ่งออกมาเป็นหยดตกลงบนส่วนรองรับเส้นใยและไม่เกิดการยืดตัวภายใต้ไฟฟ้าความต่างศักย์สูง Zong และคณะ ค.ศ. 2002 รายงานว่า การเติมเกลือในปริมาณเล็กน้อยจะทำให้ความหนาแน่นของประจุในสารละลายเพิ่มขึ้น ในการทดลองพบว่า การเติมเกลือทำให้สัณฐานวิทยาของเส้นใยอิเล็กโตรสปันเปลี่ยนไป โดยเกิดบีดน้อยลงทำให้เกิดเป็นเส้นที่มีความสม่ำเสมอมากขึ้น นอกจากนี้ การเติมเกลือจะทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยลดลงด้วย[37] Son และคณะ ค.ศ. 2005 รายงานว่า การเติมอิเล็กโตรไลท์ไม่ว่าจะเป็นประจุบวกหรือประจุลบ จะเพิ่มค่าความนำไฟฟ้าของสารละลายพอลิเมอร์ ส่งผลให้เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยมีขนาดเล็กลง[38] Jia และคณะ ค.ศ. 2007 เตรียมเส้นใยนาโนจาก พอลิไวนิล แอลกอฮอลล์ (PVA)/ไคโตซาน โดยใช้ อะซิติก แอซิด เป็นตัวทำละลาย พบว่าเมื่อปริมาณของไคโตซานเพิ่มมากกว่า 30% จะเกิดเป็นเส้นใยนาโนได้ยาก ไคโตซานเป็นพอลิแซกคาไรด์ประจุบวก โดยหมู่อะมิโนที่ตำแหน่ง C2 จะแสดงประจุบวกบวกภายใต้สภาวะที่เป็นกรดหรือเป็นกลาง ดังนั้นสัณฐานวิทยาและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยเป็นปัจจัยที่สำคัญในการกำหนดอัตราส่วนระหว่าง ไคโตซานและ PVA[39] PVA เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ละลายในน้ำ ไม่มีพิษ เข้ากับร่างกายและย่อยสลายได้ในร่างกาย และสามารถเพิ่มการเกิดเป็นเส้นใยในกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่งได้ ดังนั้น PVA จึงเป็นพอลิเมอร์ที่เหมาะสมจะนำมาผสมกับไคโตซาน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกสารละลาย PVA ในน้ำนำมาผสมกับสารละลายไคโตซานเกลือที่ละลายในน้ำในอัตราส่วนต่างๆ โดยไม่ใช้ตัวทำละลายที่เป็นกรดหรือตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษ ค่าพารามิเตอร์ของสารละลาย CS-HOBt/PVA, CS-TPP/PVA และ CS-EDTA/PVA แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าพารามิเตอร์ของสารสะลายไคโตซานชนิดต่างๆ ที่ผสมกับสารละลายพอลิไวนิลแอลกอฮอลล์ ในอัตราส่วนต่างๆ กัน และความสามารถในการเกิดเส้นใยด้วยเทคนิคอิเล็กโตรสปินนิ่ง

Samples	Weight Ratio	Viscosity (mPa s)	Conductivity ($\mu S\ cm^{-1}$)	Surface tension ($mN\ m^{-1}$)	pH	Electrospun ability
CS-HOBt /PVA	0/100	633.07 ± 2.32	1009.7 ± 1.53	42.74 ± 0.54	5.50 ± 0.00	✓
	10/90	531.57 ± 2.08	1036.7 ± 0.58	43.77 ± 1.04	4.90 ± 0.00	✓
	20/80	550.23 ± 3.92	1078.0 ± 2.65	43.63 ± 0.44	4.67 ± 0.06	✓
	30/70	529.97 ± 1.99	1185.0 ± 3.61	44.57 ± 0.23	4.60 ± 0.00	✓
	40/60	510.57 ± 2.96	1268.3 ± 2.52	45.45 ± 0.26	4.47 ± 0.06	✓
	50/50	487.20 ± 1.30	1500.3 ± 1.53	46.48 ± 0.41	4.43 ± 0.06	✓
	60/40	412.90 ± 2.62	1713.3 ± 3.51	48.33 ± 0.20	4.40 ± 0.00	✗
	70/30	385.77 ± 1.50	1895.0 ± 5.00	50.37 ± 0.98	4.40 ± 0.00	✗
	80/20	340.50 ± 1.61	2116.7 ± 15.3	51.64 ± 0.42	4.43 ± 0.06	✗
	90/10	297.37 ± 0.97	2423.3 ± 5.77	51.98 ± 0.08	4.47 ± 0.06	✗
	100/0	220.40 ± 0.70	2740.0 ± 30.0	57.07 ± 0.60	4.43 ± 0.06	✗
CS-TPP /PVA	0/100	625.01 ± 2.30	995.67 ± 6.66	42.74 ± 0.54	5.50 ± 0.00	✓
	10/90	568.04 ± 0.38	1160.7 ± 9.71	46.62 ± 0.37	5.10 ± 0.00	✓
	20/80	459.54 ± 2.48	1268.7 ± 6.51	48.62 ± 0.24	5.10 ± 0.10	✓
	30/70	346.98 ± 5.29	1573.7 ± 9.02	49.95 ± 0.58	4.90 ± 0.10	✓
	40/60	260.45 ± 0.38	1771.3 ± 2.08	51.55 ± 0.22	4.90 ± 0.00	✓
	50/50	123.54 ± 0.12	2110.0 ± 10.0	52.61 ± 0.23	4.90 ± 0.10	✓
	60/40	70.20 ± 0.38	2370.0 ± 10.0	54.64 ± 0.38	4.90 ± 0.10	✗
	70/30	52.95 ± 0.63	2683.3 ± 5.77	56.51 ± 0.23	4.90 ± 0.00	✗
	80/20	37.61 ± 0.58	3173.3 ± 15.3	57.02 ± 0.42	4.90 ± 0.10	✗
	90/10	36.40 ± 0.38	3740.0 ± 17.3	59.44 ± 0.36	4.90 ± 0.10	✗
	100/0	47.52 ± 0.38	4046.7 ± 20.8	69.90 ± 0.49	4.90 ± 0.00	✗
CS-EDTA /PVA	0/100	628.71 ± 1.51	1009.7 ± 1.53	42.74 ± 0.54	5.50 ± 0.00	✓
	10/90	511.43 ± 3.46	1011.7 ± 2.52	46.46 ± 0.36	5.30 ± 0.10	✓
	20/80	387.17 ± 1.31	1014.3 ± 3.06	48.47 ± 0.31	5.10 ± 0.00	✓
	30/70	254.74 ± 0.76	1022.3 ± 3.79	50.00 ± 0.38	5.10 ± 0.00	✓
	40/60	223.67 ± 1.31	1032.0 ± 3.61	51.42 ± 0.83	5.10 ± 0.00	✓
	50/50	181.27 ± 0.68	1036.7 ± 1.53	52.07 ± 1.77	5.10 ± 0.10	✓
	60/40	153.91 ± 0.75	1043.3 ± 4.16	54.53 ± 0.93	5.10 ± 0.10	✗
	70/30	153.67 ± 1.15	1047.3 ± 2.52	55.97 ± 0.36	5.10 ± 0.10	✗
	80/20	137.78 ± 0.76	1059.0 ± 5.29	56.09 ± 0.80	5.00 ± 0.10	✗
	90/10	117.72 ± 0.76	1054.0 ± 5.29	60.71 ± 0.13	5.00 ± 0.10	✗
	100/0	146.06 ± 0.76	1062.7 ± 6.51	69.58 ± 1.74	5.10 ± 0.00	✗

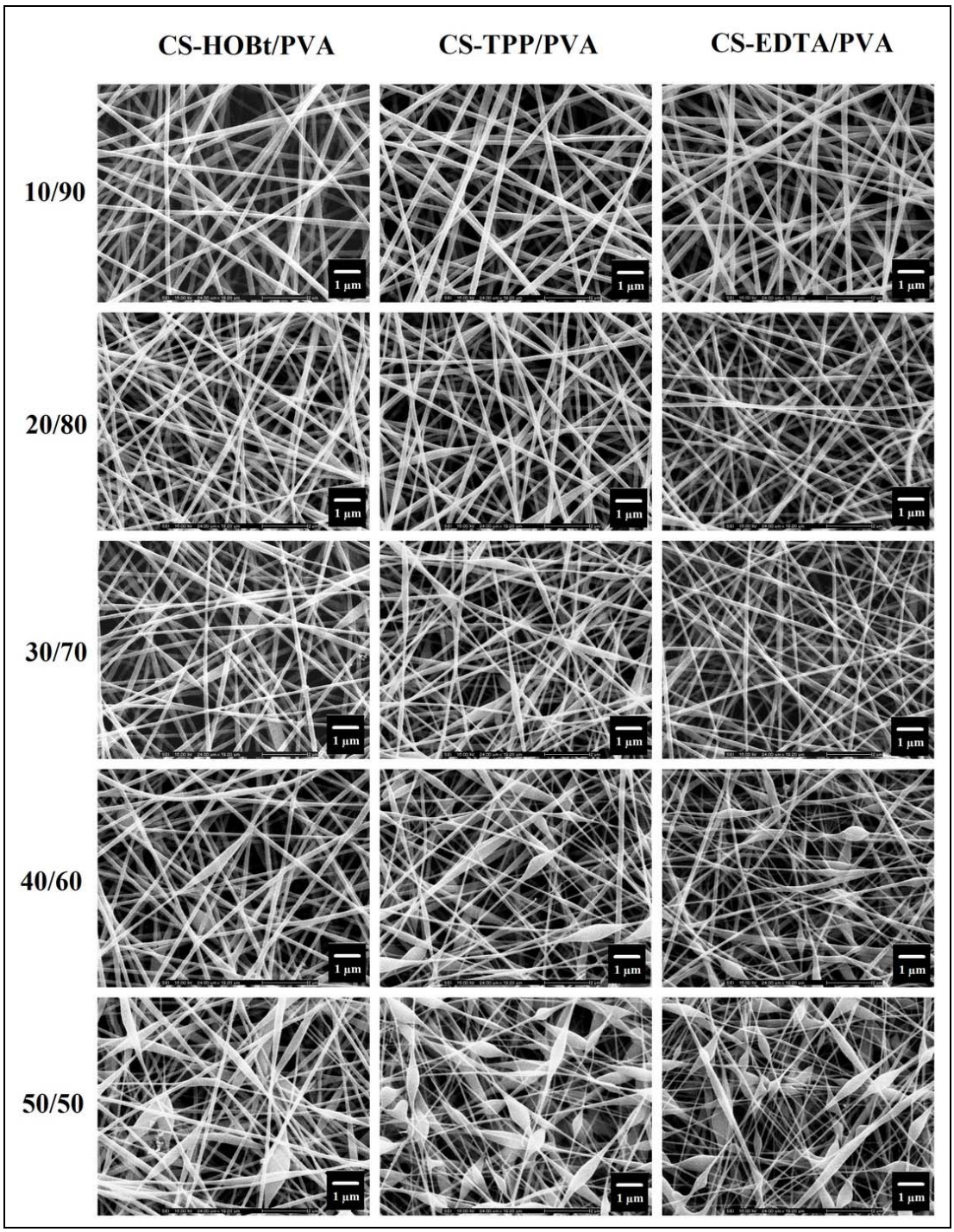
3. การตรวจสอบคุณลักษณะแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน

3.1 การตรวจสอบคุณลักษณะเชิงพื้นผิว (Geometrical characterizations)

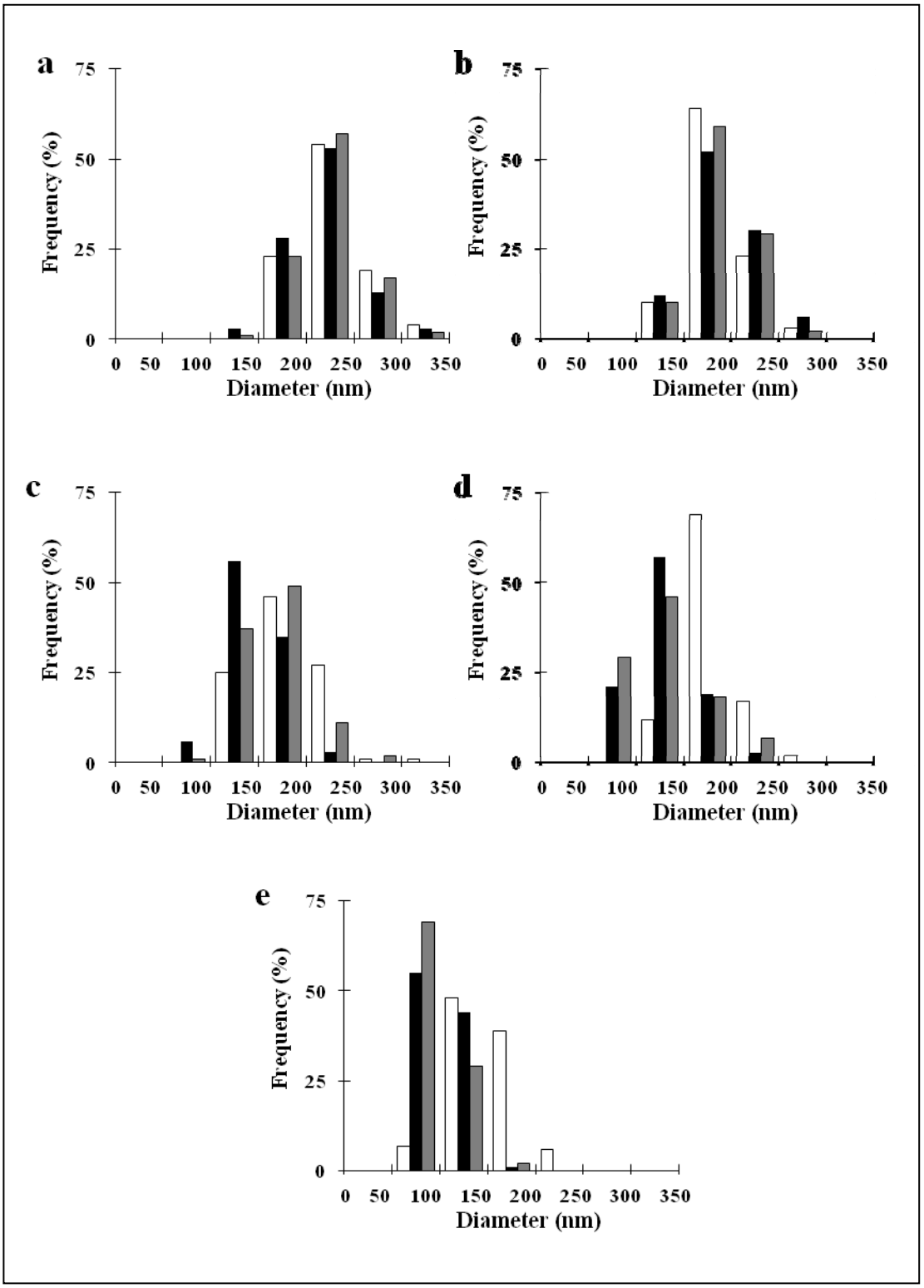
ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของ CS-HOBt/PVA, CS-TPP/PVA และ CS-EDTA/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ แสดงในรูปที่ 9 ภาพถ่ายแสดงให้เห็นว่า เมื่ออัตราส่วนของ CS/PVA เพิ่มถึง 30/70 ไม่พบบีดในเส้นใย อย่างไรก็ตามเมื่ออัตราส่วนเพิ่มถึง 40/60 จะเริ่มพบบีดในเส้นใย และอัตราส่วนสูงสุดที่สามารถเกิดเป็นเส้นใยได้คือ 50/50 และเมื่ออัตราส่วนมากกว่า 50/50 เส้นใยไม่สามารถเกิดได้เนื่องจากพารามิเตอร์ของสารละลายเริ่มไม่เหมาะสม ตารางที่ 2 แสดงค่าพารามิเตอร์ของสารละลายและความสามารถในการเกิดอิเล็กโตรสปินนิ่งของ CS-HOBt/PVA, CS-TPP/PVA และ CS-EDTA/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ เมื่อปริมาณของเกลือไคโตซานเพิ่มขึ้นจาก 10/90 ถึง 50/50 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยของ CS-HOBt/PVA, CS-TPP/PVA และ CS-EDTA/PVA ลดลงจาก 228 ± 37 ถึง 146 ± 33 nm, 216 ± 34 ถึง 100 ± 19 nm และ 221 ± 34 ถึง 94 ± 20 nm ตามลำดับ (แสดงดังตารางที่ 3) ส่วนรูปที่ 10 แสดงแผนภูมิการกระจายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ CS/PVA เตรียมจากเกลือต่างๆ

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นเส้นใยไคโตซาน/PVAเกลือและอัตราส่วนต่างๆ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=100)

Weight ratios	Average diameter of nanofibers (nm)		
	CS-HOBt/PVA	CS-TPP/PVA	CS-EDTA/PVA
10/90	228.06 ± 37.20	216.42 ± 34.45	220.94 ± 34.19
20/80	186.72 ± 32.93	188.66 ± 33.69	184.63 ± 29.13
30/70	179.34 ± 39.36	141.51 ± 29.39	160.93 ± 32.93
40/60	176.46 ± 28.86	126.77 ± 32.46	125.87 ± 37.96
50/50	146.34 ± 33.23	99.91 ± 18.67	94.09 ± 20.27



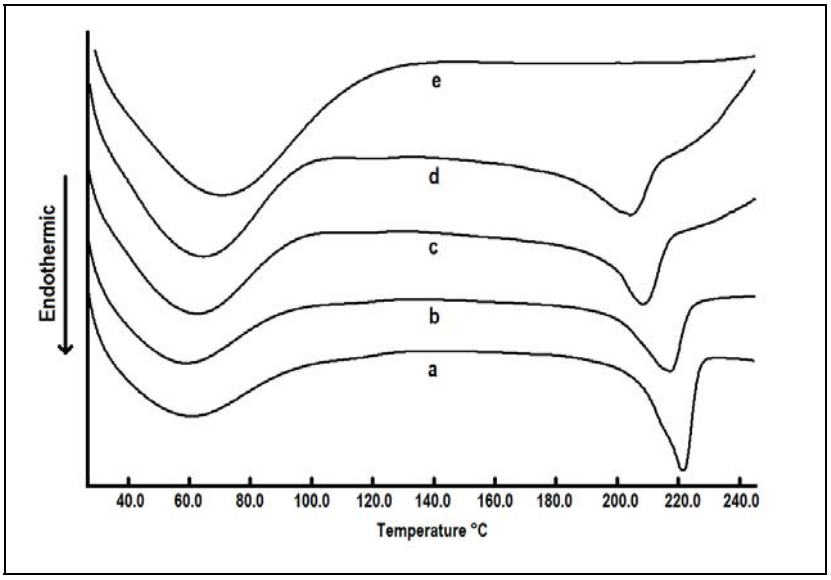
รูปที่ 9 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (5000x) ของไคโตซานเกลือต่าง ๆ/PVA ที่อัตราส่วนต่าง ๆ



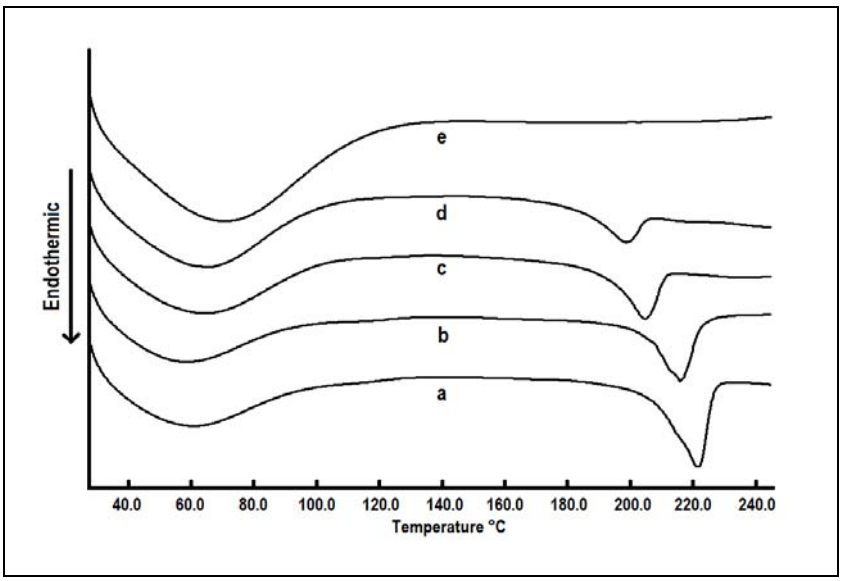
รูปที่ 10 แผนภูมิการกระจายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ CS/PVA เตรียมจากเกลือต่างๆ คือ CS-HOBt/PVA (□), CS-TPP/PVA (■) and CS-EDTA/PVA (■) ในอัตราส่วน 10/90 (a), 20/80 (b), 30/70 (c), 40/60 (d) และ 50/50 (e)

เมื่อปริมาณไคโตซานมาเกินกว่า 60 wt% สารละลายจะไม่สามารถเกิดเป็นเส้นใยผ่านกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่งได้ ผลการทดลองสอดคล้องกับ Jia และคณะ 2007[39] และ Shalumon และคณะ 2009[40] นั่นแสดงให้เห็นว่า repulsive forces ระหว่างหมู่ไอออนนิกในโครงสร้างของไคโตซานขัดขวางการเกิดเป็นเส้นใยที่ต่อเนื่องในกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่ง[41]

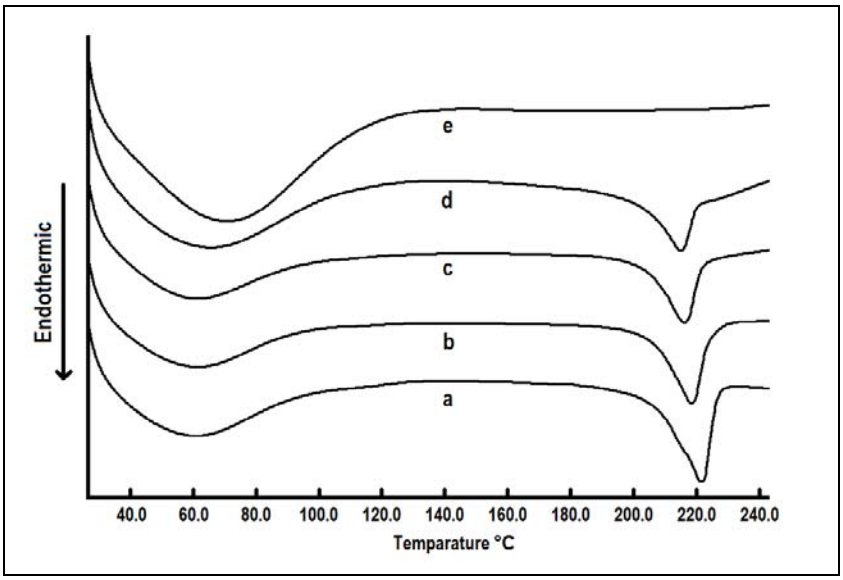
ความเป็นผลึกของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน/PVA ตรวจสอบโดย DSC รูปที่ 11, 12 และ 13 แสดง DSC thermograms ของแผ่นเส้นใยนาโนในอัตราส่วนต่างๆ ของ CS-HOBt/PVA CS-TPP/PVA และ CS-EDTA/PVA ตามลำดับ แต่ละรูปแสดง endothermic curves ของ 0/100 ถึง 50/50 ของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน/PVA และ ผงไคโตซาน endothermic curves ของแผ่นเส้นใยนาโนทั้งหมดมีลักษณะกว้างและทึบ แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของผลึกเกิดขึ้นได้ไม่ดีในแผ่นเส้นใย ตารางที่ 4 แสดงคุณสมบัติทางความร้อนจากข้อมูล DSC ของแผ่นเส้นใยนาโน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อปริมาณของ CS-HOBt CS-TPP และ CS-EDTA เพิ่มขึ้น T_m เปลี่ยนแปลงไปในทางที่ลดลงจาก 221.4 ถึง 204.8, 221.2 ถึง 198.7 and 221.6 ถึง 215.0 $^{\circ}C$ ตามลำดับ และ ΔH_m ก็ลดลง จาก 25.6 ถึง 17.8, 25.4 ถึง 11.4 and 24.3 ถึง 16.8 J/g ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณของไคโตซานในส่วนผสมส่งผลให้สภาวะการเกิดเป็นผลึกของเส้นใยนาโนแย่ลง[39]



รูปที่ 11 DSC thermograms ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-HOBt/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ (a) 0/100, (b) 10/90, (c) 30/70, (d) 50/50 และ (e) ผงไคโตซาน



รูปที่ 12 DSC thermograms ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-TPP/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ (a) 0/100, (b) 10/90, (c) 30/70, (d) 50/50 และ (e) ผงไคโตซาน



รูปที่ 13 DSC thermograms ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ (a) 0/100, (b) 10/90, (c) 30/70, (d) 50/50 และ (e) ผงไคโตซาน

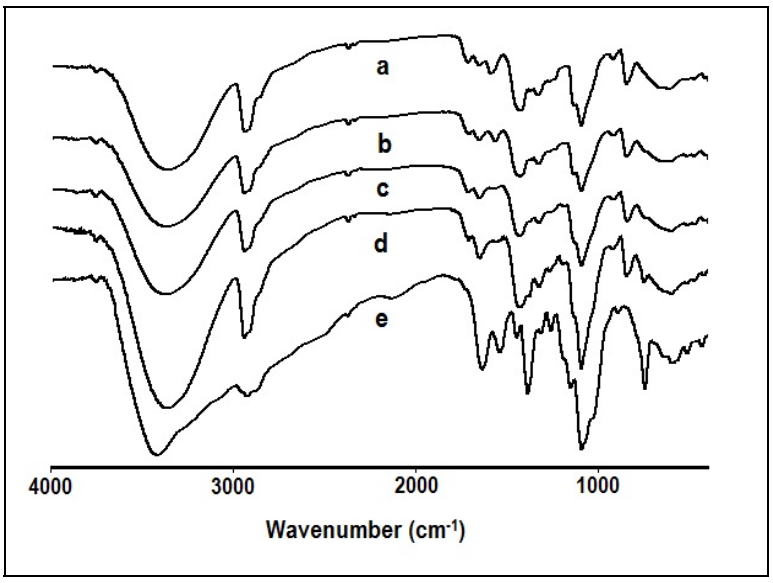
ตารางที่ 4 ข้อมูลที่ได้จาก DSC thermograms ของแผ่นเส้นใยนาโน ไคโตซาน/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ ของ CS-HOBt/PVA, CS-TPP/PVA and CS-EDTA/PVA

Samples	Weight ratios	T_m ($^{\circ}C$)	ΔH_m (J/g)
CS-HOBt/PVA	0/100	221.4	25.6
	10/90	217.0	22.7
	30/70	208.1	21.9
	50/50	204.8	17.8
CS-TPP/PVA	0/100	221.2	25.4
	10/90	216.1	21.1
	30/70	204.6	13.5
	50/50	198.7	11.4
CS-EDTA/PVA	0/100	221.6	24.3
	10/90	218.2	21.5
	30/70	216.0	19.0
	50/50	215.0	16.8

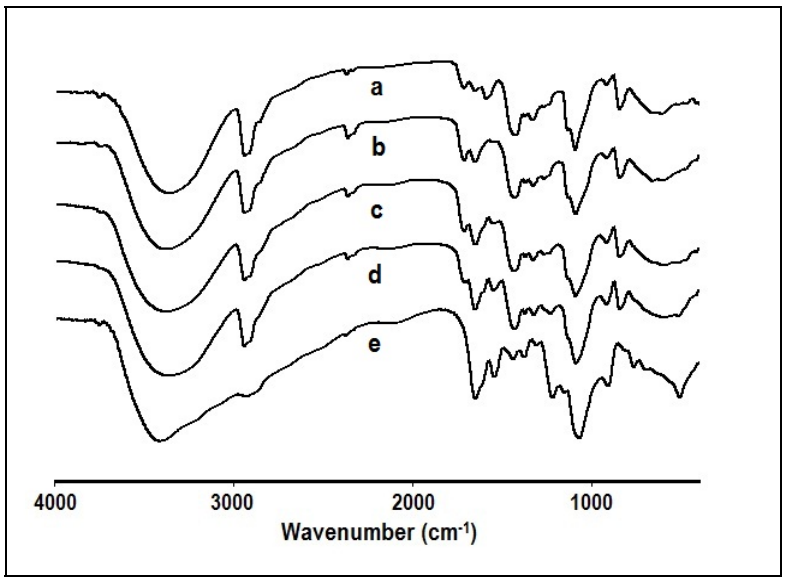
3.2 การตรวจสอบคุณลักษณะเชิงเคมี (Chemical characterizations)

โครงสร้างทางเคมีของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานตรวจสอบโดยใช้ FTIR รูปที่ 14 แสดง FTIR สเปกตรัมของ CS-HOBt/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ แผ่นเส้นใยนาโน PVA แสดงสเปกตรัมพีคที่ 3360, 2940, 1430 และ 1095 cm^{-1} ที่แสดงถึง ν(O–H), $\nu_s(CH_2)$, δ(CH–O–H) และ ν(C–O), ตามลำดับ[39] แผ่นเส้นใยนาโน CS-HOBt/PVA ในทุกๆ อัตราส่วน จะพบพีคสำคัญที่พบในพีคของแผ่นเส้นใยนาโน PVA อย่างเดียว และเมื่อปริมาณของ CS-HOBt เพิ่มขึ้นจะพบพีคที่ 1655 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีค ν(C=O) ของ primary amide[42] ที่สามารถพบได้ในสเปกตรัมของผง CS-HOBt และพีคที่ 1430 cm^{-1} ของแผ่นเส้นใยนาโน PVA จะค่อยๆ ลดลง จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล CS-HOBt และ PVA แสดงให้เห็นว่า CS-HOBt และ PVA สามารถกระจายตัวเข้ากันได้ระดับโมเลกุล ในแผ่นเส้นใยนาโน

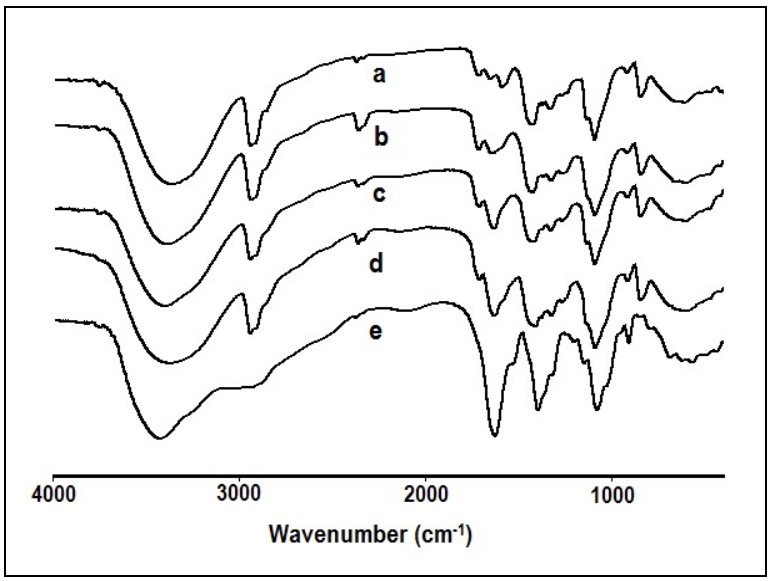
รูปที่ 15 และ 16 แสดง FTIR สเปกตรัมของ CS-TPP/PVA และ CS-EDTA/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ ผลพบว่าผง CS-TPP and CS-EDTA พบพีคที่ 1655 cm^{-1} และพบในแผ่นเส้นใยนาโน CS-TPP/PVA และ CS-EDTA/PVA ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า CS-TPP and CS-EDTA ผสมเข้ากับ PVA ในระดับโมเลกุลในแผ่นเส้นใยนาโน



รูปที่ 14 FTIR สเปกตรัมของแผ่นเส้นใยนาโน CS-HOBt/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ (a) 0/100, (b) 10/90, (c) 30/70, (d) 50/50และ (e) ผง CS-HOBt



รูปที่ 15 FTIR สเปกตรัมของแผ่นเส้นใยนาโน CS-TPP/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ (a) 0/100, (b) 10/90, (c) 30/70, (d) 50/50และ (e) ผง CS-TPP



รูปที่ 16 FTIR สเปกตรัมของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ (a) 0/100, (b) 10/90, (c) 30/70, (d) 50/50และ (e) ผง CS-EDTA

3.3 การตรวจสอบคุณลักษณะเชิงกล (Mechanical characterizations)

ศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานโดยใช้ texture analyzer วัดค่า tensile strength strain และ Young's modulus เมื่อวัสดุปกปิดแผลสัมผัสกับแผลจำเป็นต้องมีคุณสมบัติเชิงกลที่เพียงพอ เพื่อที่จะยังคงมีคุณสมบัติที่เพียงพอสำหรับกระบวนการสมานแผล อัตราส่วนสูงสุดที่สามารถเตรียมเป็นเส้นใยนาโนได้คือ 50/50 อย่างไรก็ตามการที่จะวัดค่าต่างๆ เชิงกล แผ่นเส้นใยจะต้องลอกออกจากอลูมิเนียมฟอยได้ โดยแผ่นเส้นใยนาโนที่อัตราส่วน 10/90 ถึง 30/70 จะสามารถลอกออกได้ แต่แผ่นเส้นใยนาโนที่มีปริมาณเกลือไคโตซานเพิ่มถึง 40/60 จะไม่สามารถลอกออกได้ เนื่องจากโครงสร้างของแผ่นเส้นใยที่เป็นบีดและมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ลดลงทำให้แผ่นเส้นใยมีความเปราะบางจนไม่สามารถลอกออกได้ ตารางที่ 5 แสดงคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ ค่า tensile strength ของแผ่นเส้นใยนาโนที่อัตราส่วน 10/90 ถึง 30/70 อยู่ในช่วง 5.11 ถึง 8.90 MPa ซึ่ง tensile strength ของแผ่นเส้นใยนาโน PVA เท่ากับ 12.8 MPa ค่า strain (%) ของแผ่นเส้นใยนาโนที่อัตราส่วน 10/90 ถึง 30/70 อยู่ในช่วง 5.59 ถึง 36.76 % ซึ่ง strain (%) ของแผ่นเส้นใยนาโน PVA เท่ากับ 27.51 % ค่า Young's Modulus ของแผ่นเส้นใยนาโนที่อัตราส่วน 10/90 ถึง 30/70 อยู่ในช่วง 44.00 ถึง 149.71 MPa ซึ่ง Young's Modulus ของแผ่นเส้นใยนาโน PVA เท่ากับ 257 MPa จากการศึกษาพบว่าเมื่อปริมาณของไคโตซานเพิ่มขึ้น คุณสมบัติเชิงกลของเส้นใยนาโนจะลดลง มีความแข็งแรงลดลง มีความเปราะบางมากขึ้นและสูญเสียความยืดหยุ่น เนื่องจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ลดลงและเกิดบีดขึ้นในโครงสร้างของเส้นใย จากการศึกษานี้พบว่าค่า tensile strength ของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานที่เตรียมได้มีความใกล้เคียงกับค่า tensile strength ของแผ่นปกปิด

แผลที่วางขายตามท้องตลาดซึ่งมีค่าอยู่ที่ 10 MPa [43]

ตารางที่ 5 คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน/PVA ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

Samples	Weight ratios	Tensile strength (MPa)	Strain (%)	Young Modulus (MPa)
PVA	-	12.81 ± 1.67	27.51 ± 2.94	257.97 ± 60.71
CS-HOBt/PVA	10/90	8.90 ± 0.30	16.63 ± 0.56	120.60 ± 15.89
	20/80	8.61 ± 1.78	19.96 ± 12.6	149.17 ± 33.75
	30/70	6.56 ± 1.29	5.59 ± 1.01	147.53 ± 34.47
	40/60	1.59 ± 0.44	0.78 ± 0.30	54.20 ± 42.72
	50/50	N/A	N/A	N/A
CS-TPP/PVA	10/90	7.54 ± 0.33	35.77 ± 16.40	49.23 ± 17.09
	20/80	7.31 ± 1.35	23.90 ± 5.30	44.33 ± 0.21
	30/70	5.46 ± 0.23	6.62 ± 1.38	76.97 ± 24.61
	40/60	N/A	N/A	N/A
	50/50	N/A	N/A	N/A
CS-EDTA/PVA	10/90	7.98 ± 1.79	36.76 ± 8.72	44.00 ± 6.61
	20/80	5.57 ± 0.46	10.35 ± 2.36	51.33 ± 3.90
	30/70	5.11 ± 0.33	7.06 ± 3.06	60.80 ± 16.02
	40/60	N/A	N/A	N/A
	50/50	N/A	N/A	N/A

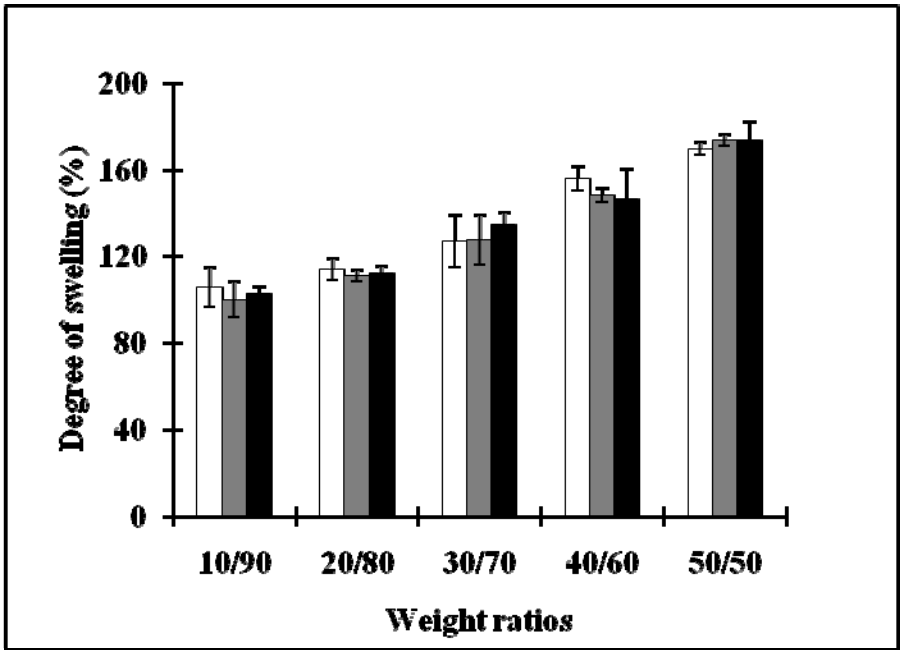
N/A = the nanofiber patches cannot peel out off the aluminum foil.

4. การประเมินคุณสมบัติแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน

4.1 การประเมินคุณสมบัติการพองตัว (Degree of swelling)

คุณสมบัติการพองตัวของไคโตซานเป็นคุณสมบัติที่สำคัญและโดดเด่น จึงนำมาใช้เป็นวัสดุปกปิดแผล การพองตัวที่ดีแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการดูดซับของเหลวมที่เกิดจากบาดแผล รูปที่ 17 แสดง degree of swelling ของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานในอัตราส่วนต่างๆ หลังจากแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานทั้งหมดมีค่าการพองตัวมากกว่า 100% และค่าการพองตัวค่อยๆ เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของไคโตซานเพิ่มขึ้น ขณะที่แผ่นเส้นใยนาโน PVA มีค่าการพองตัวอยู่ที่ 95.6% ค่าการพองตัวของ 10/90 ไคโตซาน/PVA ของทุกเกลืออยู่ที่ประมาณ 100% และเพิ่มขึ้นถึง 170% เมื่อปริมาณของไคโตซานเพิ่มขึ้นถึง 50/50 ค่าการพองตัวของไคโตซานแต่ละเกลือไม่มีความแตกต่าง

กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทุกอัตราส่วน ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ (hydrophilic polymer) โดยน้ำสามารถผ่านเข้าไปในไคโตซานได้อย่างรวดเร็วก่อนที่จะเกิดการสลายตัวของไคโตซาน[44] จากผลการศึกษาพบว่าการพองตัวของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานขึ้นอยู่กับปริมาณของไคโตซาน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Meng และคณะ 2011 ที่ศึกษาการพองตัวของ แผ่นเส้นใยนาโน PLGA/ไคโตซาน พบว่าการพองตัวของแผ่นเส้นใยนาโน PLGA/ไคโตซาน มีค่าการพองตัวที่สูงกว่า แผ่นเส้นใยนาโน PLGA และมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อปริมาณของไคโตซานเพิ่มขึ้น[45]



รูปที่ 17 Degree of swelling (%) ของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน/PVA ในอัตราส่วนต่างๆ ของเกลือ (□) CS-HOBt/PVA, (■) CS-TPP/PVA และ (■) CS-EDTA/PVA ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

4.2 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

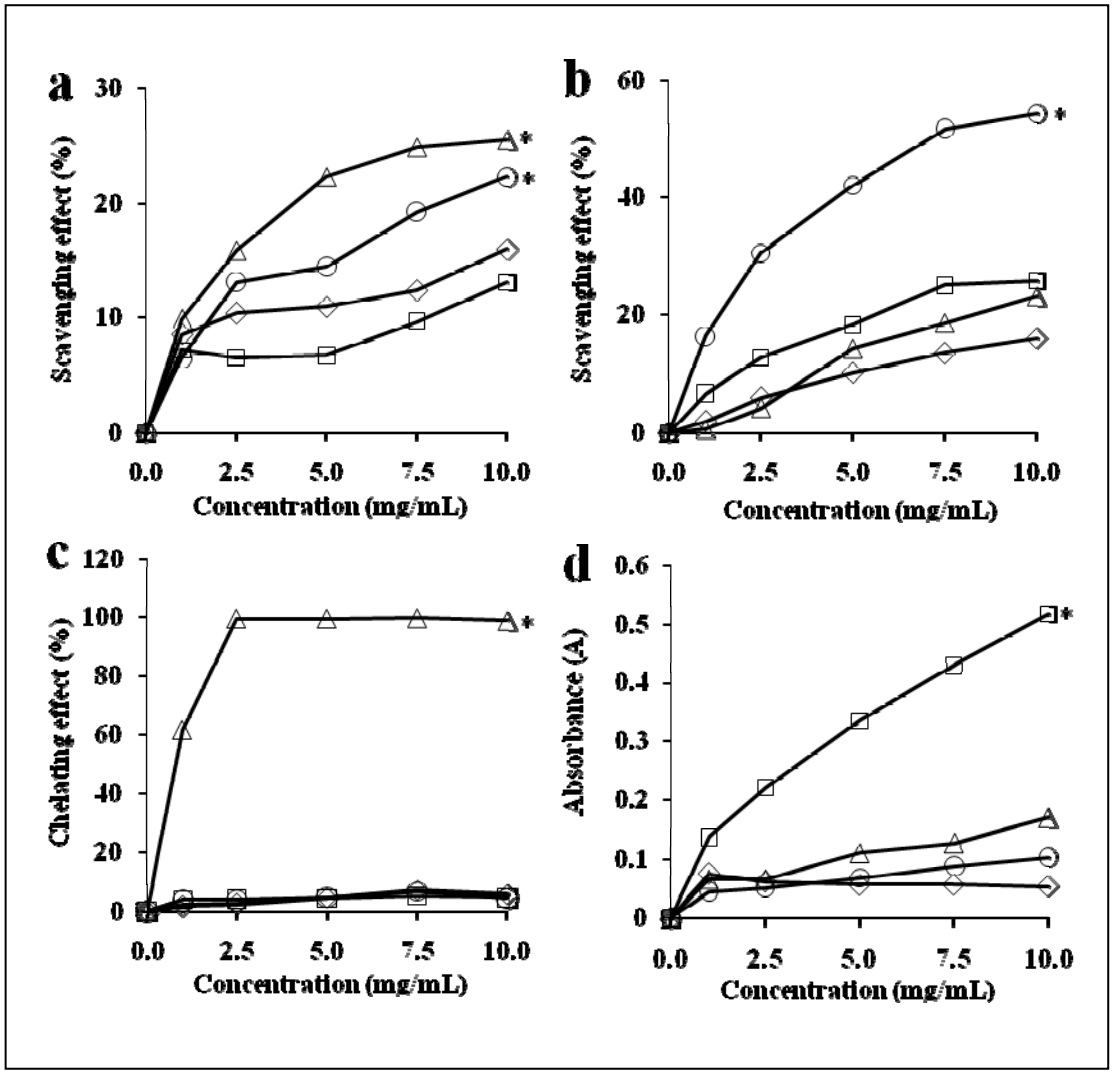
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแผ่นเสนใยนาโนไคโตซานศึกษาโดยใช้วิธีต่างๆได้แก่ superoxide radical scavenging assay hydroxyl radical scavenging assay metal ion chelating assay และ reducing power แผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน/PVA ที่อัตราส่วน 30/70 ถูกเลือกมาใช้สำหรับการศึกษา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์การสมานแผล เนื่องจากเส้นใยมีลักษณะที่ดีไม่พบบีดในเส้นใย รูปที่ 18 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน/PVA เปรียบเทียบกับแผ่นเส้นใยนาโน PVA การศึกษาด้วยวิธี superoxide radical scavenging assay (รูปที่ 18a) พบว่าแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูล superoxide ไม่ถึง 50% เมื่อความเข้มข้นของเส้นใยนาโนเพิ่มถึง 10 mg/mL โดยแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA มีฤทธิ์มากที่สุดที่ 25.48% อนุมูล superoxide ถูกสร้างได้โดย ปฏิกิริยาของเซลล์

ระบบเอนไซม์ต่างๆ เช่น lipoxygenases peroxidase NADPH oxidase และ xanthine oxidase โดยอนุมูล superoxide เป็นตัวสำคัญในการสร้างอนุมูลอิสระที่ทำลายเซลล์ ได้แก่ hydrogen peroxide hydroxyl radical หรือ singlet oxygen ในสิ่งมีชีวิต[46] จากผลการทดลองพบว่าแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน/PVA แสดงฤทธิ์ต้ายอนุมูล superoxide น้อยที่สุด อาจเนื่องมาจากปริมาณไคโตซานในแผ่นเส้นใยนาโนน้อยเมื่อผสมกับ PVA จึงไม่เพียงพอที่จะแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูล superoxide

การศึกษาด้วยวิธี hydroxyl radical scavenging assay (รูปที่ 18b) พบว่าแผ่นเส้นใยนาโน CS-HOBt/PVA มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.53 mg/mL แต่แผ่นเส้นใยนาไคโตซานเกลืออื่นๆ แสดงความสามารถในการจับน้อยกว่าและไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้ โดยมีค่าอยู่ที่ประมาณ 20% อนุมูล hydroxyl เป็นอนุมูลอิสระที่เกิดปฏิกิริยาได้ดี และสามารถเกิดจาก การจับกันของ superoxide anion และ hydrogen peroxide กับไอออนของโลหะ เช่น Cu^{2+} หรือ Fe^{2+} อย่างไรก็ตาม Cu^{2+} and Fe^{2+} ไม่ได้มีอยู่ในร่างกายอย่างอิสระแต่สามารถพบได้ใน albumin ATP citrate DNA และ membrane lipids[47] ในการศึกษานี้อนุมูล hydroxyl เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ Fe^{2+}-EDTA complex กับ H_2O_2 ใน ascorbic acid ใส่ deoxyribose ให้ความร้อนกับ 2-thiobarbituric acid ในสภาวะที่เป็นกรดจะเกิดสีชมพูขึ้น เมื่อเติมสารที่มีความสามารถในการจับอนุมูล hydroxyl ลงไปแย่งจับกับ deoxyribose จะทำให้สีชมพูที่เกิดขึ้นลดน้อยลง[48] ในการศึกษานี้แผ่นเส้นใยนาโน CS-HOBt/PVA แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูล hydroxyl มากที่สุด โดยกลไกในการจับอนุมูล CS-HOBt/PVA ของเกลือไคโตซานยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

การศึกษาด้วยวิธี metal ion chelating assay (รูปที่ 18c) พบว่าแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA เท่านั้นที่สามารถจับกับไอออนของโลหะได้ โดยมีค่า IC_{50} = 1.07 mg/mL แต่แผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานเกลืออื่นๆ ไม่แสดงฤทธิ์การจับกับไอออนของโลหะ Xingและคณะ 2005 ได้ศึกษาฤทธิ์การจับกับโลหะของ ไคโตซานซัลเฟต พบว่าแสดงฤทธิ์นี้น้อยและไม่สามารถแสดงได้เกิน 40% ที่ 1 g/mL[49] การศึกษานี้จึงบ่งชี้ว่า แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA มีคุณสมบัติจับกับไอออนโลหะได้สูงสุดเนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะตัวของ EDTA เอง

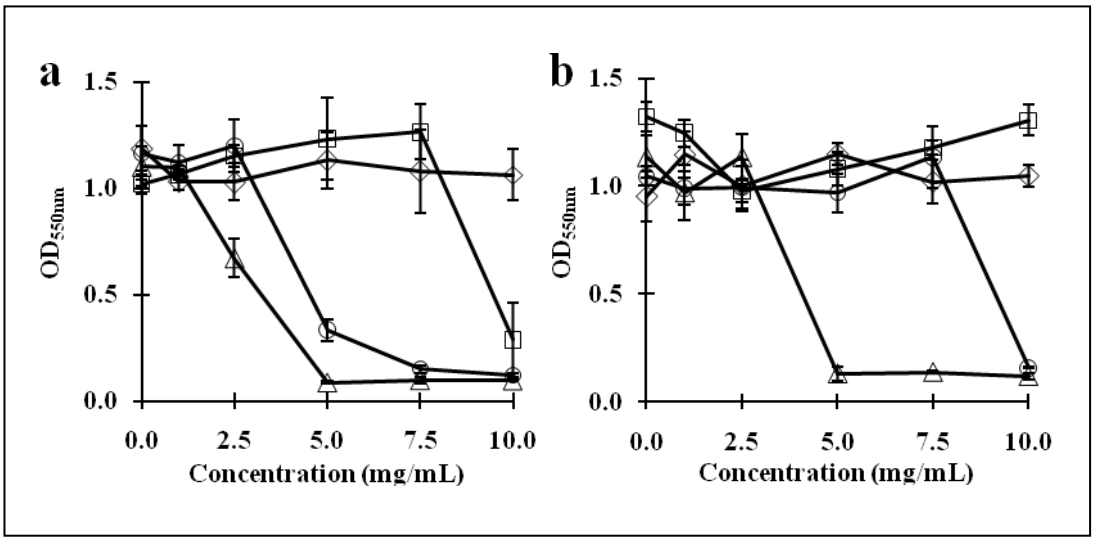
การศึกษาด้วยวิธี reducing power (รูปที่ 18d) พบว่าแผ่นเส้นใยนาโน CS-TPP/PVA มีค่า reducing power สูงสุดเมื่อเทียบกับผงไคโตซานธรรมดา Zhong และคณะ 2007 พบว่า reducing power ของไคโตซานมวลโมเลกุลต่ำ (MW = 4 kDa) อยู่ที่ประมาณ 0.06 ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL[50] การที่แผ่นเส้นใยนาโน CS-TPP/PVA มีค่า reducing power สูงอาจเนื่องมาจากโครงสร้างของ TPP มีฤทธิ์เป็น reducing agent



รูปที่ 18 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี (a) superoxide radical scavenging, (b) hydroxyl radical scavenging, (c) metal ion chelating and (d) reducing power ของแผ่นเส้นใยนาโน (○) 30/70 CS-HOBt/PVA, (□) 30/70 CS-TPP/PVA, (△) 30/70 CS-EDTA/PVA และ (◇) PVA *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

4.3 การประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity)

กลไกการต้านเชื้อแบคทีเรียของไคโตซานโดยทั่วไปจะเกี่ยวข้องกับ หมู่อะมิโนที่ตำแหน่ง C-2 ของ glucosamine ซึ่งจะแสดงประจุบวกเมื่ออยู่ในสารละลายกรด[51] เมื่อแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานอยู่ในสารละลาย TSB ที่มีเชื้อแขวนลอยอยู่ ไคโตซานจะละลายออกมาและแสดงประจุบวกในสารละลาย รูปที่ 19 แสดงการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* ของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานเปรียบเทียบกับแผ่นเส้นใยนาโน PVA อย่างเดียว หลังจากบ่มไว้ 24 ชั่วโมง แผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียนโดยขึ้นกับความเข้มข้น ผลการศึกษาพบว่าแผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-EDTA/PVA และ 30/70 CS-HOBt/PVA ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 5 และ 7.5 mg/mL ตามลำดับ และแผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-TPP/PVA เกือบจะยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL (รูปที่ 19a) ขณะที่แผ่นเส้นใยนาโน PVA ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ได้ที่ความเข้มข้น 1 ถึง 10 mg/mL แผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-EDTA/PVA และ 30/70 CS-HOBt/PVA สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 mg/mL ตามลำดับ แต่แผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-TPP/PVA และ PVA ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ (รูปที่ 19b)



รูปที่ 19 OD 550nm ของเชื้อ (a) *S. aureus* และ (b) *E. coli* ในสารละลายของแผ่นเส้นใยนาโน (○) 30/70 CS-HOBt/PVA (□) 30/70 CS-TPP/PVA (△) 30/70 CS-EDTA/PVA และ (◇) PVA หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

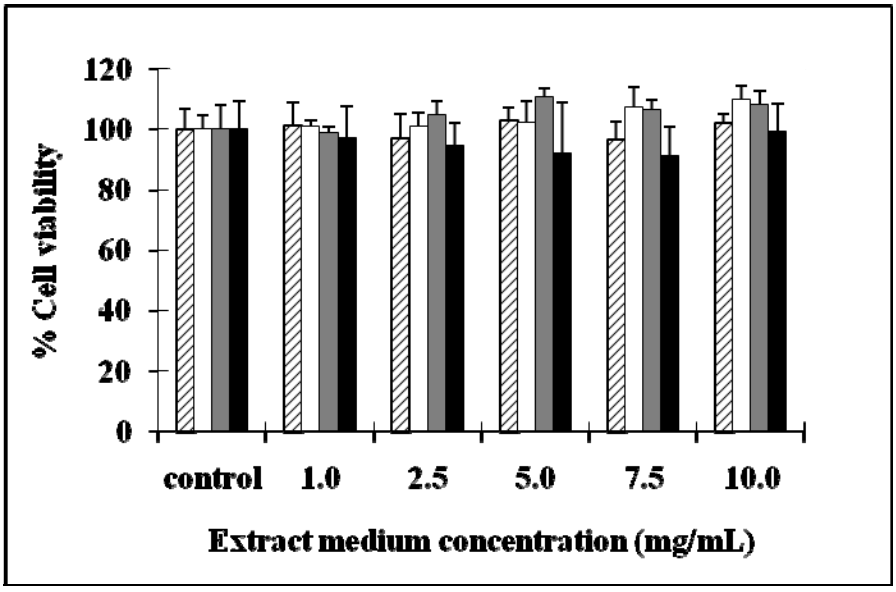
ค่า MIC และ MBC ของแผ่นเส้นใยนาโน 30/70 ไคโตซาน/PVA สรุปไว้ในตารางที่ 6 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเกลือไคโตซานที่ใช้ แผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-EDTA/PVA แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงสุดที่ความเข้มข้น 5 mg/mL เนื่องจากฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ดีของ EDTA บทความมากมายได้ตีพิมพ์เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของ EDTA ทั้งในแบบเดียวและรวมกับสารอื่น พบว่า EDTA มีฤทธิ์ต้านเชื้อกว้าง ครอบคลุมทั้งแบคทีเรีย แกรมบวกและแกรมลบ มีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของ EDTA รวมกับ chitosan ในกรดอะซิติก แอซิด พบว่า EDTA มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่อ่อนกว่าไคโตซานในกรดอะซิติก แอซิด และการรวมกันของ ไคโตซานในกรดอะซิติก แอซิด และ EDTA ทำให้เกิดการเสริมฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. aureus* [(52)] แผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน/PVA ทุกเกลือที่ความเข้มข้น 1 ถึง 10 mg/mL ในการศึกษานี้แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus*)มากกว่า แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) กลไกการต้านเชื้อแบคทีเรียแต่ละประเภทขึ้นอยู่กับธรรมชาติของเชื้อเป้าหมาย ความแตกต่างของแบคทีเรียแกรมบวกและลบต่อการตอบสนองต่อสารหรือยาต่างๆ อยู่ที่โครงสร้างของผนังเซลล์และและการจัดเรียงตัวของเยื่อหุ้มด้านนอก[(53)] มีทฤษฎีที่หลากหลายอธิบายกลไกการต้านเชื้อแบคทีเรียของไคโตซาน หนึ่งในนั้นคือประจุบวกบนโมเลกุลของไคโตซานจับกับประจุลบบนผิวเชื้อแบคทีเรีย ทำให้คุณสมบัติการเลือกผ่านของเชื้อเปลี่ยนแปลงไป[(54-55)] กลไกอื่นๆ เช่น ไคโตซานมวลโมเลกุลต่ำสามารถเข้าไปจับสารเป้าหมายในเซลล์ของเชื้อ ได้แก่ DNA และไปยับยั้งการสร้าง mRNA และโปรตีน [(56)] Xing และคณะ 2009 ศึกษากลไกการต้านเชื้อแบคทีเรียของ อนุภาคนาโน oleoyl-chitosan ต่อเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ผลการศึกษาพบว่าอนุภาคมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยการทำลายโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์และสามารถจับกับ and extracellular targets เช่น phosphate groups หรือ intracellular targets เช่น DNA และ RNA[(57-58)]

ตารางที่ 6 ค่า Minimum inhibition concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) ของแผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-HOBt/PVA 30/70 CS-TPP/PVA และ 30/70 CS-EDTA/PVA ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* เปรียบเทียบกับแผ่นเส้นใยนาโน PVA

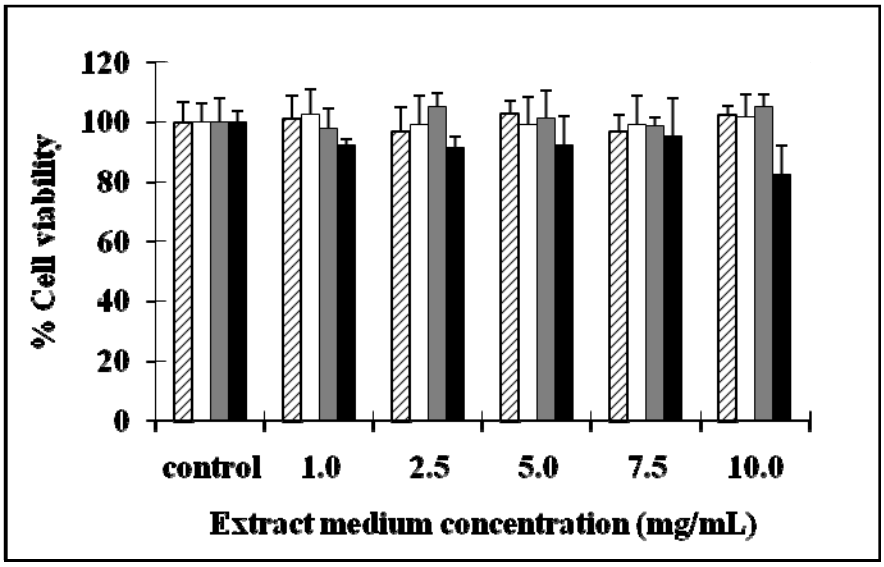
Nanofiber patches	MIC (mg/mL)		MIC (mg/mL)	
	S.aureus	*E.coli*	*S.aureus*	*E.coli*
PVA	＞ 10.0	＞ 10.0	＞ 10.0	＞ 10.0
30/70 CS-HOBt/PVA	7.5	10.0	7.5	10.0
30/70 CS-TPP/PVA	＞ 10.0	＞ 10.0	＞ 10.0	＞ 10.0
30/70 CS-EDTA/PVA	5.0	5.0	5.0	5.0

4.4 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

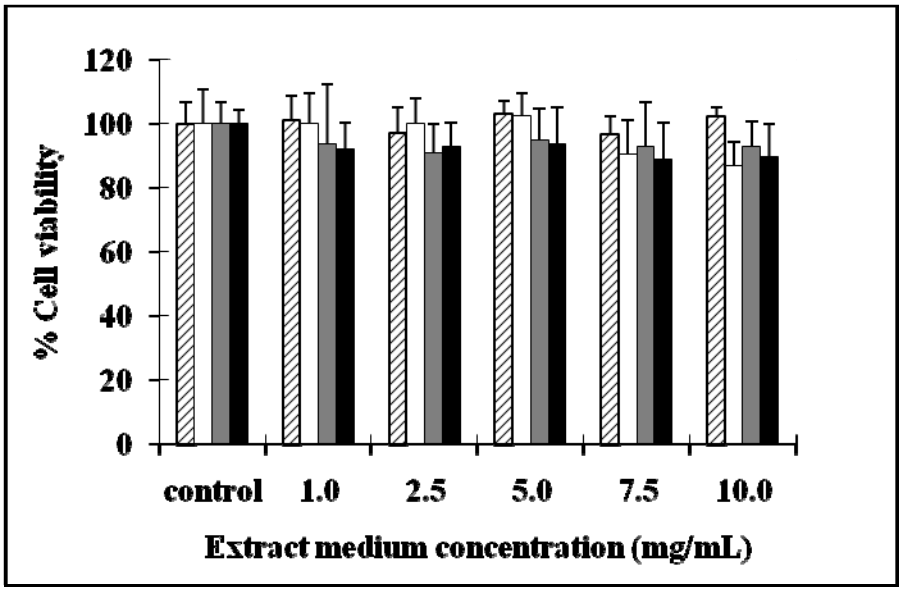
แผ่นเส้นใยอิเล็กโตรสปันสามารถเตรียมจากไคโตซานในสารละลายกรดและไคโตซานผสมกับพอลิเมอร์อื่นๆ อย่างไรก็ตามความเป็นพิษของแผ่นเหล่านี้ขึ้นกับสารละลายกรดและพอลิเมอร์ที่ผสม ในการศึกษานี้ประเมินความเป็นพิษของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานโดยใช้ normal human fibroblast cells (NHF cells) ความเป็นพิษทางอ้อมของสารสกัดจากแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน/PVA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอัตราส่วน 10/90 30/70 และ 50/50 เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นเส้นใยนาโน PVA แสดงดังรูป 20-22 ผลการศึกษาพบว่า %cell viability ของกลุ่มที่เป็นสารสกัดจากแผ่นเส้นใยนาโน CS-HOBt/PVA CS-TPP/PVA และ CS-EDTA/PVA ไม่ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกอัตราส่วนและความเข้มข้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยของ cell viability ลดลงเล็กน้อยเมื่อความเข้มข้นของแผ่นเส้นใยที่สกัดออกมามากขึ้นแต่การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ได้มีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าชนิดของเกลือและตัวทำละลายที่ใช้เตรียมเส้นใยนาโนไคโตซานไม่ได้ส่งผลต่อการอยู่รอดของ NHF cells จากข้อมูลต่างๆ เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าแผ่นเส้นใยนาโน CS-HOBt/PVA CS-TPP/PVA และ CS-EDTA/PVA ไม่เป็นพิษต่อ NHF cells และมีศักญภาพในการพัฒนาเป็นวัสดุปิดแผลต่อไป



รูปที่ 20 Cell viability ของเซลล์ NHF เมื่อสัมผัสกับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ของแผ่นเส้นใยนาโน (▨) PVA และ CS-HOBt/PVA ที่อัตราส่วนต่างๆ (□) 10/90 (■) 30/70 และ (■) 50/50 ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=5)



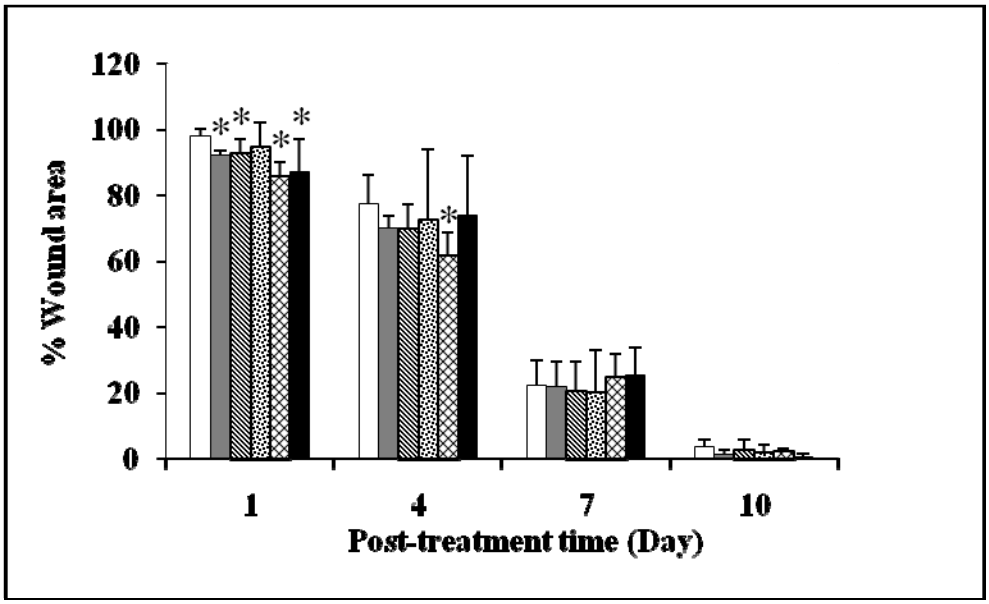
รูปที่ 21 Cell viability ของเซลล์ NHF เมื่อสัมผัสกับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ของแผ่นเส้นใยนาโน (▨) PVA และ CS-TPP/PVA ที่อัตราส่วนต่างๆ (□) 10/90 (■) 30/70 และ (■) 50/50 ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=5)



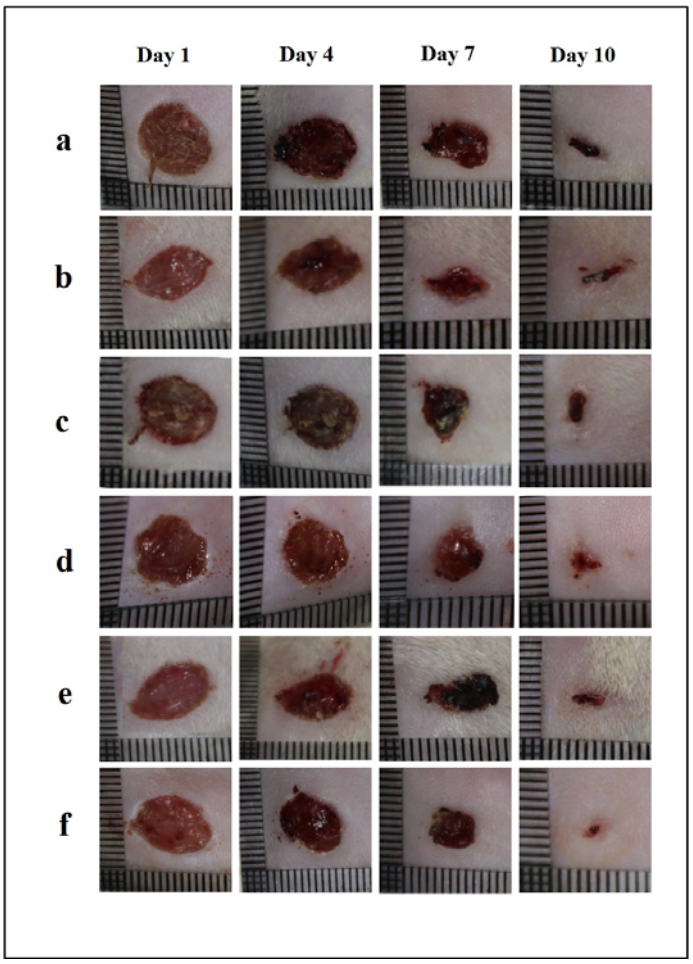
รูปที่ 22 Cell viability ของเซลล์ NHF เมื่อสัมผัสกับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ของแผ่นเส้นใยนาโน (▨) PVA และ CS-EDTA/PVA ที่อัตราส่วนต่างๆ (□) 10/90 (■) 30/70 และ (■) 50/50 ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=5)

4.5 ศึกษาประสิทธิภาพการสมานแผล (*In vivo* wound healing)

ในการศึกษาประสิทธิภาพในการสมานแผล หนู Wistar จะถูกทำให้เกิดบาดแผลตัวละ 2 แผลบริเวณคอด้านหลังโดยเป็นบาดแผลวงกลมขนาด 0.8 cm^2 ในระหว่างการศึกษาจะทำการวัดขนาดแผลทุกวันด้วยวิธี planimetry รูปที่ 23 และ 24 แสดงภาพ wound area (%) และ ภาพบาดแผล ในวันที่ 1 4 7 และ 10 หลังจากรักษาด้วยแผ่นเส้นในนาโน PVA, 30/70 CS-HOBt/PVA, 30/70 CS-TPP/PVA, 30/70 CS-EDTA/PVA ผ้ากอซ (negative control) หรือผ้ากอซบรรจุยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ขายในท้องตลาด (positive control) จากภาพแสดงให้เห็นความแตกต่างของลักษณะภายนอกของแผลและขนาดแผลในแต่ละการรักษา พื้นที่ของบาดแผลเล็กลงอย่างต่อเนื่อง และอยู่ที่ประมาณ 2% ของขนาดแผลเริ่มต้นเมื่อรักษาไปได้เป็นเวลา 10 วัน ของการรักษาที่แตกต่างกันทั้ง 6 แบบ บาดแผลจะหายในวันที่ 10 ของการรักษาในทุกๆ แบบของการรักษา อย่างไรก็ตาม ในวันที่ 1 หลังจากการรักษา % wound area ของกลุ่มที่รักษาด้วย แผ่นเส้นใยนาโน PVA, CS-HOBt/PVA, CS-EDTA/PVA และ ผ้ากอซบรรจุยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ขายในท้องตลาด มีขนาดที่เล็กกว่ากลุ่มที่รักษาด้วยผ้ากอซธรรมดา ($p < 0.05$)



รูปที่ 23 Wound area (%) ในวันที่ 1 4 7 และ 10 หลังจากรักษาด้วย (■) แผ่นเส้นใยนาโน PVA, (□) ผ้ากอซ (negative control), (▧) แผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-HOBt/PVA, (▩) แผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-TPP/PVA, (▨) แผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-EDTA/PVA และ (■) ผ้ากอซบรรจุยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ขายในท้องตลาด (Sofra-tulle®) (positive control) *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=6)



รูปที่ 24 ภาพบาดแผลระหว่างการรักษาในวันที่ 1 4 7 และ 10 หลังจากรักษาด้วย (a) ผ้ากอซ (negative control), (b) แผ่นเส้นใยนาโน PVA, (c) แผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-HOBt/PVA, (d) แผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-TPP/PVA, (e) แผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-EDTA/PVA และ (f) ผ้ากอซบรรจุยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ขายในท้องตลาด (Sofra-tulle®) (positive control)

ผลการทดลองดังกล่าวอาจเนื่องมาจากลักษณะของแผ่นเส้นใยนาโนที่มีพื้นที่ผิวสูงทำให้สามารถดูดซับของเหลวที่เกิดจากแผลได้มากทำให้แผลแห้งกว่าและเกิดการยึดตัวของเนื้อเยื่อบริเวณรอบบาดแผลทำให้บาดแผลมีขนาดเล็กกว่ากลุ่มที่รักษาด้วยผ้ากอซธรรมดา ในวันที่ 4 ของการรักษาพบว่า การรักษาด้วย แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA แผลสมานได้ดีที่สุด ($p < 0.05$) และในสัปดาห์แรกของการรักษา แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA แสดงผลที่ยอดเยี่ยมในการสมานแผล อันเป็นผลมาจากแผ่นเส้นใยนาโนดังกล่าวมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุดจากตัว EDTA และจาก N-acetyl-D-glucosamine ที่ได้จากกระบวนการย่อยของไคโตซานจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสมานแผลโดยการช่วยการเจริญเติบโตของ fibroblast ได้[59] หลังจากสัปดาห์แรกของการรักษาขนาดของแผลในแต่ละกลุ่มทดลองจะมีความคล้ายคลึงกัน ซึ่งอาจจะเกิดจาก

กระบวนสมานแผลในช่วงหลังขึ้นกับกลไกของร่างกายหนูทดลองโดยปราศจากผลของวัสดุปกปิดแผล ผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาของ Chen และคณะ 2008 ที่ศึกษาการสมานแผลของแผ่นเส้นใยนาโนคอลลาเจนและไคโตซานในหนูทดลอง พบว่าขนาดของแผลค่อยๆ ลดลงโดยกลุ่มที่รักษาด้วยแผ่นเส้นใยนาโนดังกล่าวมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการรักษาด้วย ผ้ากอซธรรมดาและคอลลาเจนเพียงอย่างเดียว[60]

5. แผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานผสมสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดสำหรับสมานแผล

5.1 การเตรียมสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

เปลือกของผลมังคุดถูกสกัดด้วย 70 % v/v อะซิโตน หลังจากกระบวนการสกัดสิ้นสุดคำนวณปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์ yield ได้ค่า yield เท่ากับ 19.79 ± 1.73 % ผลการศึกษาพบว่า 70 % v/v อะซิโตนมีประสิทธิภาพในการสกัดที่ดี

5.2 การควบคุมคุณภาพสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดจะถูกควบคุมคุณภาพก่อนนำไปโหลดลงใน สารละลาย 30/70 CS-EDTA/PVA โดยประเมินปริมาณแอลฟ่าแมงโกสติน ปริมาณสารฟีนอลลิกทั้งหมด ปริมาณแทนนินทั้งหมดสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและเชื้อแบคทีเรีย ข้อมูลแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ปริมาณสารออกฤทธิ์ต่างๆ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

Test			GM extracts
แอลฟ่าแมงโกสติน(% w/w of extract)			13.20 ± 0.20
Total phenolics (g GAE/100 g of extract)			26.46 ± 0.22
Total tannins (g TAE/100 g of extract)			34.05 ± 0.05
Antioxidant activities	DPPH IC_{50} (µg/mL)		14.66 ± 0.16
	ABTS IC_{50}(µg/mL)		1.67 ± 0.03
	FRAP EC_1(ng/mL)		0.33 ± 0.001
	Galvinoxyl radical IC_{50}(mg/mL)		N/A
	Superoxide radical IC_{50}(µg/mL)		4.35 ± 0.03
	Hydroxyl radical IC_{50}(µg/mL)		6.87 ± 0.01
	Metal ion chelating IC_{50}(µg/mL)		N/A
Antibacterial activities	MIC	*S.aureus* (µg/mL)	62.5
		E.coli (µg/mL)	62.5
	MBC	*S.aureus* (µg/mL)	62.5
		E.coli (µg/mL)	62.5

N/A = the inhibition (%) was not reach to 50%

ผลการศึกษาพบว่า มีปริมาณแอลฟ่าแมงโกสตินในสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด เท่ากับ 13.20 ± 0.2 % w/w ปริมาณสารฟีนอลลิกทั้งหมดและแทนนินทั้งหมด เท่ากับ 26.46 ± 0.22 g GAE/100 g ของสารสกัดและ 34.05 ± 0.05 g GAE/100 g ของสารสกัดตามลำดับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดศึกษาโดยวิธี DPPH, ABTS, FRAP, galvinoxyl radical, superoxide radical, hydroxyl radical และ metal ion chelating ค่า IC_{50} ของวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 14.66 ± 0.16 และ 1.67 ± 0.03 µg/mL ส่วนค่า EC_1 ของวิธี FRAP เท่ากับ 0.33 ± 0.001 ng/mL ค่า IC_{50} ของวิธี superoxide และ hydroxyl radical scavenging เท่ากับ 4.35 ± 0.03 และ 6.87 ± 0.01 µg/mL สำหรับวิธี galvinoxyl radical และ metal ion chelating สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดไม่สามารถแสดงฤทธิ์ scavenging และ chelating ผลการทดลองสอดคล้องกับ Pothitirat และคณะ 2009 ได้รายงานปริมาณสารฟีนอลลิกทั้งหมดและแทนนินทั้งหมดของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในสารละลาย 95% v/v เอทานอล เท่ากับ 28.88 ± 0.73 g GAE/100 g ของสารสกัด และ 36.66 ± 0.43 g GAE/100 g ของสารสกัดตามลำดับ ปริมาณแอลฟ่าแมงโกสติน เท่ากับ 13.63 ± 0.06 % (w/w)[61] ผลการทดลองค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดต่อเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* เท่ากับ 62.5 µg/mL ซึ่งผลการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของ Sakagami และคณะ 2005 รายงานว่าสารแอลฟ่าแมงโกสตินที่แยกมาจาก stem bark ของ *Garcinia mangostana* มีฤทธิ์ต้านเชื้อ vancomycin resistant *Enterococci* และ methicillin resistant *Staphylococcus aureus* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 6.25 และ 6.25 - 12.5 µg/mL ตามลำดับ[62] ผลการทดลองทั้งหมดบ่งบอกว่า สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดใน 70% v/v อะซิโตนยังคงมีสารแอลฟ่าแมงโกสติน สารฟีนอลลิก แทนนิน และยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและเชื้อแบคทีเรียที่ดี

5.3 การเตรียมแผ่นเส้นใยนาโนผสมสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

เตรียมสารละลาย 30/70 CS-EDTA/PVA ที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด (ในความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อน้ำหนักพอลิเมอร์ไคโตซาน/PVA) ตารางที่ 8 แสดงค่าความหนืด ความนำไฟฟ้าและแรงตึงผิวของสารละลาย ซึ่งถ้าเพิ่มปริมาณของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดจนมากเกิน 3%wt สารละลายจะมีพารามิเตอร์ต่างๆ แย่ลง เช่น มีค่าความหนืดต่ำ ทำให้ไม่สามารถเตรียมเป็นแผ่นเส้นใยนาโนได้ดี เกิดลักษณะบีดในแผ่นเส้นใยและกลายเป็นหยดของสารละลายในส่วนรองรับเส้นใย ดังนั้นสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดสามารถโหลดลงในแผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-EDTA/PVA ได้ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 %wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์

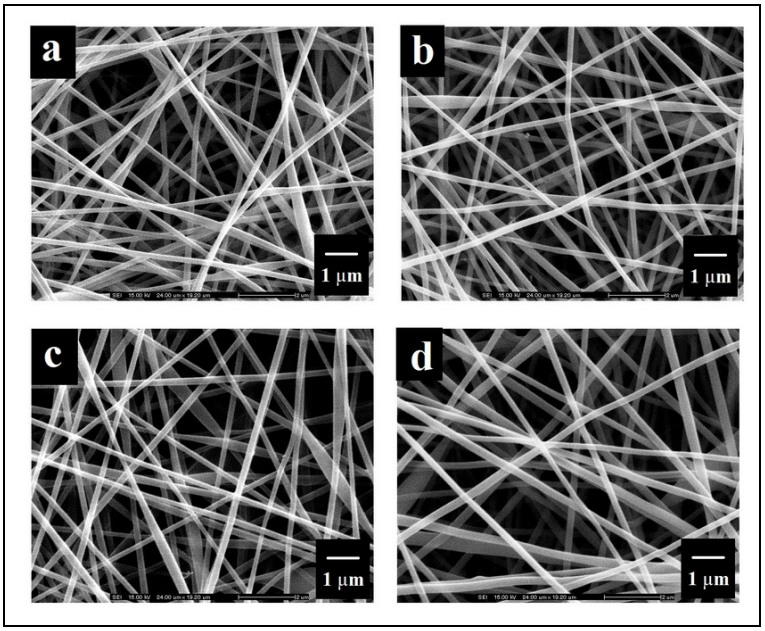
ตารางที่ 8 ค่าพารามิเตอร์ของสารละลายก่อนอิเล็กโตรสปินนิ่ง ของสารละลายไคโตซานผสมที่มีและไม่มี สารสกัดจากเปลือกผลมังคุด (0 1 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

Solution	Viscosity (mPa s)	Conductivity (mS cm-1)	Surface tension (mN m-1)
0% แอลฟ่าแมงโกสติน	254.7 ± 0.76	1006.0 ± 7.55	55.5 ± 0.28
1% แอลฟ่าแมงโกสติน	252.4 ± 2.39	1035.0 ± 2.65	53.9 ± 0.57
2% แอลฟ่าแมงโกสติน	245.9 ± 1.37	1075.7 ± 1.53	52.1 ± 0.31
3% แอลฟ่าแมงโกสติน	239.9 ± 1.64	1114.7 ± 8.74	49.3 ± 0.15

5.4 การตรวจสอบคุณลักษณะของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

5.4.1 การตรวจสอบคุณลักษณะเชิงพื้นผิว

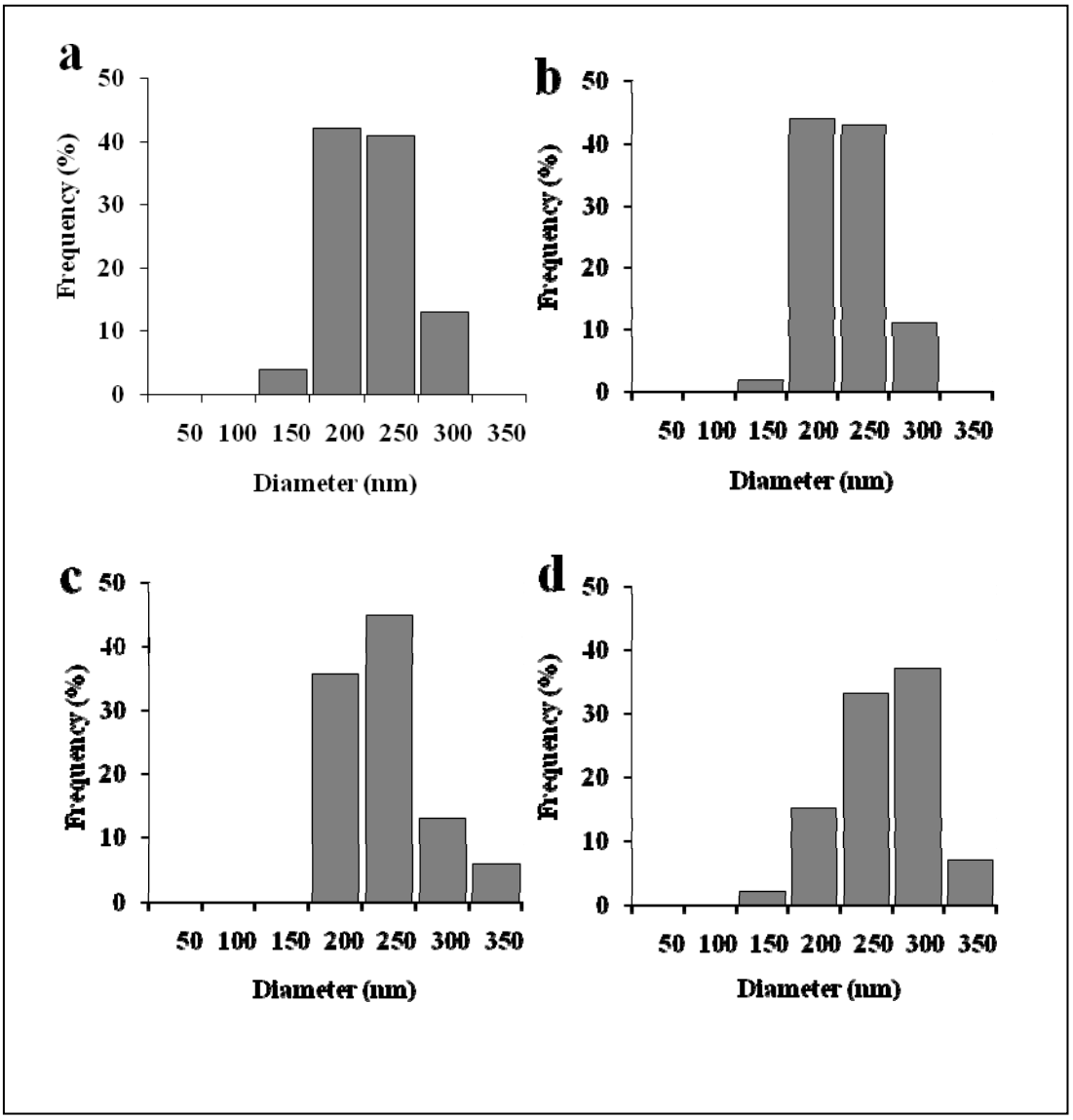
ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่มีและไม่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดแสดงในรูปที่ 25 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงให้เห็นว่า เส้นใยมีลักษณะเรียบและไม่พบผลึกของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในเส้นใย ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด สามารถกักเก็บได้ดีในเส้นใย และเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยอยู่ในระดับนาโนเมตร การกระจายขนาดของเส้นใยแสดงในรูปที่ 26 ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางลดลงเล็กน้อยจาก 205.56 ถึง 251.35 นาโนเมตรเมื่อปริมาณของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดเพิ่มมากขึ้น (ตารางที่ 9) ค่าพารามิเตอร์ของสารละลาย CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด เปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อยและไม่ส่งผลต่อสัณฐานวิทยาของเส้นใย (ตารางที่ 8) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดถูกบรรจุในแผ่นเส้นใยอิเล็กโตรสปัน PVA และไม่ได้เปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเส้นใยดังกล่าว เส้นใยที่ได้มีลักษณะเรียบและค่าเฉลี่ยนของเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยของแผ่นที่มีและไม่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดอยู่ในช่วงระหว่าง 140.7 - 197.3 นาโนเมตร[63] นอกจากนี้การบรรจุ lysozymes ลงในเส้นใย CS-EDTA/PVA ก็ไม่ได้ส่งผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยโดยมีขนาดอยู่ในช่วง 143 - 209 นาโนเมตร[64]



รูปที่ 25 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (5000x) ของแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ: (a) 0%wt แอลฟ่าแมงโกสติน (b) 1%wt แอลฟ่าแมงโกสติน(c) 2%wt แอลฟ่าแมงโกสติน และ (d) 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน

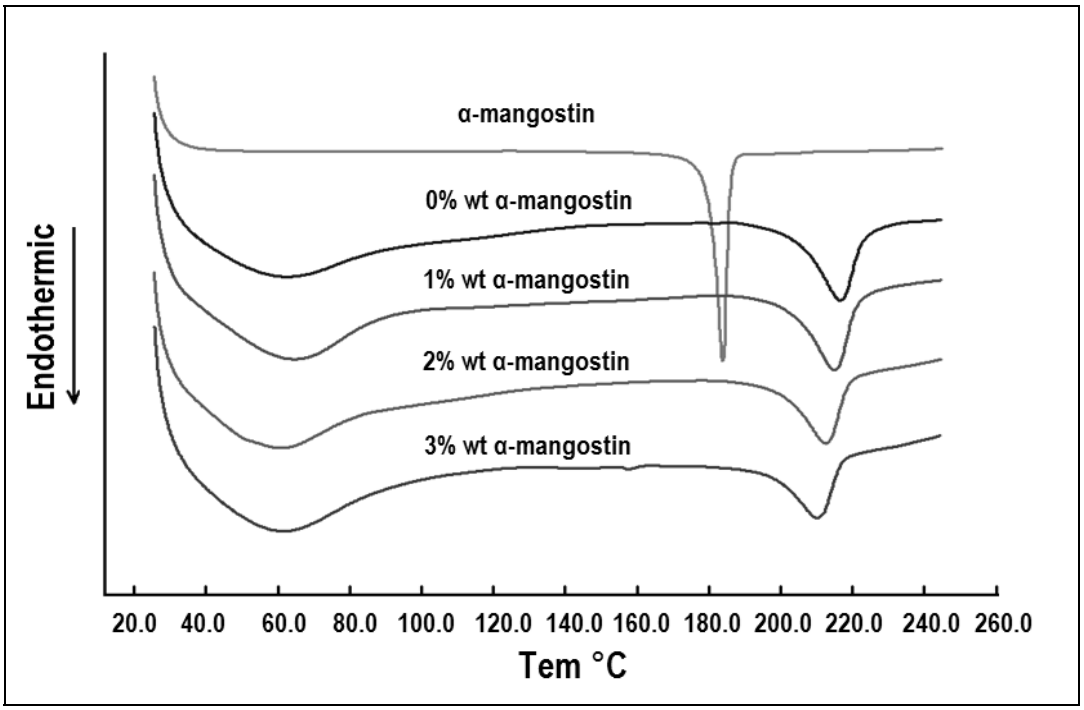
ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด (0 1 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

Nanofiber patches	Average diameter of nanofiber (nm)
0% แอลฟ่าแมงโกสติน	205.5 ± 36.06
1% แอลฟ่าแมงโกสติน	207.8 ± 34.30
2% แอลฟ่าแมงโกสติน	220.7 ± 36.74
3% แอลฟ่าแมงโกสติน	251.3 ± 47.95



รูปที่ 26 การกระจายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ: (a) 0%wt แอลฟ่าแมงโกสติน (b) 1%wt แอลฟ่าแมงโกสติน (c) 2%wt แอลฟ่าแมงโกสติน และ (d) 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน

รูปที่ 27 แสดง DSC thermograms แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่มีหรือไม่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดและสารมาตรฐานแอลฟ่าแมงโกสติน ผลการศึกษาพบว่า endothermic curves ของแผ่นเส้นใยนาโนที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดมีค่าจุดหลอมเหลวลดลงจาก 216.9 °C ถึง 215.2 212.4 และ 210.2 °C เมื่อปริมาณของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดเพิ่มขึ้นเป็น 1 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินตามลำดับ สำหรับสารมาตรฐานแอลฟ่าแมงโกสตินมีจุดหลอมเหลวที่ต่ำกว่าแผ่นเส้นใยนาโนอยู่ที่ 183.7 °C จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในแผ่นเส้นใยนาโนไม่ส่งผลต่อพฤติกรรมภายใต้ความร้อน (thermal behavior) ของแผ่นเส้นใยนาโน

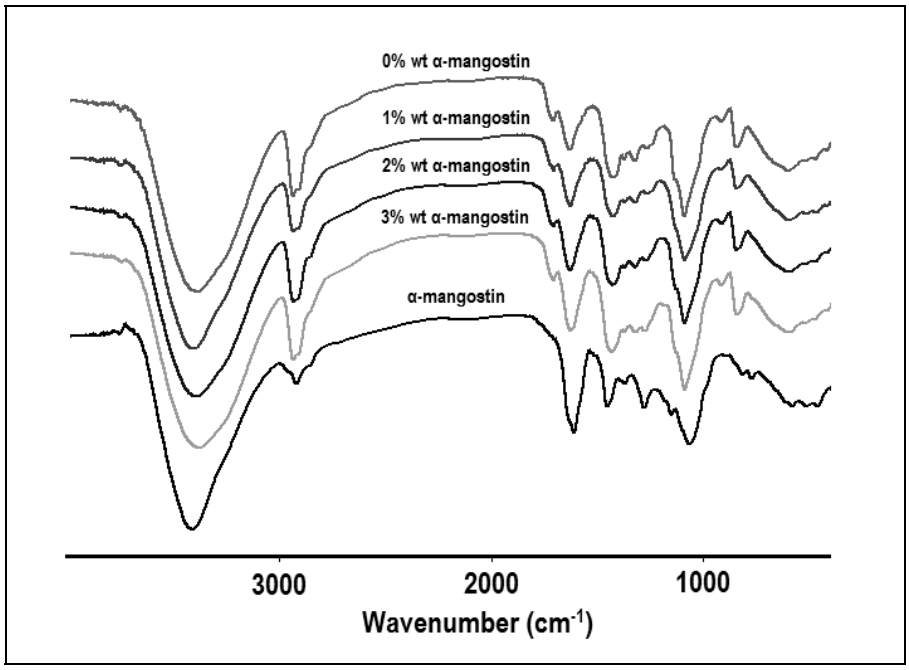


รูปที่ 27 DSC thermograms แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0 1 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) และสารมาตรฐานแอลฟ่าแมงโกสติน thermal behavior

5.4.2 การตรวจสอบคุณลักษณะเชิงเคมี

FT-IR สเปกตรัมของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่มีหรือไม่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด และสารมาตรฐานแอลฟ่าแมงโกสตินแสดงในรูปที่ 28 พบว่าสเปกตรัมของ แผ่นเส้นใยนาโนที่ไม่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด แสดงพีคที่ 3360, 2940, 1650, 1430 และ 1095 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของ ν(O-H), $\nu_s(CH_2)$, ν(C=O), δ(CH-O-H) และ ν(C-O) ตามลำดับ และในสเปกตรัมของสารมาตรฐานแอลฟ่าแมงโกสติน จะแสดงพีคที่โดดเด่นที่ 3422, 1642 และ 1284 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของหมู่ฟีนอลลิก คาร์บอนิล และเมทอกซี ตามลำดับ[65] ซึ่งพีคที่พบในสารมาตรฐานแอล

ฟ้าแมงโกสติน จะสามารถพบได้ในสเปกตรัมของ แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุ 1-3%wt แอลฟ้าแมงโกสติน จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าแอลฟ้าแมงโกสตินในสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดกระจายตัวได้ดีในแผ่นเส้นใยนาโน



รูปที่ 28 FTIR สเปกตรัมของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0, 1, 2 และ 3%wt แอลฟ้าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) และสารมาตรฐานแอลฟ้าแมงโกสติน

5.4.3 การตรวจสอบคุณลักษณะเชิงกล

คุณสมบัติเชิงกลในรูป tensile strength, strain at the maximum และ Young's modulus ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่มีหรือไม่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดถูกตรวจสอบและแสดงผลในตารางที่ 10 ผลการศึกษาพบว่าค่า tensile strength ของแผ่นเส้นใยนาโนทั้งหมดอยู่ในช่วง 4.57 - 5.11 MPa และค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.76 MPa เมื่อปริมาณของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดเพิ่มขึ้นค่า tensile strength ของแผ่นเส้นใยนาโนจะค่อยๆ ลดลง ส่วนค่า strain at the maximum ของแผ่นเส้นใยนาโนทั้งหมดอยู่ในช่วง 7.06 - 7.61 MPa และค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.34 MPa และค่า Young's modulus ของแผ่นเส้นใยนาโนทั้งหมดอยู่ในช่วง 51.9 - 87.8 MPa และค่าเฉลี่ยเท่ากับ 67.7 MPa ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ในแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ส่งผลน้อยต่อคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นเส้นใยนาโน การศึกษานี้สรุปได้ว่า แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ มีศักยภาพพัฒนาไปเป็นวัสดุสำหรับการปิดแผล

ตารางที่ 10 คุณสมบัติเชิงกลของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0 1 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

Nanofiber patches	Tensile strength (MPa)	Strain (%)	Young's modulus (MPa)
0% แอลฟ่าแมงโกสติน	5.11 ± 0.33	7.06 ± 3.06	60.8 ± 16.0
1% แอลฟ่าแมงโกสติน	4.77 ± 0.56	7.33 ± 2.97	51.9 ± 0.9
2% แอลฟ่าแมงโกสติน	4.59 ± 0.16	7.61 ± 0.45	70.4 ± 36.7
3% แอลฟ่าแมงโกสติน	4.57 ± 0.17	7.36 ± 0.55	87.8 ± 34.2

5.5 การหาปริมาณและการปลดปล่อยสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดจากแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซาน

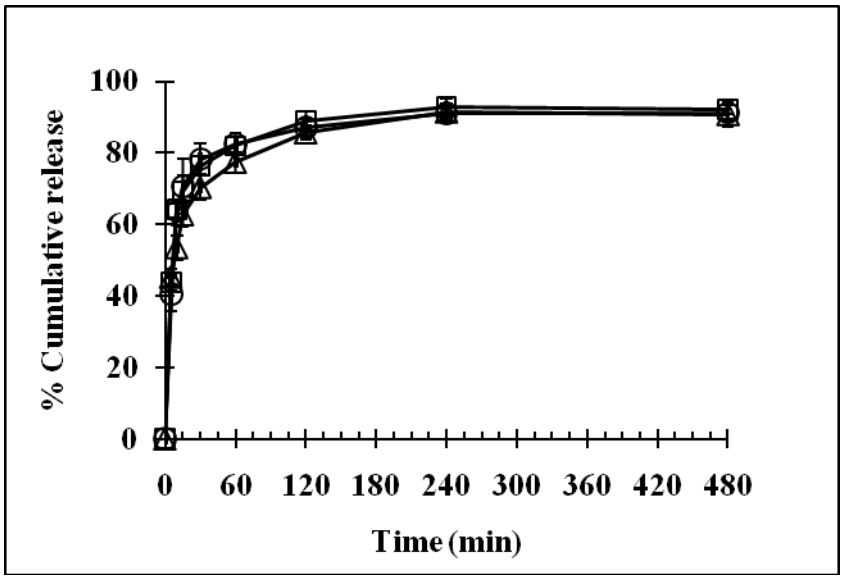
ค่า % loading efficacy ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดอยู่ในช่วง 40.69 - 43.86% เมื่อปริมาณของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดเพิ่มขึ้น (ดูในตารางที่ 11) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงข้อจำกัดของการบรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดลงในแผ่นเส้นใยนาโน อาจเนื่องมาจาก สารสกัดจากเปลือกผลมังคุดเป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic compound) ซึ่งบรรจุเข้าไปได้ยากในพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ (hydrophillic) อย่างสารละลาย CS-EDTA/PVA

ตารางที่ 11 % loading efficacy ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0 1 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

Nanofiber patches	Loading efficacy (%)
1% แอลฟ่าแมงโกสติน	40.69 ± 2.30
2% แอลฟ่าแมงโกสติน	41.97 ± 3.25
3% แอลฟ่าแมงโกสติน	43.86 ± 0.11

ศึกษาการปลดปล่อยของแอลฟ่าแมงโกสตินจากแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดโดยใช้ Franz's diffusion cells รูปที่ 29 แสดงรูปแบบการปลดปล่อยแอลฟ่าแมงโกสตินจาก แผ่นเส้นใยนาโนในความเข้มข้นต่างๆ (0, 1, 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแอลฟ่าแมงโกสตินมีการปลดปล่อยอย่างรวดเร็ว เปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยสะสมของแอลฟ่าแมงโกสติน อยู่ที่ประมาณ 80% ภายใน 60 นาที ผล

การศึกษาแสดงให้เห็นว่า แอลฟ่าแมงโกสตินสามารถปลดปล่อยได้อย่างรวดเร็วจากแผ่นเส้นใยนาโน โดยปริมาณสูงสุดของแอลฟ่าแมงโกสตินที่ปลดปล่อยจากแผ่นเส้นใยนาโนใน 8 ชั่วโมงอยู่ที่ประมาณ 90% จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแอลฟ่าแมงโกสตินสามารถปลดปล่อยได้โดยง่ายจากแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA และรูปแบบการปลดปล่อยแอลฟ่าแมงโกสตินสามารถอธิบายได้โดยกลไกการพองตัวและการกร่อนตัวของพอลิเมอร์[66] ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการปลดปล่อยสารต่างๆ จากพอลิเมอร์เมทริกซ์คือพฤติกรรมการพองตัว เช่น ไคโตซานเบสเมทริกซ์จะเริ่มพองตัวโมเลกุลของยาจะเริ่มละลายและออกมาจากเมทริกซ์ได้อย่างรวดเร็ว อีกหนึ่งกลไกคือการกร่อนของพอลิเมอร์ไคโตซานก็จะทำให้โมเลกุลของยาออกมาอยู่ในตัวกลางได้เช่นกัน[67]



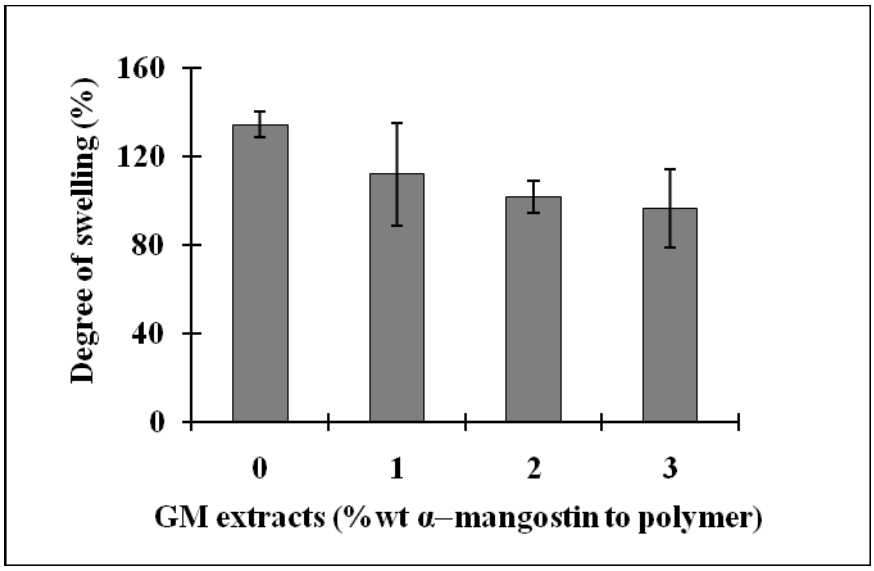
รูปที่ 29 การปลดปล่อยแอลฟ่าแมงโกสตินจากแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ: (△) 1%wt แอลฟ่าแมงโกสติน, (□) 2%wt แอลฟ่าแมงโกสติน และ (○) 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

5.6 การประเมินแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

5.6.1 การประเมินคุณสมบัติการพองตัว

รูปที่ 30 แสดง degree of swelling ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่มีหรือไม่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด หลังจากแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ผลการศึกษาพบว่า แผ่นเส้นใยนาโนที่ไม่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด (0%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) มีค่า swelling degree เท่ากับ 134.53% และจะลดลงเมื่อปริมาณของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดเพิ่มขึ้น โดย swelling degree แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ 1 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์ เท่ากับ 111.96, 101.7 และ 96.67% ตามลำดับ ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่

ชอบน้ำโดยน้ำสามารถแพร่ผ่านเข้าไปในพอลิเมอร์ได้อย่างรวดเร็วก่อนที่จะเกิดการสลายตัวของพอลิเมอร์ [44] ส่วนสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดเป็นสารที่ไม่ชอบน้ำดังนั้นเมื่อบรรจุลงในแผ่นเส้นใยนาโน อาจจะส่งผลต่อคุณสมบัติการพองตัวของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA โดยไปเพิ่มความไม่ชอบน้ำในเส้นใยทำให้การการพองตัวลดลง



รูปที่ 30 Degree of swelling (%) ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0 1 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

5.6.2 การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0 1 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ศึกษาด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้ DPPH, ABTS, FRAP, Galvinoxyl radical, superoxide radical scavenging, hydroxyl radical scavenging, metal ion chelating และ reducing power ตารางที่ 12 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS, FRAP และ galvinoxyl radical ผลการศึกษาพบว่าแผ่นที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดจะแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นกับความเข้มข้น ค่า IC_{50} ของวิธี DPPH ABTS และ FRAP จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามแผ่นเส้นใยนาโนที่ไม่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดจะไม่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ABTS และ FRAP และแผ่นทั้งหมดไม่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี galvinoxyl radical ตารางที่ 13 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี superoxide, hydroxyl radical scavenging และ metal ion ในการศึกษาขั้นแรกพบว่า แผ่นเส้นใยนาโน 30/70 CS-EDTA/PVA แสดงฤทธิ์ chelating ที่ดีต่อ metal ion แต่มีฤทธิ์อ่อนต่อ superoxide และ hydroxyl radical scavenging อย่างไรก็ตามสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี ยังคงแสดง

ฤทธิ์ได้เมื่ออยู่ในแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA และฤทธิ์ chelating ที่ดีอยู่แล้วของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA เปล่ายังคงอยู่ในแผ่นเส้นใยนาโนที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดยังคงอยู่ถึงจะต้องผ่านกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่งที่ใช้ไฟฟ้าความต่างศักย์สูง

ตารางที่ 12 แสดง The total antioxidant capacity และ galvinoxyl radical scavenging ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0 1 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

Nanofiber patches	Total antioxidant capacity			Galvinoxyl radical IC_{50}(mg/mL)
	DPPH IC_{50}(µg/mL)	ABTS IC_{50}(µg/mL)	FRAP EC_1(ng/mL)	
0% α-mangostin	N/A	N/A	N/A	N/A
1% α-mangostin	677.6 ± 2.89	53.1 ± 0.28	18.9 ± 0.95	N/A
2% α-mangostin	371.4 ± 10.11	36.5 ± 0.25	7.6 ± 0.00	N/A
3% α-mangostin	260.1 ± 7.42	27.1 ± 0.31	5.9 ± 0.00	N/A

N/A = the inhibition (%) was not reach to 50%

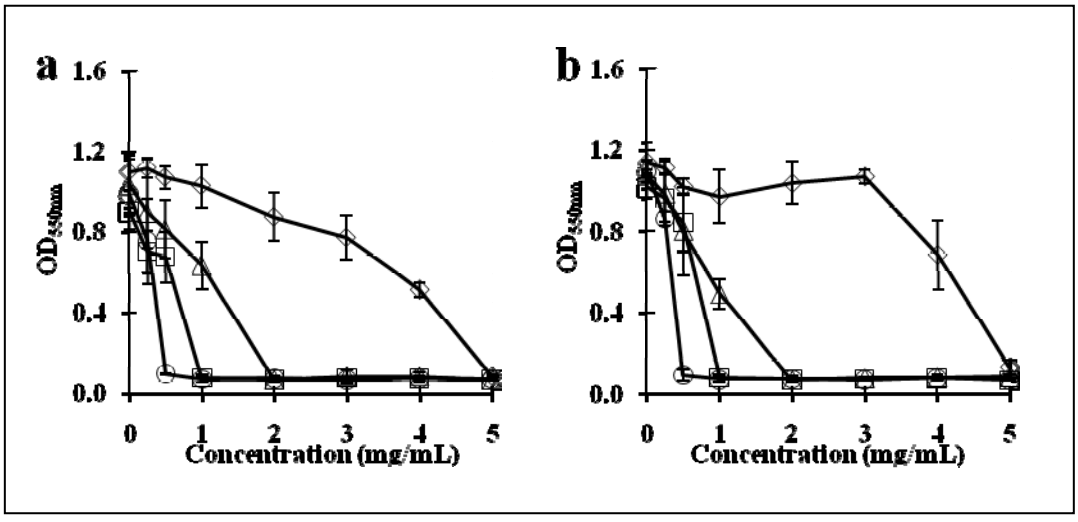
ตารางที่ 13 แสดง The superoxide, hydroxyl radical scavenging และ metal ion chelating ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0 1 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

Nanofiber patches	Superoxide radical IC_{50}(µg/mL)	Hydroxyl radical IC_{50}(µg/mL)	Metal ion chelating IC_{50}(µg/mL)
0% α-mangostin	N/A	N/A	107.3 ± 0.61
1% α-mangostin	149.89 ± 1.43	426.01 ± 2.50	124.3 ± 1.91
2% α-mangostin	87.48 ± 0.60	210.74 ± 4.50	109.2 ± 1.06
3% α-mangostin	43.68 ± 0.39	92.69 ± 2.60	107.2 ± 1.62

N/A = the inhibition (%) was not reach to 50%

5.6.3 การประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแสดงในรูปที่ 31 แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดถูกทดสอบในแบคทีเรียแขวนตะกอนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แผ่นเส้นใยดังกล่าวแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียขึ้นกับความเข้มข้น โดยผลการศึกษาพบว่าแผ่นเส้นใยนาโนที่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้น 1 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ที่ความเข้มข้นของแผ่น 2 1 และ 0.5 mg/mL ตามลำดับ สำหรับแผ่นที่ไม่มีสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดก็สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียยได้ที่ 5 mg/mL ค่า MIC และ MBC ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดแสดงในตารางที่ 14 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของแผ่นเส้นใยนาโนมีค่าน้อยกว่า 5 mg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อ fibroblast cells ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดยังคงอยู่เมื่อผ่านกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่ง และเมื่อแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดอยู่ในแบคทีเรียแขวนตะกอน สารสกัดจะถูกปลดปล่อยออกจากเส้นใยและแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้เมื่อแผ่นกร่อนตัวไคโตซานและ EDTA ในแผ่นก็จะออกมาอยู่ในแบคทีเรียแขวนตะกอนและเสริมฤทธิ์ต่านเชื้อแบคทีเรีย มีรายงานฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดต่อทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ [32, 33] และแอลฟ่าแมงโกสตินในสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [70] ส่วนไคโตซานสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยประจุบวกบนสายพอลิเมอร์ไปรบกวนประจุลบบนผิวของแบคทีเรีย และยังสามารถเข้าไปในเซลล์เพื่อจับกับ DNA และ ยับยั้งการสังเคราะห์ mPNA และโปรตีน[55,56]



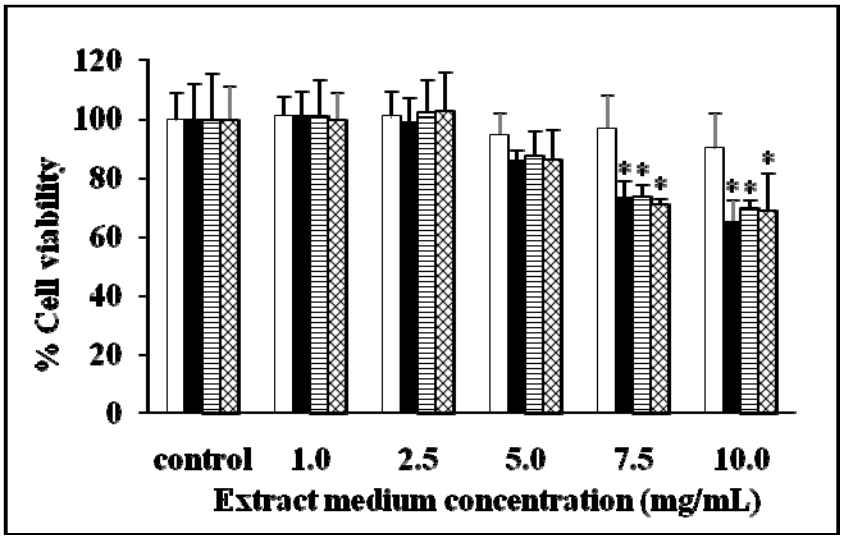
รูปที่ 31 OD 550 nm ของเชื้อ (a) *S. aureus* และ (b) *E. coli* ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ: (◇) 0%wt แอลฟ่าแมงโกสติน (△) 1%wt แอลฟ่าแมงโกสติน (□) 2%wt แอลฟ่าแมงโกสติน และ (○) 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ตารางที่ 14 Minimum inhibition concentrations (MIC) และ minimum bactericidal concentrations (MBC) ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0 1 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

Type of chtosan- based nanofiber patches	MIC (mg/mL)		MBC (mg/mL)	
	S. aureus	*E. coli*	*S. aureus*	*E. coli*
With 0% แอลฟ่าแมงโกสติน	5.0	5.0	5.0	5.0
With 1% แอลฟ่าแมงโกสติน	2.0	2.0	2.0	2.0
With 2% แอลฟ่าแมงโกสติน	1.0	1.0	1.0	1.0
With 3% แอลฟ่าแมงโกสติน	0.5	0.5	0.5	0.5

5.6.4 ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

ศึกษาความเป็นพิษของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0, 1, 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ใน NHF cells ด้วยวิธี MTT รูปที่ 32 แสดง cell viability ของ medium สกัดจากแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ผลการศึกษาพบว่า cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อความเข้มข้นของ medium สกัดอยู่ที่ 7.5 - 10.0 mg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) ผลการศึกษานี้อาจเนื่องมาจากปริมาณของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดมากเกินไปละก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ได้ อย่างไรก็ตาม cell viability ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมเมื่อความเข้มข้นของแผ่นเส้นใยอยู่ที่ 1 – 5 mg/mL จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดในความเข้มข้นต่างๆ (0, 1, 2 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 1 - 5 mg/mL

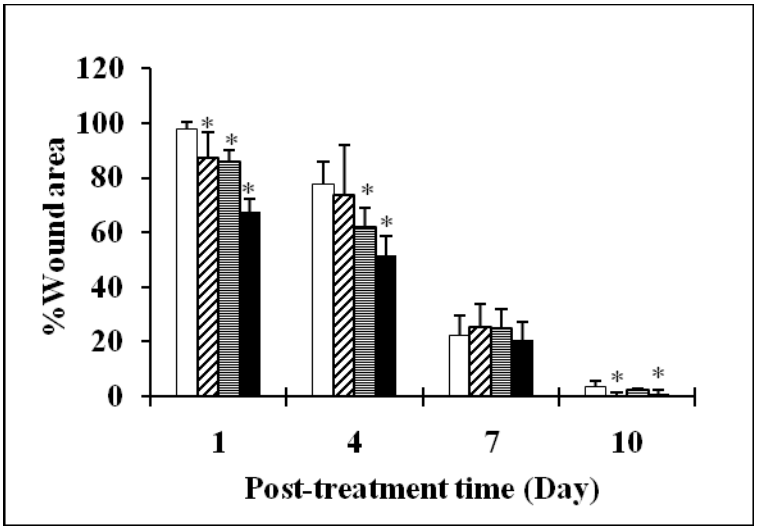


รูปที่ 32 Cell viability ของเซลล์ NHF เมื่อสัมผัสกับสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ของแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่ความเข้มข้นต่างๆ: (□) 0%wt แอลฟ่าแมงโกสติน (■) 1%wt แอลฟ่าแมงโกสติน (▤) 2%wt แอลฟ่าแมงโกสติน และ (▨) 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=5)

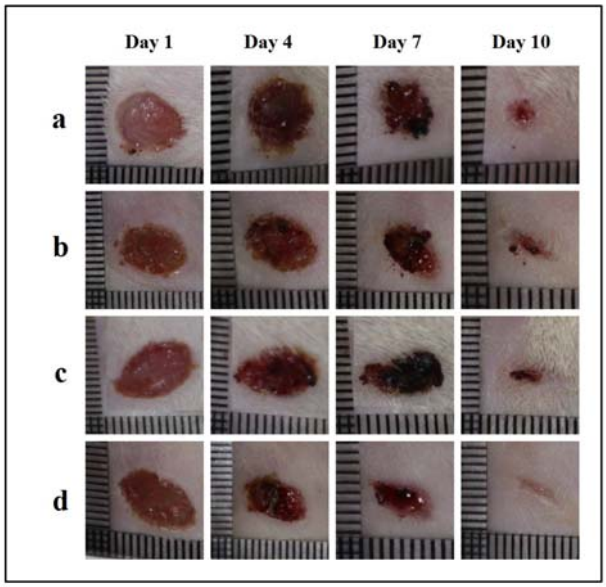
5.6.5 ศึกษาประสิทธิภาพการสมานแผล

ในการศึกษาประสิทธิภาพในการสมานแผล หนู Wistar จะถูกทำให้เกิดบาดแผลตัวละ 2 แผลบริเวณคอด้านหลังโดยเป็นบาดแผลวงกลมขนาด 0.8 cm^2 ในระหว่างการศึกษาจะทำการวัดขนาดแผลทุกวันด้วยวิธี planimetry รูปที่ 33 และ 34 แสดง % wound area และภาพลักษณะบาดแผลในวันที่ 1, 4, 7 และ 10 หลังจากการรักษาด้วย ผ้ากอซ (negative control) ผ้ากอซบรรจุยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ขายในท้องตลาด (Sofra-tulle®) (positive control) และแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดที่ความเข้มข้น 0 และ 3%wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์) ผลการศึกษาพบว่าขนาดของบาดแผลของทุกกลุ่มการรักษาค่อยๆ ลดลงและหายผ่านใน 11 วัน ในวันที่ 1 และ 4 ของการรักษากลุ่มที่รักษาด้วยแผ่นเส้นใยนาโน 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน CS-EDTA/PVA มีผลการรักษาที่ดีที่สุดและมีขนาดบาดแผลที่เล็กที่สุด ($p < 0.05$) ในสัปดาห์แรกของการรักษากลุ่มที่รักษาด้วย แผ่นเส้นใยนาโน 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน CS-EDTA/PVA มีการสมานแผลที่เร็วกว่ากลุ่มที่รักษาด้วยผ้ากอซธรรมดาและผ้ากอซบรรจุยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ขายในท้องตลาด ผลการศึกษาดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ที่ดีของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอลฟ่าแมงโกสติน โดยสารสกัดจะปลดปล่อยออกมาอย่างรวดเร็วจากแผ่นเส้นใยนาโนและช่วยเร่งกระบวนการสมานแผล[71] ส่วน N-acetyl-D-glucosamine และ EDTA ที่เกิด

จากการสลายตัวของไคโตซานก็เสริมฤทธิ์การสมานบาดแผลได้โดยเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ fibroblast[72,73] และไคโตซานยังมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วย[52] % wound area ของการรักษาทั้งหมดในเวลาที่บาดแผลหายมีความคล้ายคลึงกันอาจเนื่องมาจากสมานในช่วงเวลาที่แผลใกล้จะหายเกิดจากกลไกของร่างกายโดยปราศจากผลของการรักษาด้วยวิธีต่างๆ ผลการศึกษามีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าแผ่นเส้นใยนาโนที่บรรจุ lysozyme มีความสามารถในการสมานแผลได้ดีกว่าผ้ากอซในวันที่ 1 – 4 ของการรักษา[64]

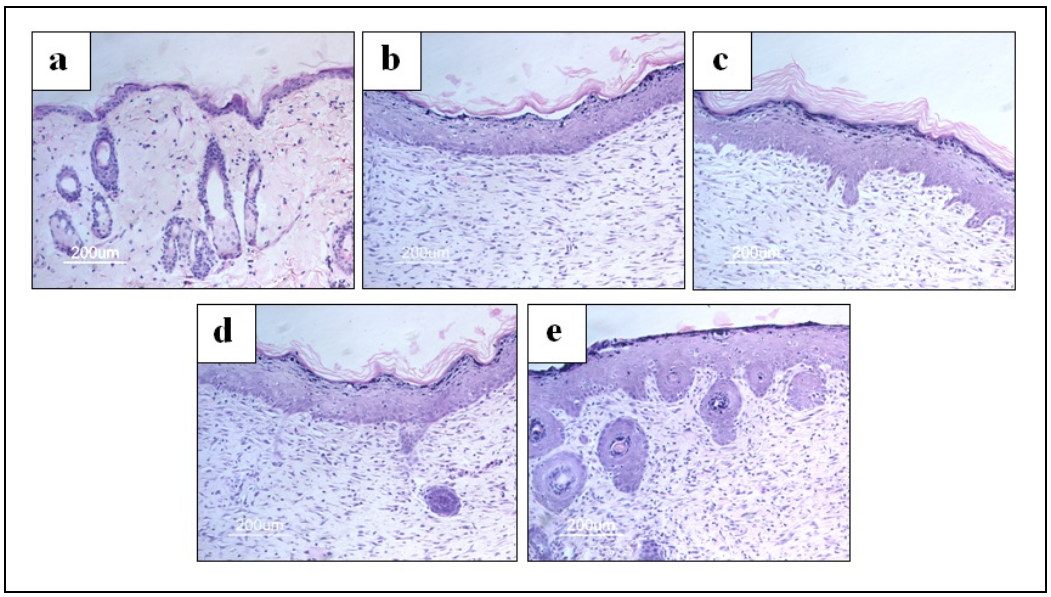


รูปที่ 33 Wound area (%) ในวันที่ 1, 4, 7 และ 10 หลังจากรักษาด้วย (□) ผ้ากอซ (negative control), (▨) ผ้ากอซบรรจุยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ขายในท้องตลาด (Sofra-tulle®) (positive control), (▩) แผ่นเส้นใยนาโน 0%wt แอลฟ่าแมงโกสติน และ (■) แผ่นเส้นใยนาโน 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=6)



รูปที่ 34 ภาพบาดแผลระหว่างการรักษาในวันที่ 1, 4, 7 และ 10 หลังจากรักษาด้วย (a) ผ้ากอซ (negative control), (b) ผ้ากอซบรรจุยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ขายในท้องตลาด (Sofra-tulle®) (positive control), (c) แผ่นเส้นใยนาโน 0%wt แอลฟ่าแมงโกสติน และ (d) แผ่นเส้นใยนาโน 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน

ภาพถ่ายชิ้นเนื้อผิวหนังที่ย้อมด้วย hematoxylin และ eosin ของบาดแผลที่ผ่านการรักษาด้วยวัสดุปิดแผลต่างๆ แสดงในรูปที่ 35 ผลการศึกษาพบว่า ภาพของผิวหนังปกติจะประกอบไปด้วยเส้นใยคอลลาเจนเรียงตัวกันเป็นชั้นอย่างหลวมๆ แทรกด้วยเซลล์ fibroblast เล็กน้อย ในระหว่างกระบวนการสมานแผลเซลล์ fibroblast มีความสำคัญในการควบคุมการสลายและเจริญเติบโตของเซลล์ keratinocytes และการสังเคราะห์และหลั่งสารที่จำเป็นต่อการสร้างคอลลาเจนใน 4 – 6 วันแรกของการสมานแผล และการสร้างเนื้อเยื่อที่มีเส้นเลือดใหม่อีกด้วย ด้วยกระบวนการดังกล่าวบาดแผลจะถูกเต็มเติมด้วยเนื้อเยื่อ และเกิดสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิด epidermis ใหม่[74] บาดแผลกลุ่มที่รักษาด้วย ผ้ากอซ ผ้ากอซบรรจุยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ขายในท้องตลาด และแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA เกิด reepithelialization อย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามบาดแผลกลุ่มที่รักษาด้วย แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ก็เกิด reepithelialization อย่างสมบูรณ์ และเกือบจะหายขาดโดยเริ่มสังเกตเห็น hair follicle มากขึ้นกว่ากลุ่มอื่นๆ ผลการศึกษานี้สนับสนุนว่าแผ่นเส้นใยนาโน 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน CS-EDTA/PVA สามารถเร่งกระบวนการสมานบาดแผลได้

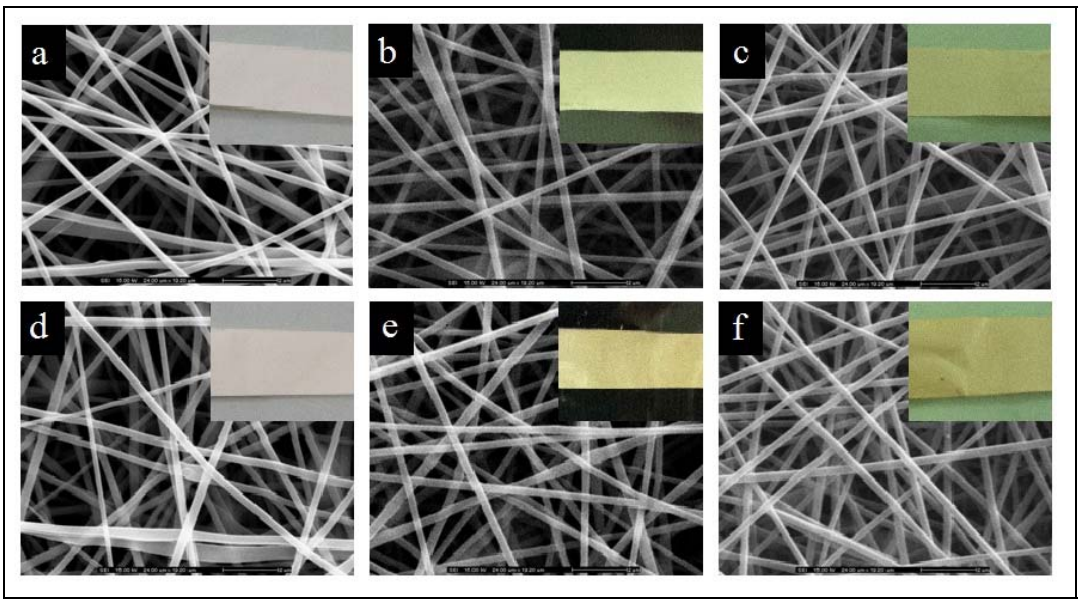


รูปที่ 35 ภาพถ่ายชิ้นเนื้อเยื่อของบาดแผลในวันที่ 11 หลังจากรักษาด้วย (a) ผิวหนังปกติ, (b) ผ้ากอซ (negative control), (c) ผ้ากอซบรรจุยาต้านเชื้อแบคทีเรียที่ขายในท้องตลาด (Sofra-tulle®) (positive control), (d) แผ่นเส้นใยนาโน 0%wt แอลฟ่าแมงโกสติน และ (e) แผ่นเส้นใยนาโน 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน

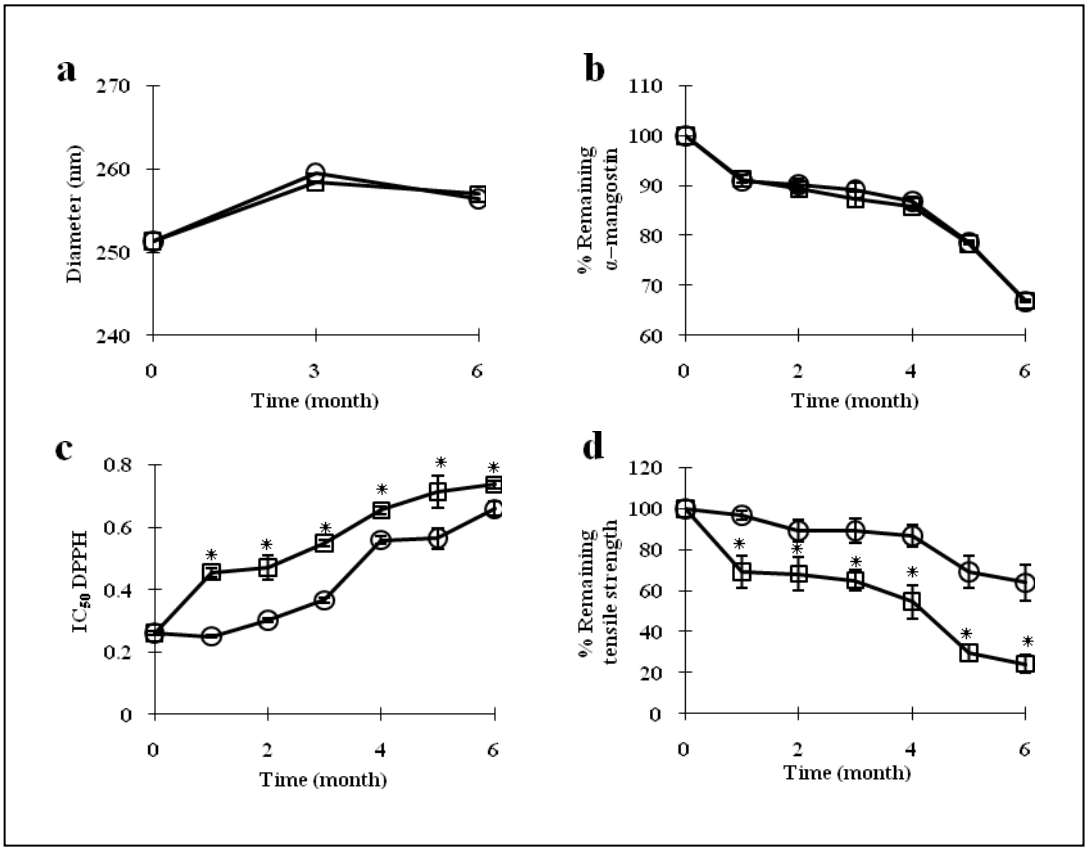
5.7 การศึกษาความคงตัว

แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน ถูกเก็บภายใต้สภาวะปกติ (25°C 40%RH) เปรียบเทียบกับสภาวะเร่ง (45°C 75%RH) เป็นระยะเวลา 6 เดือน รูปที่ 36 แสดงลักษณะภายนอกและภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของแผ่นเส้นใยนาโน 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน CS-EDTA/PVA ที่ 0 3 และ 6 เดือน หลังจากเก็บในสภาวะที่ต่างกัน ผลการศึกษาพบว่าแผ่นเส้นใยนาโนที่เก็บที่สภาวะเร่งมีสีที่เข้มกว่า (dark yellow) แผ่นเส้นใยนาโนที่เก็บในสภาวะปกติ (pale yellow) อย่างไรก็ตามสัณฐานวิทยาของแผ่นเส้นใยนาโนที่เก็บในสภาวะที่แตกต่าง ยังคงเหมือนกันเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เส้นใยมีลักษณะเรียบและไม่พบผลึกของสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด หลังจากเก็บไว้ที่สภาวะปกติและเร่งเป็นเวลา 6 เดือน คุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมี ของแผ่นเส้นใยนาโนแสดงในรูปที่ 37 พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยและ remaining แอลฟ่าแมงโกสติน (%) หลังจากที่เก็บในสภาวะปกติและสภาวะเร่งไม่มีความแตกตต่างกันทางสถิติ เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใยหลังจากเก็บไว้ 3 และ 6 เดือนอยู่ในช่วงประมาณ 250 – 260 nm ส่วนปริมาณของแอลฟ่าแมงโกสตินที่อยู่มนแผ่นลดลงจาก 90% ในเดือนแรกเหลือ 65% หลังจาก 6 เดือน The amount of แอลฟ่าแมงโกสติน สารแอลฟ่าแมงโกสตินนั้นมีความคงตัวใน แสง ความร้อน และกระบวนการไฮโดรไลซิส[75] Pothitirat และคณะ 2009 ได้รายงานว่าสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดยังคงมีปริมาณแอลฟ่าแมงโกสติน ฤทธิ์ antiradical และ anti-acne เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ (4 - 8, 25 -

28 and 45 °C) ใน 120 วัน[76] ผลการศึกษาสอดคล้องการศึกษานี้โอยปริมาณของ แอลฟ่าแมงโกสตินในแผ่นเส้นใยนาโนยังคงอยู่ที่ประมาณ 90% ใน 3 เดือน อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและ remaining tensile strength (%) ของแผ่นเส้นใยนาโนที่เก็บภายใต้สภาวะเร่งมีลักษณะที่แย่ลงเมื่อเทียบกับที่เก็บในสภาวะปกติ ผลการศึกษาดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดมีความคงตัวที่ดีเมื่อในอุณหภูมิต่ำ



รูปที่ 36 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะภายนอกของ แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน เมื่อเก็บในสภาวะปกติ (a, b และ c) (25°C 40%RH) เปรียบเทียบกับสภาวะเร่ง (d, e และ f) (45°C 75%RH) เป็นเวลา 0 3 และ 6 เดือนตามลำดับ



รูปที่ 37 คุณสมบัติต่างๆ ของ แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด 3%wt แอลฟ่าแมงโกสติน (a) average diameter, (b) remaining α-mangostin (%), (c) IC_{50} DPPH และ (d) remaining tensile strength (%) เมื่อเก็บภายใต้สภาวะปกติ (○) (25°C 40%RH) เปรียบเทียบกับสภาวะเร่ง (□) (45°C 75%RH) เป็นเวลา 6 เดือน

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาวิจัยนี้สามารถเตรียมแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานเกลือต่างๆ ได้ โดยกระบวนการอิเล็กโตรสปินนิ่ง เนื่องจากไคโตซานเพียงอย่างเดียวไม่สามารถเตรียมเป็นเส้นใยได้จึงนำสารละลายไคโตซานมาผสมกับสารละลาย PVA โดยอัตราส่วนสูงสุดที่สามารถเตรียมเป็นเส้นใยที่ไม่มีบีดคือ ไคโตซาน/PVA เท่ากับ 30/70 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโนที่เตรียมจากเกลือต่างกัน 3 ชนิด คือ CS-HOBt/PVA, CS-TPP/PVA และ CS-EDTA/PVA อยู่ในช่วงนาโนเมตร การกระจายขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยที่อัตราส่วนเดียวกันของไคโตซานเกลือต่างๆ มีลักษณะคล้ายกัน คุณสมบัติของเส้นใยไคโตซานเกลือต่างๆ ภายใต้ความร้อนก็ไม่มีความแตกต่างกัน การตรวจสอบคุณลักษณะทางเคมี พบว่าเส้นใยมีไคโตซานกระจายตัวอยู่และแผ่นเส้นใยนาโนมีคุณสมบัติทางกลที่เหมาะสม ส่วนการตรวจสอบคุณลักษณะของแผ่นเส้นใยนาโน CS-HOBt/PVA, CS-TPP/PVA และ CS-EDTA/PVA พบว่ามีคุณลักษณะไม่แตกต่างกันในแต่ละเกลือ การประเมินแผ่นเส้นใยนาโนไคโตซานเกลือต่างๆ พบว่า คุณสมบัติการพองตัวในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของแผ่นเส้นใยนาโนมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเกลือ โดยแผ่นเส้นใยนาโน CS-HOBt/PVA แสดงฤทธิ์ hydroxyl radical scavenging สูงที่สุด แผ่นเส้นใยนาโน CS-TPP/PVA แสดงฤทธิ์ reducing power สูงที่สุด และแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA แสดงฤทธิ์ superoxide radical scavenging และ metal ion chelating สูงที่สุด ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียพบว่าแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีสุดทั้งต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แผ่นเส้นใยนาโนทั้งหมดไม่เป็นพิษต่อเซลล์ fibroblast และจากการศึกษาการสมานแผลพบว่าแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA มีฤทธิ์เร่งการสมานแผลที่ดีที่สุดใน 4 วันแรกของการรักษา แผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นตัวพาที่จะนำส่งสารสกัดจากเปลือกผลมังคุด

สามารถเตรียมแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดได้ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 %wt แอลฟ่าแมงโกสตินต่อพอลิเมอร์ แผ่นเส้นใยที่เตรียมได้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในระดับนาโนเมตร เส้นใยมีสัณฐานวิทยาที่ดีไม่พบบีดและมีลักษณะไม่แตกต่างจากเดิม ข้อมูลจากการศึกษาด้วย DSC พบว่าแผ่นเส้นใยมีลักษณะเป็น amorphous การศึกษาทางเคมีด้วย FTIR ยืนยันว่ามีสารสกัดอยู่ในแผ่นเส้นใยนาโนจริง และแผ่นเส้นใยมีคุณสมบัติเชิงกลที่ดี มีค่าการพองตัวที่ดี และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ สารสกัดสามารถปลดปล่อยออกมาได้อย่างรวดเร็ว และยังคงแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและเชื้อแบคทีเรียที่ดี ร่วมถึงสามารถเร่งการสมานแผลได้ แผ่นยังมีความคงตัวที่

ดีมีปริมาณ α-mangostin อยู่มากกว่า 90 % เมื่อเก็บไว้ 3 เดือน

จากการศึกษาทั้งหมดสรุปได้ว่าแผ่นเส้นใยนาโน CS-EDTA/PVA ที่บรรจุสารสกัดจากเปลือกผลมังคุดมีคุณสมบัติที่ดีและมีศักยภาพสำหรับพัฒนาไปเป็นวัสดุปกปิดแผลต่อไป ซึ่งเป็นแผ่นปิดแผลที่มีราคาถูก ผลิตจากวัสดุเหลือใช้ สามารถเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมไทย เป็นการลดปริมาณสิ่งเหลือใช้ โดยในงานวิจัยนี้ใช้ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ ซึ่งเตรียมมาจากไคตินจากพวกเปลือกกุ้ง ปู จากอุตสาหกรรมทะเลไทยได้ และสารสำคัญในการออกฤทธิ์คือ สารสกัดจากเปลือกผลมังคุด ซึ่งเป็นผลไม้ที่มีมากในประเทศไทย เป็นการส่งเสริมและสนับสนุนภูมิปัญญาไทย ทำให้ทั่วโลกได้รู้จักผลไม้ไทยและประโยชน์ทางการแพทย์ของสมุนไพรไทย สามารถลดมลภาวะของเสียจากสิ่งแวดล้อมเป็นการเพิ่มรายได้ให้กับคนไทยได้ นอกจากนี้ปัญหาสิ่งแวดล้อม เป็นปัญหาสำคัญที่ทุกคนควรมีส่วนร่วมในการป้องกันและแก้ไขอย่างเร่งด่วน ผู้วิจัยเองอาจเป็นแหล่งหนึ่งของการแพร่กระจายของสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อทั้งสุขภาพและระบบนิเวศน์ เนื่องจากมีการใช้สารเคมี เช่น กรด เบส สารออกซิไดซ์ หรือตัวทำละลายอินทรีย์ในการทำวิจัย การจัดการกับปัญหาดังกล่าวอย่างมีประสิทธิภาพ ควรเริ่มต้นจาก “การป้องกันที่สาเหตุ” นั่นคือ การคิดค้นหาตัวทำละลายโดยหลีกเลี่ยงการใช้ กรด หรือตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งในการทำวิจัยครั้งนี้จึงเน้นที่การหลีกเลี่ยงตัวทำละลายกรดแก่โดยใช้น้ำและเกลืออินทรีย์ที่ไม่เป็นพิษแทน ซึ่งปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานและสิ่งแวดล้อม ควบคู่ไปกับการให้ผลการเตรียมแผ่นเส้นใยที่ดี และยังคงฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อได้เพื่อเป็นการปลูกจิตสำนึกแก่นักวิจัยเองและกับนักศึกษาให้ตระหนักในหน้าที่บทบาท และความรับผิดชอบต่อสังคมและสิ่งแวดล้อม นอกจากกระบวนการเตรียมที่คำนึงถึงสิ่งแวดล้อมแล้วตัวแผ่นวัสดุปิดแผลที่เตรียมได้สามารถสลายตัวได้เอง ใช้ง่ายโดยปิดแผลครั้งเดียวโดยไม่ต้องลอกออกจึงลดปริมาณขยะติดเชื้อลงได้อีก

เอกสารอ้างอิง

1. Ramakrishna S, Fujihara K, Teo WE, et al. An Introduction to electrospinning and Nanofiber : Toh Tuck Link : Singapore: World Scientific Publishing, 2005; 1-42.
2. Zhang L, Menkhaus TJ, Fong H. Fabrication and bioseparation studies of adsorptive membranes/felts. J Membrane Science. 2008; 319ซ176–184.
3. Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, et al. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. Composites Science and Technology. 2003; 63: 2223–53.
4. Geert V, Iksoo C, Joel R, Jef P, Alex VD, Jurgen M, et al. Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. J Controlled Release. 2003;92:349-360.
5. Schulte J. Nanotechnology global strategies, industry trend and applications. Great Britain : TJ International, 2005.
6. Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: Application in drug delivery and tissue engineering. Biomaterials. 2008;29:1989-2006.
7. Rutledge GC, Fridrikh SV. Formation of fibers by electrospinning. Adv Drug Deliv Rev. 2007;59:1384–1391.
8. Zhang YZ, Su B, Venugopal J, Ramakrishna S, Lim CT. Biomimetic and bioactive nanofi brous scaffolds from electrospun composite nanofi bers. Int J Nanomed. 2007:2:623–638.
9. บทความนาโน. นาโนไฟเบอร์ (Nanofiber) ความหวังใหม่ในการซ่อมแซมเซลล์สมอง (online). Available at http://www.thai-nano.com. (August 2008).
10. Vasita R, Katti DS. Nanofibers and their applications in tissue engineering. Int J Nanomed. 2006;1(1):15–30.
11. Rho KS, Jeong L, Lee G, Seo BM, Park YJ, Hong SD, Roh S, Cho JJ, Park WH, Min BM. Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. Biomaterials. 2006;27(8):1452-1461.
12. Merrell JG, McLaughlin SW, Tie L, Laurencin CT, Chen AF, Nair LS. Curcumin Loaded Poly(epsilon-Caprolactone) Nanofibers: Diabetic Wound Dressing with Antioxidant and Anti-inflammatory Properties. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2009;36(12):1149-56.

13. Opanasopit P, Ruktanonchai U, Suwantong O, Panomsuk S, Ngawhirunpat T, Sittisombut C, Suksamran T, Supaphol P. Electrospun poly(vinyl alcohol) fiber mats as carriers for extracts from the fruit hull of mangosteen. J Cosmet Sci. 2008;59:233-242.
14. Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, et al. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. Compos Sci Technol. 2003; 63: 2223–2253.
15. Geng X, Kwon H, Jang J. Electrospinning of chitosan dissolves in concentrated acetic acid solution. Biometerials. 2005;26:5427-5432.
16. Zhang Y, Huang X, Duan B, Wu L, Li S, Yuan X. Preparation of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) membranes" Colloid polymer science. 2007;285:855-863.
17. Chen Z, Mo X and Qing F. Electrospinning of collagen-chitosan complex. Materials letters. 2007; 61: 3490-3494.
18. Desai K and Kit K. Effect of spinning temperature and blend ratios on electrospun chitosan/poly(acrylamide) blends fibers. Polymer. 2008; 49:4046-50.
19. Zhang Y, Venugopal JR, Turki AE, Ramakrishna S, Su B, Lim CT. Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering. Biomaterials. 2008; 29: 4314–4322.
20. Ignatova M, Manolova N and Rashkov I. Novel antibacterial fibers of quaternized chitosan and poly(vinyl pyrrolidone) prepared by electrospinning. Eur Polym J. 2007;43:1112–1122.
21. Neamnark A, Rujiravanit R, Supaphol P. Electrospinning of hexanoyl chitosan. Carbohyd Polym. 2006; 66: 298–305.
22. นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (3) บริษัทประชาชนจำกัด. 2542: 740-745
23. วิลาวัลย์ มหาบุษราคัม, เสาวลักษณ์ พงศ์ไพจิตร และ พิเชษฐ์ วิริยะจิตรา. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารเคมีในเปลือกมังคุด. วารสารสงขลานครินทร์ 5(4): 337-339, 2526.
24. วิลาวัลย์ มหาบุษราคัม, เสาวลักษณ์ พงศ์ไพจิตร และ พิเชษฐ์ วิริยะจิตรา. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านราของสารเคมีในเปลือกมังคุด. วารสารสงขลานครินทร์ 5(4): 341-342, 2526.

25. Mahabusarakam W., Wiriyachitra P., and Phongpaichit S. Antimicrobial activities of chemical constituents from Garcinia mangostana Linn. J. Sci. Soc. Thailand. 1985;12:239-242,
26. Iinuma M. et al. Antibacterial activity of xanthones from Guttiferaeous plants against methicillin-resistant Staphyloccus aureus. J Pharm Pharmacol. 1996;48:861-865,
27. Gopalalrishan G. Banumathi B. and Suresh G. Evaluation of the antifungal activity of natural xanthones from Garcinia mangostana and their systhetic derivatives. J Nat Prod. 1997;60:519-524.
28. Suksamrarn S, Suwannapoch N, Phakhodee W, Thanuhiranlert J, Ratananukul P, Chimnoi N, Suksamrarn A. Antimycobacterial activity of prenylated xanthones from the fruits of Garcinia mangostana. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2003;51:857-859.
29. Yoshikawa M, Harada E, Miki A, Tsukamoto K, Liang S Q, Yamahara J and Murakami N Antioxidant constituents from the fruit hulls of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) originating in Vietnam. Yakugaku Zasshi. 1994;114:129-131.
30. Williams P, Ongsakul M, Proudfoot J, Croft K, Beilin L. Mangostin inhibits the oxidative modification of human low density lipoprotein. Free. Radic Res.1995; 23:175-184.
31. Nazeemunissa B, Nazimuddin SK, Gopalakrishnan C. Shankaranarayan F, Kameswaran L. Antiulcer and antimicrobial activities of gartaninxanthone from *Garcinia mangostana*. Bull Islamic Med. 1982;2:518-521.
32. Gopalakrishnan C, Shankaranarayanan D, Kameswaran L, Nazimudeen SK. Effect of mangostin, a xanthone from Garcinia mangostana Linn. in immunopathological & inflammatory reactions. : Indian J Exp Biol.1980;18:843-846.
33. Chairungsrilerd N, Furukawa K, Ohta T, Nozoe S, Ohizumi Y. Pharmacological properties of alpha-mangostin, a novel histamine H1 receptor antagonist. Eur J Pharmacol. 1996;314:351-356.
34. Nakatani K, Nakahata N, Arakawa T, Yasuda H, Ohizumi Y. Inhibition of cyclooxygenase and prostaglandin E2 synthesis by gamma-mangostin, a xanthone derivative in mangosteen, in C6 rat glioma cells. Biochem Pharmacol. 2002;63:73-79.
35. Nakatani K, Atsumi M, Arakawa T, Oosawa K, Shimura S, Nakahata N, Ohizumi Y. Inhibitions of histamine release and prostaglandin E2 synthesis by mangosteen, a Thai medicinal plant. Biol Pharm Bull. 2002;25:1137-1141.

36. Shankaranarayan D, Gopalakrishnan C, Kameswaran L. Pharmacological profile of mangostin and its derivatives. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1979;239:257-269.
37. Zong X, et al., Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. Polymer. 2002;43:4403–4412.
38. Son WK, et al., Effect of pH on electrospinning of poly(vinyl alcohol). Materials Letters, 2005;59:1571-1575.
39. Jia YT, et al., Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method. Carbohyd Polym. 2007; 67(3):403-409.
40. Shalumon KT, et al., Electrospinning of carboxymethyl chitin/poly(vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. Carbohyd Polym. 2009; 77(4):863–869.
41. Park WH, et al. Effect of chitosan on morphology and conformation of electrospun silk fibroin nanofibers. Polymer. 2004;45:7151-7157.
42. Ignatova M, et al. Electrospun nano-fibre mats with antibacterial properties from quaternised chitosan and poly(vinyl alcohol). Carbohyd Res. 2006. 341(12):2098-2107.
43. Leung V, et al., Bioactive nanofibres for wound healing applications. J Fiber Bioengineering & Informatics. 2011;4:1-14.
44. Baskar D, Kumar TSS. Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films. Carbohyd Polym. 2009;78:767-772.
45. Meng ZX, et al., Fabrication, characterization and in vitro drug release behavior of electrospun PLGA/chitosan nanofibrous scaffold. Materials Chemistry and Physics, 2011;125:606-611.
46. Bloknina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. Annals of Botany. 2003;91:179-194.
47. Gutteridge JMC. Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. Biochemical J. 1984;224:761-767.
48. Cheng Z, et al. Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl radical and phenolic compounds by qualitative structure and activity relationship. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2002;10:4067-4073.
49. Xing R, et al., Antioxidant activity of differently regioselective chitosan sulfates in vitro. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2005;13:1387–1392.

50. Zhong Z, et al., The preparation and antioxidant activity of the sulfanilamide derivatives of chitosan and chitosan sulfates. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007;15:3775-3782.
51. Xie Y, Liu X, Chen Q. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity. Carbohyd Polym. 2007;69:142-147.
52. El-Sharif AA, Hussain MHM. Chitosan–EDTA new combination is a promising candidate for treatment of bacterial and fungal infections. Current Microbiology. 2011;62:739–745.
53. Li Y, et al., Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. Carbohyd Polym. 2007;67:227-232.
54. Helander IM, et al., Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Int J Food Microbiol. 2001;71:235-244.
55. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial action of chitosan. Food Biotechnology. 1992;6:257–272.
56. Rabea EI, et al., Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. Biomacromolecules, 2003;4:1457–1465.
57. Xing K, et al. Effect of oleoyl-chitosan nanoparticles as a novel antibacterial dispersion system on viability, membrane permeability and cell morphology of Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Carbohyd Polym. 2009;76:17-22.
58. Xing K, et al. Oleoyl-chitosan nanoparticles inhibits Escherichia coli and Staphylococcus aureus by damaging the cell membrane and putative binding to extracellular or intracellular targets. Int J Food Microbiol. 2009;132:127-133.
59. Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. Carbohyd Polym. 2009;76:167-182.
60. Chen JP, Chang GY, Chen JK. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 2008;313–314:183–188.
61. Pothitirat W, et al. 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;80:442-447.
62. Sakagami Y, et al. Antibacterial activity of a-mangostin against vancomycin resistant Enterococci (VRE) and synergism with antibiotics. Phytomedicine. 2005; 12:203-208.

63. Opanasopit P, et al. Electrospun poly(vinyl alcohol) fiber mats as carriers for extracts from the fruit hull of mangosteen. J cosmetic science. 2008; 59:233-242.
64. Charernsriwilaiwat, N., et al., Lysozyme-loaded, electrospun chitosan-based nanofiber mats for wound healing. Int J Pharm. 2012;427:379-384.
65. Ghazali SAISM, Lian GEC., Ghani KDA. Chemical constituent from roots of Garcinia Mangostana (Linn.). Int J Chem. 2010;2:134-142.
66. Kim TG, Lee DS, Park TG. Controlled protein release from electrospun biodegradable fiber mesh composed of poly(e-caprolactone) and poly(ethylene oxide). Int J Pharm. 2007;338:276-283.
67. Taepaiboon P, Rungsardthong U, Supaphol P, Drug-loaded electrospun mats of poly(vinyl alcohol) fibres and their release characteristics of four model drugs. Nanotechnology. 2006;17:2317-2329.
68. Sundaram BM, et al. Antimicrobial activities of Garcinia mangostana. Planta Medica. 1983;48:59-60.
69. Palakawong C, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) parts and some essential oils. Int Food Res J. 2010;17:538-589.
70. Chomnawang MT, et al. Antibacterial activity of thai medicinal plants against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Fitoterapia. 2009;80:102-104.
71. Pedraza-Chaverri J, et al. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). Food Chem Toxicol. 2008;46:3227-3239.
72. Paul W, Sharma CP. Chitosan and alginate wound dressings: A short review. Trends in Biomaterials & Artificial Organs. 2004;18(1):18-23.
73. Jayakumar R, et al. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. Biotechnology Advances. 2011;29:322-337.
74. Liu X, et al. In vivo wound healing and antibacterial performances of electrospun nanofibre membranes. J biomed mater Res A. 2010;94A(2):499-508.
75. Yodhnu S, Sirikatitham A, Wattanapiromsakul C. Validation of LC for the determination of α-mangostin in mangosteen peel extract: A tool for quality assessment of *Garcinia mangostana* L. J Chromatogr Sci. 2009;47:185-189.
76. Pothitirat W, et al. Biological and chemical stability of mangosteen fruit rind extract. Funct Plant Sci Biotechnol. 2009;3:16-18.

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1. Natthan Charernsriwilaiwat, Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata and Tanasait Ngawhirunpat Fabrication and characterization of chitosan-ethylenediaminetetraacetic acid/polyvinyl alcohol blend electrospun nanofibers. **Advanced Materials Research**.194-196 (2011) 648-651.
2. Natthan Charernsriwilaiwat, Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata and Tanasait Ngawhirunpat. In vitro antioxidant activities of chitosan aqueous solution: effect of salt form. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. (2012) 11 (2): 235-242 (2013:IF 3.458).
3. Natthan Charernsriwilaiwat, Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata, Tanasait, Ngawhirunpat. Lysozyme-loaded, electrospun chitosan-based nanofiber mats for wound healing. **Int. J. Pharm**. (2012) 427; 379– 384. (2013:IF 3.458).
4. N. Charernsriwilaiwat, P. Opanasopit, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat. Preparation of chitosan-thiamine pyrpphosphate/polyvinyl alcohol blend electrospun nanofibers. **Advanced Materials Research**. 506 (2012) pp 118-121.
5. Natthan Charernsriwilaiwat, Theerasak Rojanarata, Tanasait Ngawhirunpat, Monrudee Sukma and Praneet Opanasopit. Electrospun chitosan—based nanofiber mats loaded with Garcinia mangostana extracts. **Int J Pharm**. 2013. Aug.452; 333– 343 (2013:IF 3.458).
6. Natthan Charernsriwilaiwat, Theerasak Rojanarata, Tanasait Ngawhirunpat and Praneet Opanasopit. Electrospun chitosan/polyvinyl alcohol nanofiber mats for wound healing. **International Wound Journal**. 2014; 11:215–222. (2013:IF 1.6).

ผลงานวิจัยที่เสนอผลงานในระดับชาติและระดับนานาชาติ

1. Natthan Charernsriwilaiwat, Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata and Tanasait Ngawhirunpat “Fabrication and characterization of chitosan-ethylenediaminetetraacetic acid/polyvinyl alcohol blend electrospun nanofibers” The 2nd International conference Manufacturing Science and Engineering, 9-11 April 2011, Guilin, China, Poster Presentation.
2. N. Charernsriwilaiwat, P. Opanasopit, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat

Preparation of chitosan-thiamine pyrpphosphate/polyvinyl alcohol blend electrospun nanofibers. Chiang Mai International Conference on Biomaterials & Applications, 9-10 August 2011, Chiang Mai, Thailand, Oral Presentation.

3. Praneet Opanasopit, Natthan Charernsriwilaiwat, Theerasak Rojanarata and Tanasait Ngawhirunpat. Electrospinning of chitosan based nanofiber mats as carriers for extract from the fruit hull of mangosteen. 12th Eurasia Conference on Chemical Sciences, 16 – 21 April 2012, Corfu – Greece. (Poster Presentation)
4. Natthan Charernsriwilaiwat, Theerasak Rojanarata, Tanasait Ngawhirunpat and Praneet Opanasopit. “Antibacterial *Garcinia mangostana* extracts-loaded electrospun chitosan-based nanofiber patches for wound dressing materials” The 15th Asian Chemical Congress, 19-23 August 2013, Resorts World Sentosa, Singapore. (Poster Presentation).
5. Praneet Opanasopit, Natthan Charernsriwilaiwat, Theerasak Rojanarata, Tanasait Ngawhirunpat. Development of chitosan/polyvinyl alcohol nanofiber mats for wound dressing material. 10th International Conference of the Asian Pacific Chitin Chitosan Symposium, 4-8 October 2013, Yonago convention center “BIGSHIP”, Yonago, Japan. (Poster Presentation)

ภาคผนวก

1. Standard curve

Standard: α-mangostin

Method: High performance liquid chromatography (HPLC)

Wavelength: 320 nm

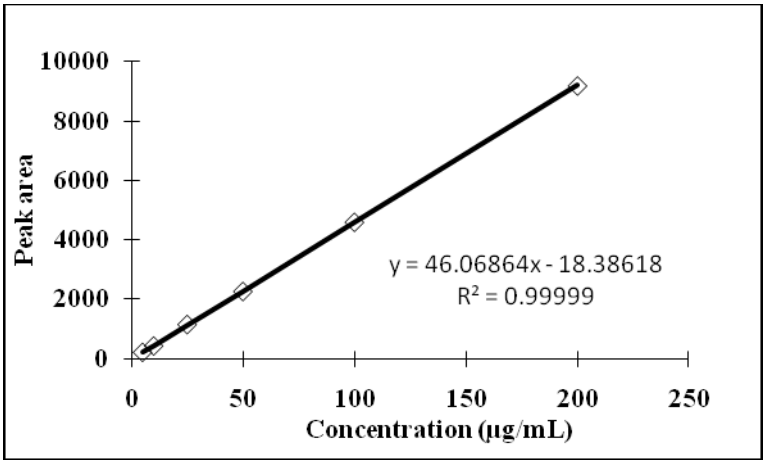


Figure 1 Standard curve of α-mangostin.

Standard: Gallic acid

Method: UV spectrophotometer

Wavelength: 765 nm

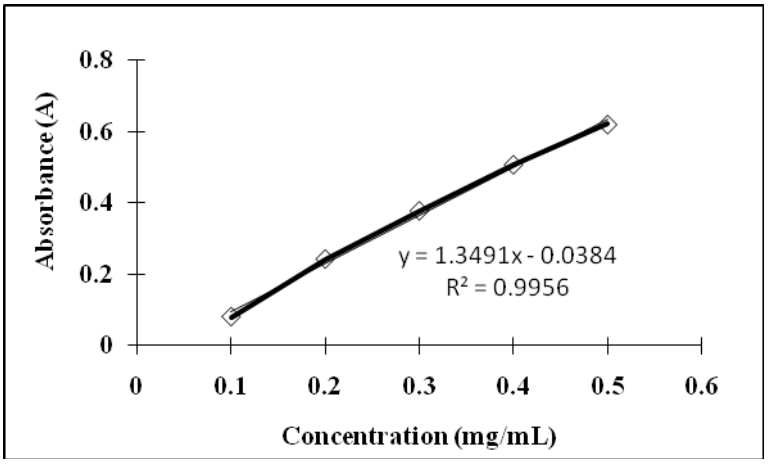


Figure 2 Standard curve of gallic acid.

Standard: Tannic acid

Method: UV spectrophotometer

Wavelength: 510 nm

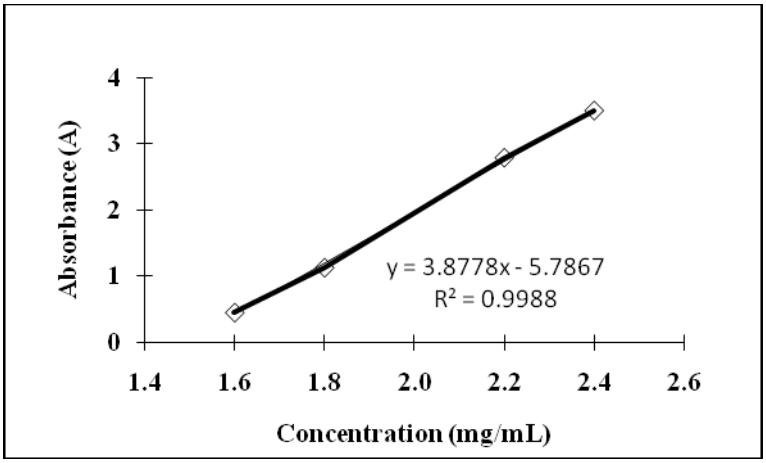


Figure 3 Standard curve of tannic acid.

Standard: FRAP ($FeSO_4$)

Method: UV spectrophotometer

Wavelength: 510 nm

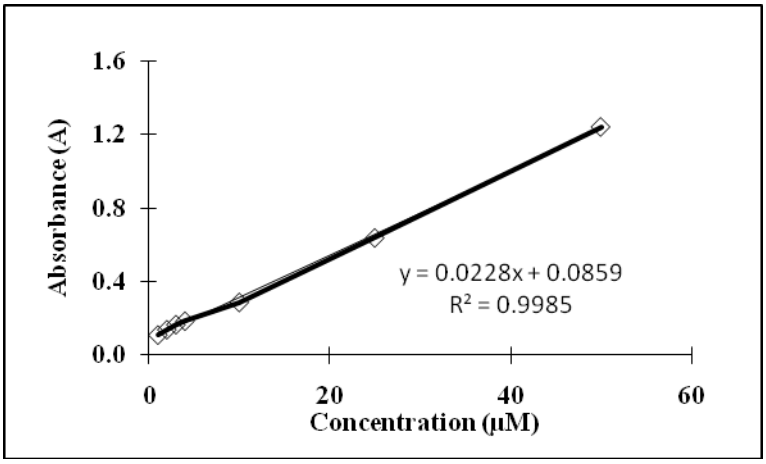


Figure 4 Standard curve of $FeSO_4$.

Standard: *S. aureus*

Method:UV spectrophotometer

Wavelength: 550 nm

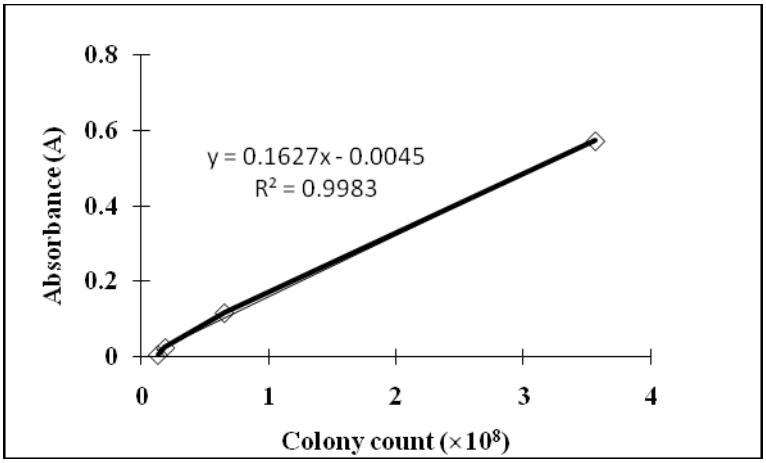


Figure 5 Standard curve of *S.aureus.*

Standard: *E.coli*

Method:UV spectrophotometer

Wavelength: 550 nm

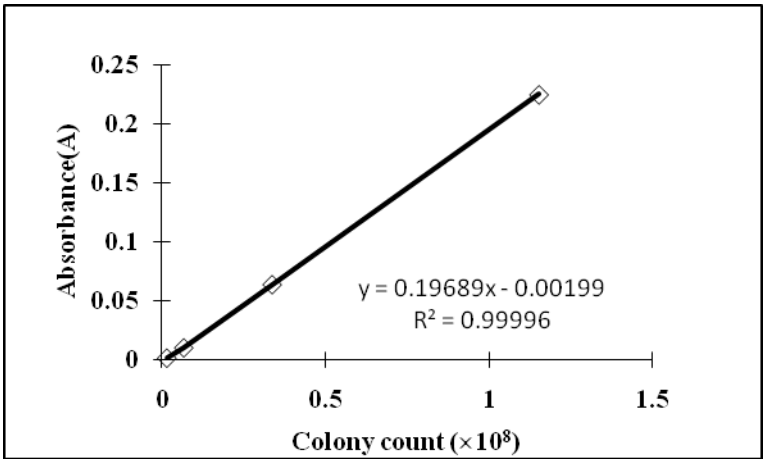


Figure 6 Standard curve of *E.coli*.

2. High performance liquid chromatography (HPLC) condition

Column - 250×4.6 mm C18

Flow rate - 1.00 ml/min

Injection volume - 20 µL

Detector - UV–vis detector

Wavelength - 320 nm

Mobile phase - acetonitrile และ 0.1% v/v ortho-phosphoric acid

Table 1 Volume ratios of acetonitrile and 0.1% v/v ortho-phosphoric acid use as a mobile phase for HPLC of α-mangostin at different time interval.

Time (min)	Acetonitrile	0.1%v/v Ortho-phosphoric acid
0	70%	30%
15	70%	30%
18	75%	25%
19	80%	20%
25	80%	20%
26	70%	30%
30	70%	30%

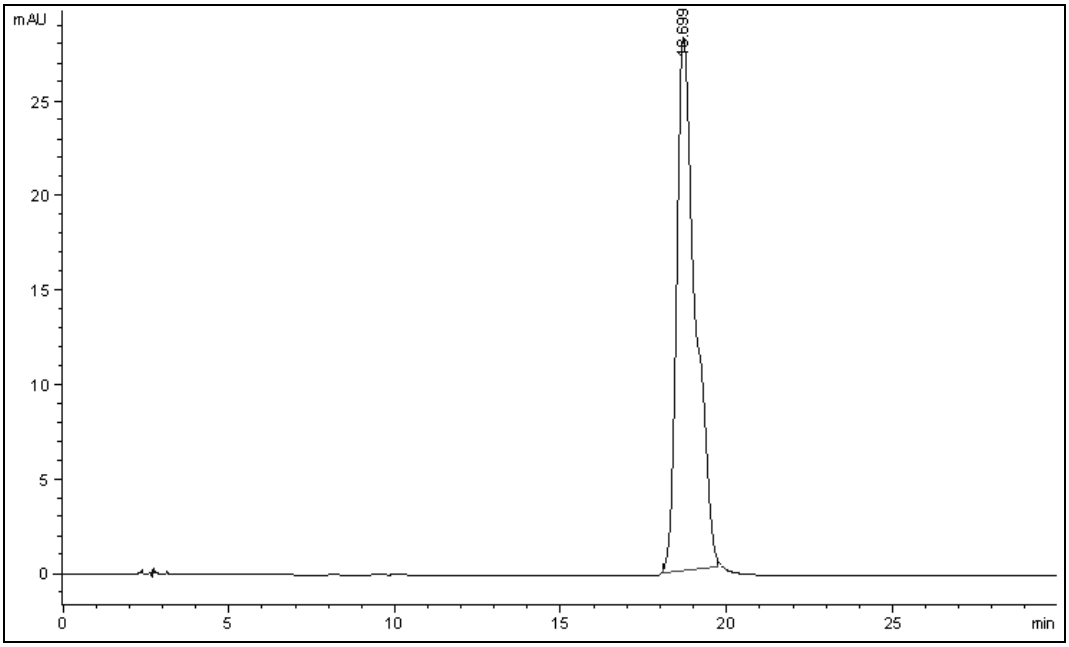


Figure 7 Chromatogram of standard α-mangostin.

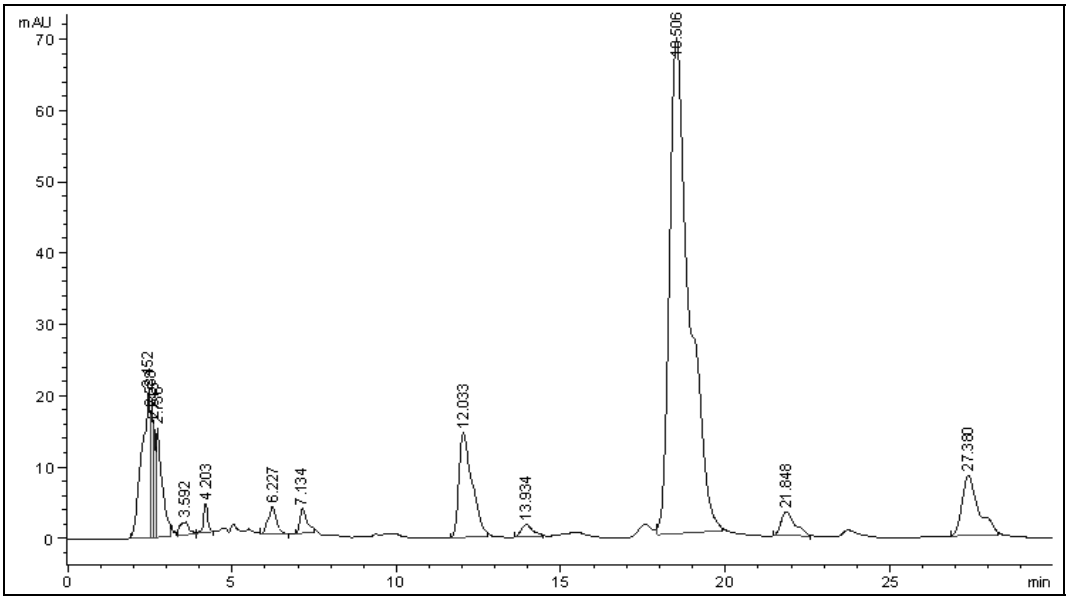
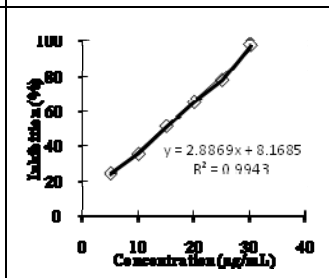
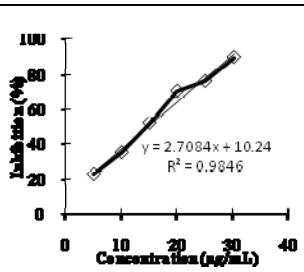
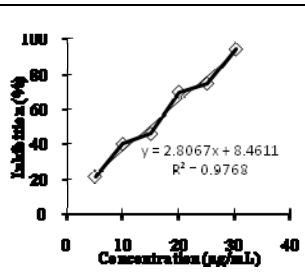
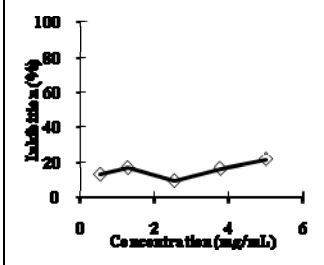
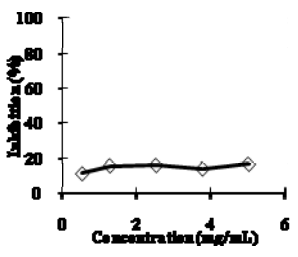
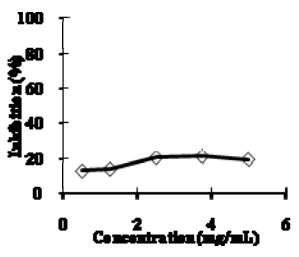
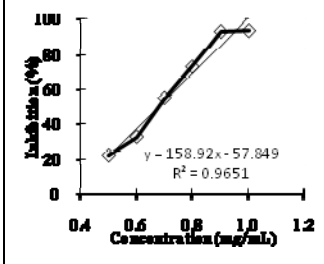
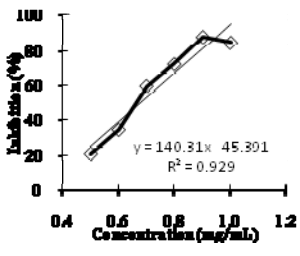
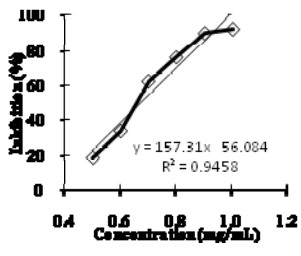
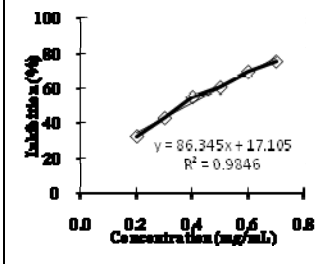
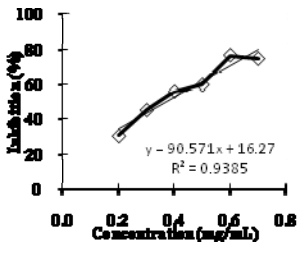
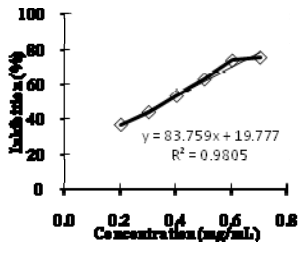
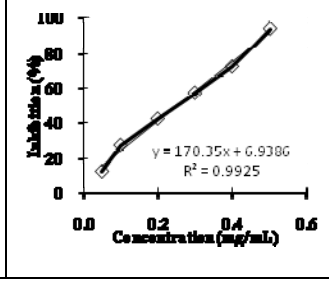
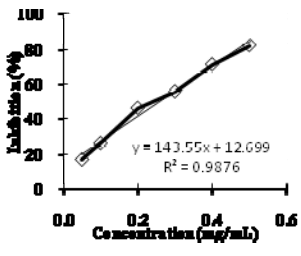
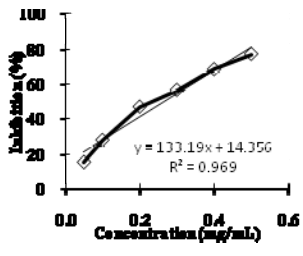


Figure 8 Chromatogram of GM extracts.

3. Determination of antioxidant activities (IC_{50})

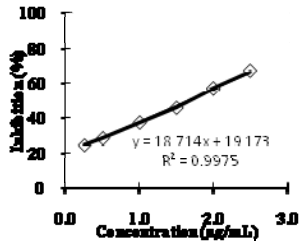
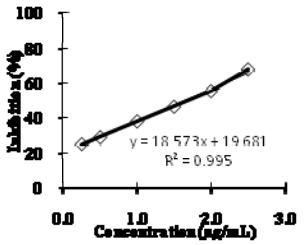
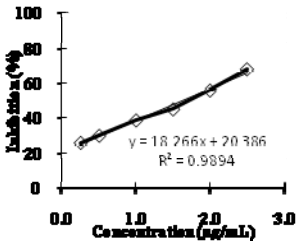
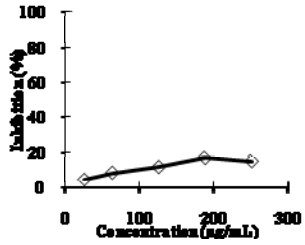
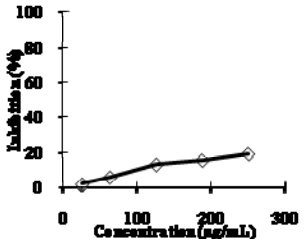
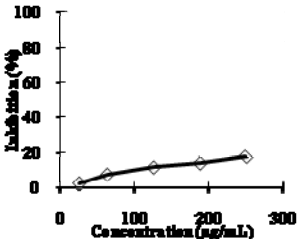
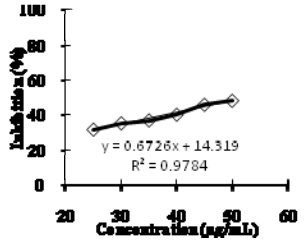
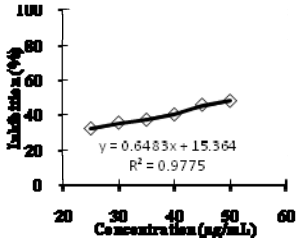
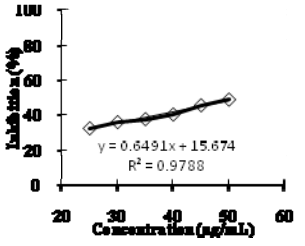
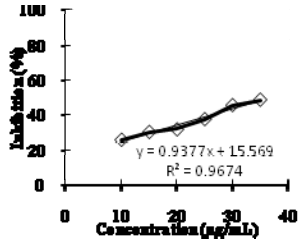
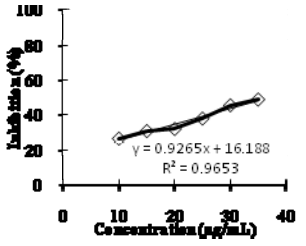
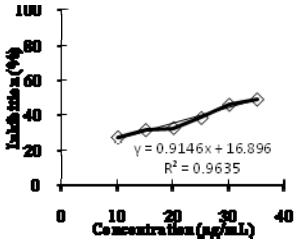
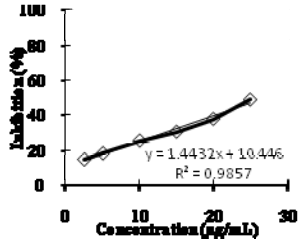
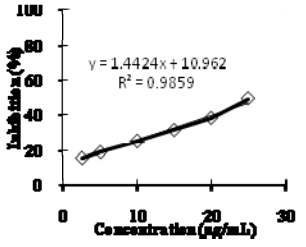
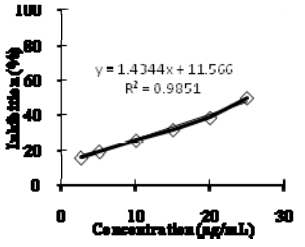
DPPH assay

Table 2 The antioxidant activity of GM extracts and GM extract loaded CS-EDTA/PVA nanofiber patches 0, 1, 2 and 3%wt α-mangostin to polymer on DPPH assay.

	n = 1	n = 2	n = 3
GM extracts			
0% wt α-mangostin			
1% wt α-mangostin			
2% wt α-mangostin			
3% wt α-mangostin			

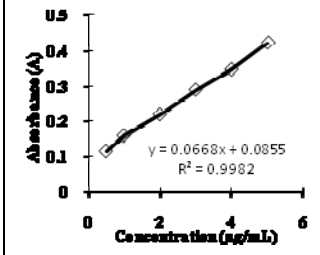
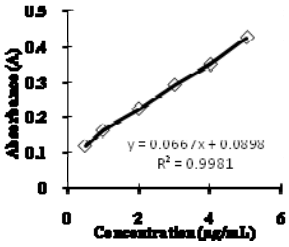
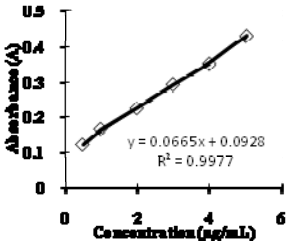
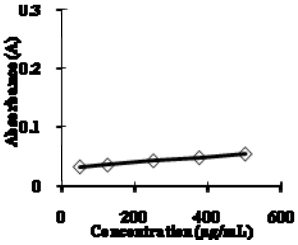
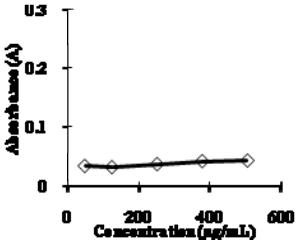
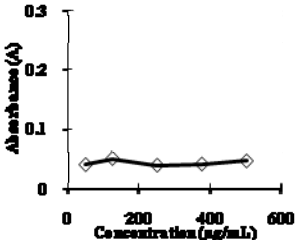
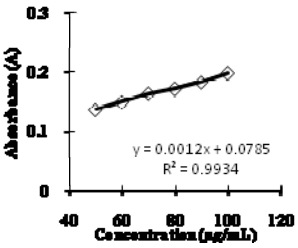
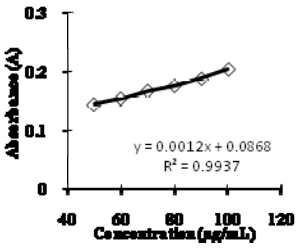
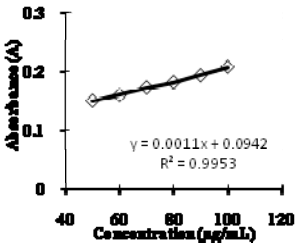
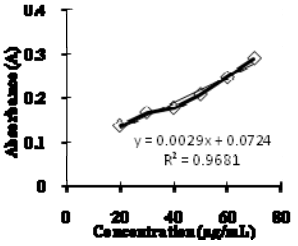
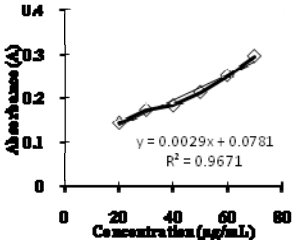
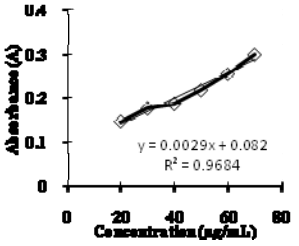
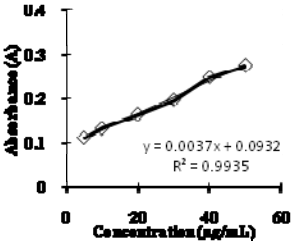
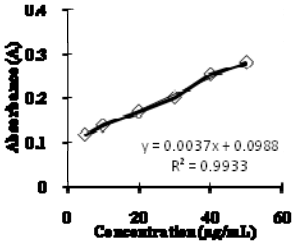
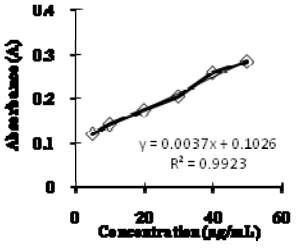
ABTS assay

Table 3 The antioxidant activity of GM extracts and GM extract loaded CS-EDTA/PVA nanofiber patches 0, 1, 2 and 3%wt α-mangostin to polymer on ABTS assay.

	n=1	n=2	n=3
GM extracts			
0% wt α-mangostin			
1% wt α-mangostin			
2% wt α-mangostin			
3% wt α-mangostin			

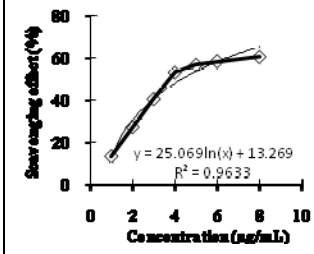
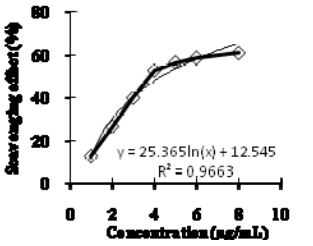
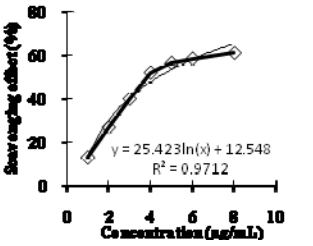
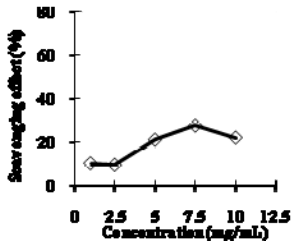
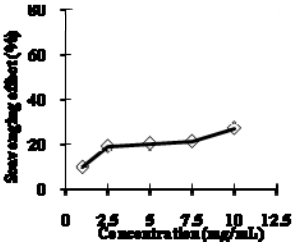
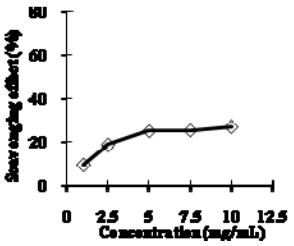
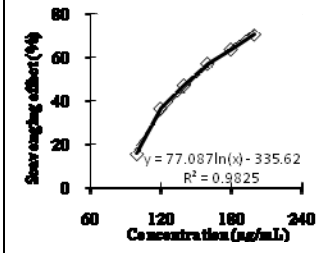
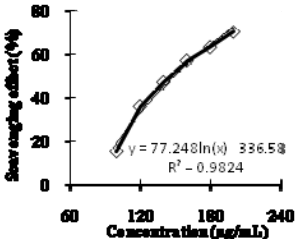
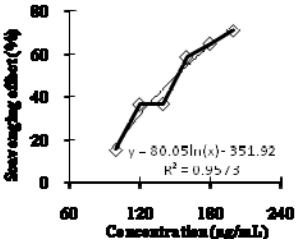
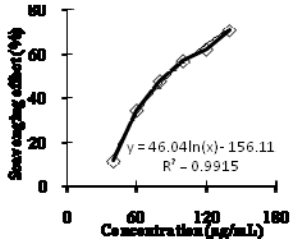
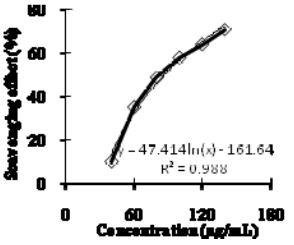
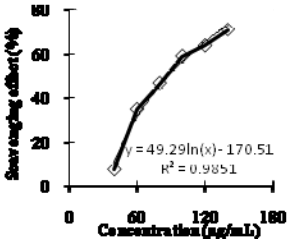
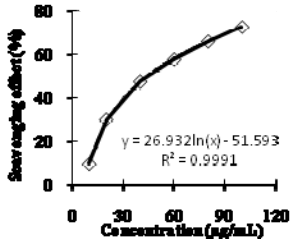
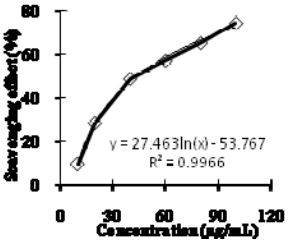
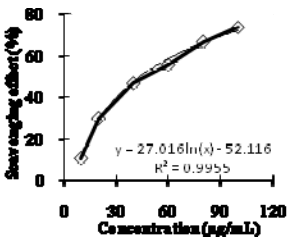
FRAP assay

Table 4 The antioxidant activity of GM extracts and GM extract loaded CS-EDTA/PVA nanofiber patches 0, 1, 2 and 3%wt α-mangostin to polymer on FRAP assay.

	n =1	n=2	n=3
GM extracts			
0% wt α-mangostin			
1% wt α-mangostin			
2% wt α-mangostin			
3% wt α-mangostin			

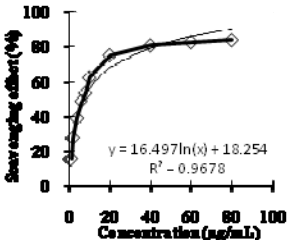
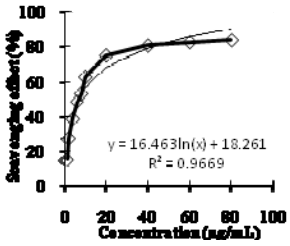
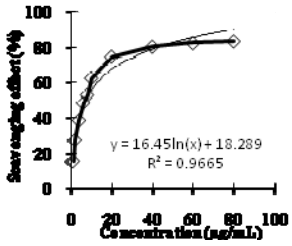
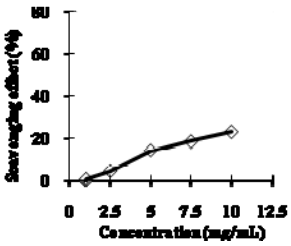
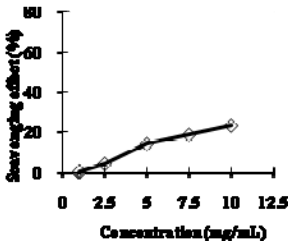
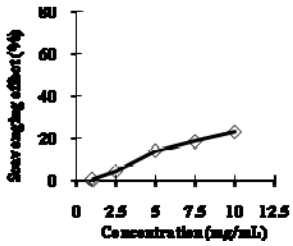
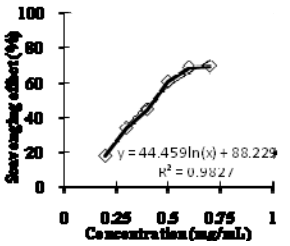
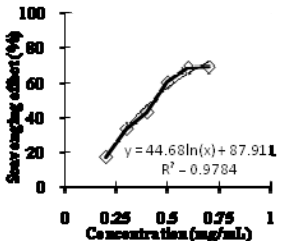
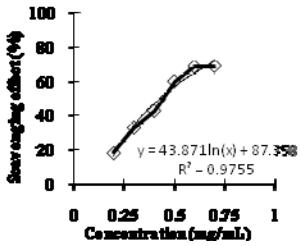
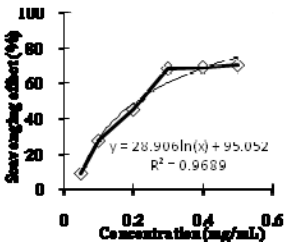
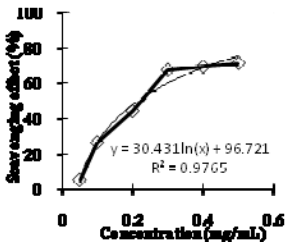
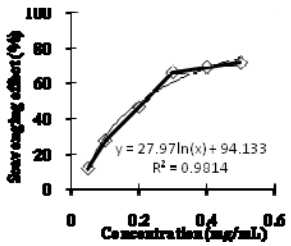
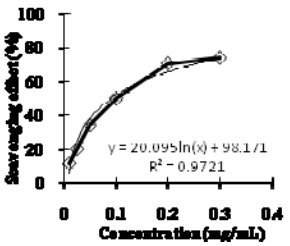
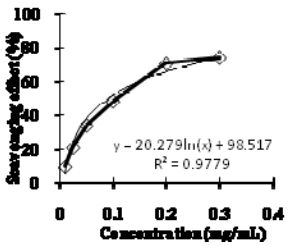
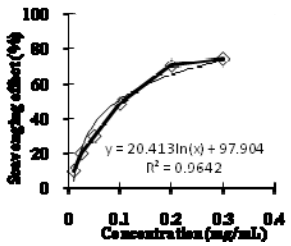
Superoxide radical scavenging assay

Table 5 The antioxidant activity of GM extracts and GM extract loaded CS-EDTA/PVA nanofiber patches 0, 1, 2 and 3%wt α-mangostin to polymer on superoxide radical scavenging assay.

	n=1	n=2	n=3
GM extracts			
0% wt α-mangostin			
1% wt α-mangostin			
2% wt α-mangostin			
3%wt α-mangostin			

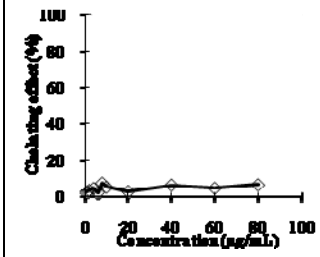
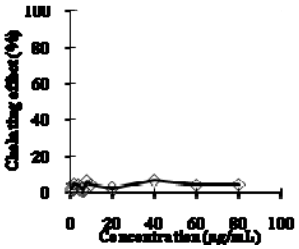
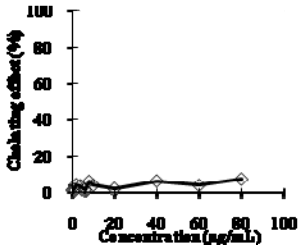
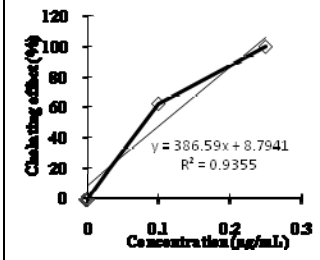
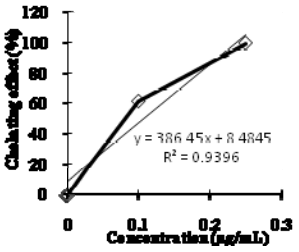
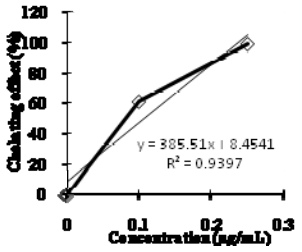
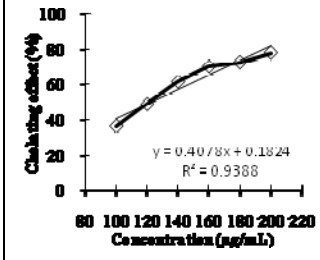
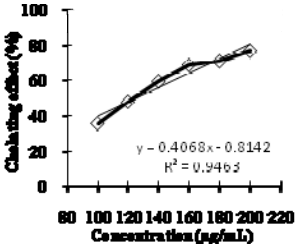
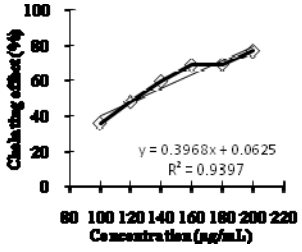
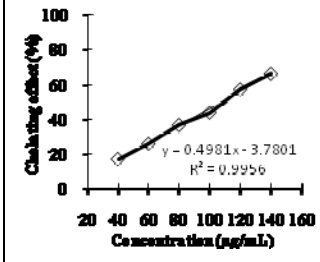
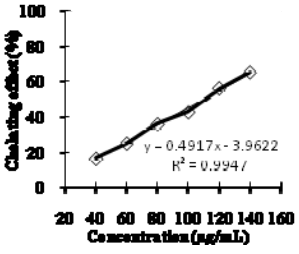
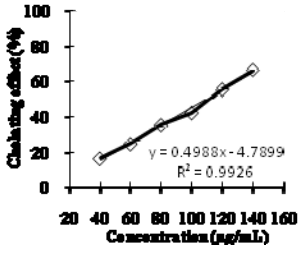
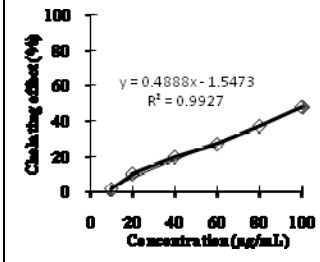
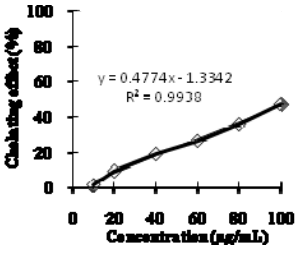
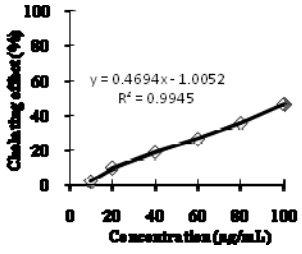
Hydroxyl radical scavenging assay

Table 6 The antioxidant activity of GM extracts and GM extract loaded CS-EDTA/PVA nanofiber patches 0, 1, 2 and 3%wt α-mangostin to polymer on hydroxyl radical scavenging assay.

	n=1	n=2	n=3
GM extracts			
0%wt α-mangostin			
1%wt α-mangostin			
2%wt α-mangostin			
3%wt α-mangostin			

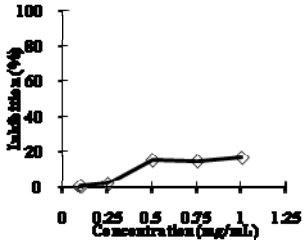
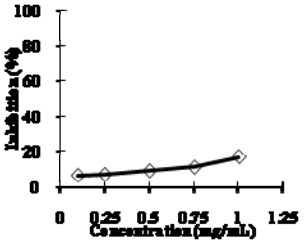
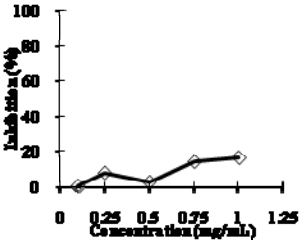
Metal ion chelating assay

Table 7 The antioxidant activity of GM extracts and GM extract loaded CS-EDTA/PVA nanofiber patches 0, 1, 2 and 3%wt α-mangostin to polymer on metal ion chelating assay.

	n=1	n=2	n=3
GM extracts			
0%wt α-mangostin			
1%wt α-mangostin			
2%wt α-mangotin			
3%wt α-mangostin			

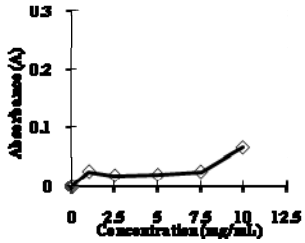
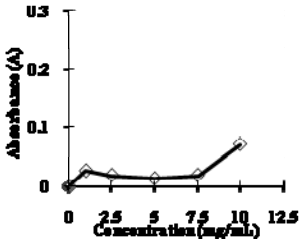
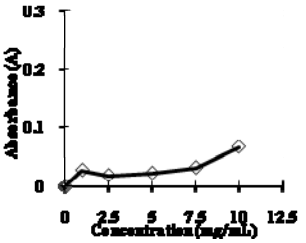
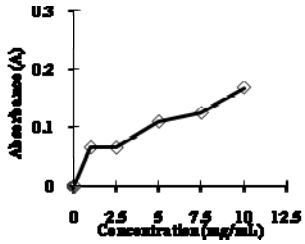
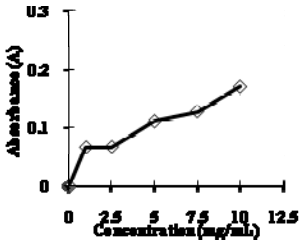
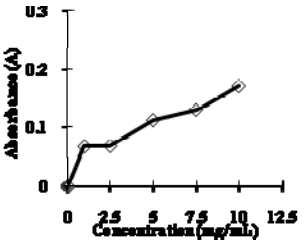
Galvinoxyl radical scavenging assay

Table 8 The antioxidant activity of GM extracts on galvinoxyl radical scavenging assay.

	n=1	n=2	n=3
GM extracts			

Reducing power

Table 9 The antioxidant activity of GM extracts and the CS-EDTA/PVA nanofiber patches on reducing power.

	n=1	n=2	n=3
GM extracts			
0%wt α-mangostin			

4. Release Data

Table 10 Cumulative release (%) of α-mangostin release from 1%wt α-mangostin loaded CS-EDTA/PVA nanofiber patches.

Time (min)	% Cumulative release			Average	SD
	n=1	n=2	n=3		
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
5	45.2887	42.9629	47.5391	45.2636	2.2882
10	54.3648	49.8676	56.3619	53.5314	3.3264
15	62.6332	59.3416	66.3566	62.7771	3.5097
30	69.7740	67.1740	74.2912	70.4131	3.6014
60	76.3278	75.2027	80.6790	77.4032	2.8922
120	84.8394	84.3110	87.7905	85.6470	1.8751
240	90.5160	90.1081	93.8764	91.5002	2.0680
480	94.0960	87.0803	91.1671	90.7811	3.5237

Table 11 Cumulative release (%) of α-mangostin release from 2%wt α-mangostin loaded CS-EDTA/PVA nanofiber patches.

Time (min)	% Cumulative release			Average	SD
	n=1	n=2	n=3		
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
5	41.5367	43.8174	45.7940	43.7160	2.1305
10	64.5453	66.3977	61.6907	64.2112	2.3712
15	64.2275	72.6896	70.7178	69.2116	4.4275
30	73.4592	78.3815	77.4794	76.4400	2.6206
60	79.1578	83.2691	83.3841	81.9370	2.4075
120	86.6183	88.5987	91.6371	88.9514	2.5279
240	90.3659	93.8127	94.5849	92.9212	2.2464
480	90.7948	93.6010	92.2495	92.2151	1.4034

Table 12 Cumulative release (%) of α-mangostin release from 3%wt α-mangostin loaded CS-EDTA/PVA nanofiber patches.

Time (min)	% Cumulative release			Average	SD
	n=1	n=2	n=3		
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
5	45.1675	40.2889	35.8703	40.4422	4.6505
10	65.1712	65.0061	61.6030	63.9268	2.0141
15	75.0268	74.9351	61.6030	70.5216	7.7239
30	80.7209	80.8410	73.3604	78.3074	4.2847
60	84.6832	83.8817	78.9364	82.5004	3.1124
120	89.2980	87.1310	84.8849	87.1046	2.2067
240	93.0874	91.7425	88.6078	91.1459	2.2986
480	92.5920	92.3833	88.6200	91.1984	2.2354

Advanced Materials Research Vols. 194-196 (2011) pp 648-651
© (2011) Trans Tech Publications, Switzerland
doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.194-196.648

click for feedback
consult - comment - contact

Fabrication and Characterization of Chitosan-Ethylenediaminetetraacetic Acid/Polyvinyl Alcohol Blend Electrospun Nanofibers

Natthan Charernsriwilaiwat, Praneet Opanasopit[a], Theerasak Rojanarata and Tanasait Ngawhirunpat

Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand

[a]praneet@su.ac.th

Keywords: Chitosan; Electrospinning; Ethylenediaminetetraacetic Acid

Abstract

Electrospinning is a technique use to fabricate ultrafine fibers with diameters in the nanometer range. The electrospun fiber mats have high potentials for many applications, due to their high surface area to volume, high porosity and small pore size. In this study, chitosan-ethylenediaminetetraacetic acid (CS-EDTA)/polyvinyl alcohol (PVA) blend nanofibers were successfully prepared using electrospinning techniques without organic solvent. CS was dissolved in EDTA aqueous solution and then blended with PVA solution at various weight ratios. Physicochemical properties of CS-EDTA/PVA solution such as viscosity, conductivity and surface tension were investigated. The morphology and diameter of the electrospun fiber mats were analyzed by using scanning electron microscopy (SEM). The composite structure was characterized by differential scanning calorimetry (DSC) and fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). SEM images showed that the morphology and diameter of the nanofibers were mainly affected by the weight ratio of the blend. Nanofibers were obtained when the CS-EDTA content was less than 50%wt. The average diameter of the nanofibers was 119-223 nm, and this average diameter decreased with increasing CS-EDTA content. In summary, these CS electrospun nanofiber mats may be proper for the drug delivery or wound dressing application.

Introduction

In recent years, the development of electrospinning techniques has been increasingly investigated. The fibers produced by this method have shown excellent characteristics, such as a very large surface-to-volume ratio and a high porosity with a small pore size [1]. In the electrospinning process, high voltage is applied to a capillary containing a polymer solution or the molten polymer. A droplet of the polymer solution then forms at the tip of the capillary, creating a point known as the "Taylor cone." As electrostatic forces overcome the surface tension of the polymer solution, the solution is ejected from the apex of Taylor cone. The charged jets of polymer solution move towards a collector, solvent rapid evaporates and non-woven fiber mat was collected on the collector. Many varieties of polymer nanofibers have been prepared by electrospinning techniques, such as polyvinyl alcohol (PVA), poly lactic acid (PLA), collagen, DNA, etc. Because of this versatility, electrospun nanofibers have been applied to many fields, including filtration, biomedical sciences, optical sensor fields etc [2]. Recently, CS nanofibers have been successfully fabricated from the electrospinning of pure CS, CS derivatives and CS blend with others polymer. However, some organic solvents or acids, such as 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), trifluoroacetic acid (TFA) and acetic acid, must be residued in chitosan nanofibers. The toxic organic solvents or acids in electrospun nanofiber mats are harmful when applied to wounded human skin or tissue [3].

In this study, electrospinning was used to prepare nanofiber mats from a CS-EDTA aqueous solution. The aim of this study was to eliminate the toxicity of organic solvent from CS solvent. In a preliminary study, we attempted to use electrospinning to prepare a nanofiber mat from pure

consult comment contact
click for feedback

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 TTP, www.ttp.net. (ID: 202.44.135.34-04/02/11,03:02:11)

click for feedback
consult - comment - contact

CS-EDTA solution with no production. Therefore, we added poly(vinyl alcohol) (PVA) to the CS-EDTA solution as a blend polymer in the different weight ratio. PVA is a water-soluble, non-toxic, biodegradable and biocompatible polymer with enhanced fiber-forming ability, and it is therefore well-suited as a guest polymer in blends with CS [4]. The morphology and structure of nanofiber mats were characterized, and the effects of the viscosity, conductivity and surface tension of the electrospun solution on the morphology of CS-EDTA/PVA nanofiber mats were investigated. The composite of the CS-EDTA/PVA nanofiber mats was characterized by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and differential scanning calorimetry (DSC).

Materials and Methods

Chitosan (high molecular weight) and ethylenediaminetetraacetic acid were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company, USA. Polyvinyl alcohol (PVA) (degree of polymerization ≈ 1600, degree of hydrolysis ≈ 97.5-99.5 mol%) was purchased from Fluka, Switzerland. The 2% (w/v) CS solution was prepared by dissolving CS and EDTA in distilled water at a weight ratio of 1:0.5. The 10% (w/v) PVA solution was prepared by dissolving PVA in distilled water at 80°C and then allowing the solution to stir for 4 h. The 2% CS-EDTA solution was mixed with a 10% PVA solution at weight ratios of 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 60/40, 70/30, 80/20 and 90/10. The conductivity of the electrospinning solutions were measured using a EUTECH ECtestr11^{+} conductivity meter. The solutions viscosity were measured using a Brookfield viscometer. The surface tension of the electrospinning solution were measured using a Drop shape analyzer. The polymer solution was placed in a 5-mL glass syringe connected with a 20-gauge, stainless steel needle (diameter = 0.9 mm) at the nozzle. The needle was connected to the emitting electrode of positive polarity of a Gamma High Voltage Research device. The electric potential was fixed at 15 kV. The nanofibers were collected as-spun on an aluminum sheet that was wrapped on a rotating collector. The solution was electrospun at room temperature, and the collection distance was fixed at approximately 20 cm. The solution feed was driven by syringe pump that was controlled to about 0.25 mL h^{-1}. Morphology of CS-EDTA/PVA nanofiber mats were observed by scanning electron microscope (SEM). The thermal behavior of the electrospun fibers were studied by differential scanning calorimetry (DSC). FT-IR spectra of electrospun fibers were collected by fourier transform infrared spectrophotometer in the wave number range of 400-4000 cm^{-1}.

Results and Discussion

The effect of viscosity, conductivity and surface tension on the diameters of the CS-EDTA/ PVA at different weight ratio are shown in Table 1.The viscosities of the CS-EDTA/PVA blend solutions decreased from 511 ± 3.46 to 181 ± 0.68 cP when the CS-EDTA content was increased from 10 to 50% wt. When the viscosity of the solution decreased, the diameter of the nanofiber mats decreased and beads formed in mats. The conductivities and surface tensions of the CS-EDTA/PVA blend solutions slightly increased from 1012 ± 2.51 to 1037 ± 1.53 μS cm^{-1} and from 46.7 ± 0.36 to 52.1 ± 1.77 mN m^{-1} when increasing the CS-EDTA content of the blend from 10 to 50% wt.

Table 1. Physiochemical properties of CS-EDTA/PVA at different weight ratio and fibers diameter

CS-EDTA/PVA weight ratio	Viscosity (cP)	Conductivity (μS cm^{-1})	Surface tension (mN m^{-1})	Diameter (nm)
10/90	511 ± 3.46	1012 ± 2.51	46.7 ± 0.36	228 ± 26
20/80	387 ± 1.31	1014 ± 3.05	48.5 ± 0.31	194 ± 27
30/70	295 ± 0.76	1022 ± 3.78	49.9 ± 0.38	176 ± 27
40/60	224 ± 1.31	1032 ± 3.61	51.4 ± 0.83	153 ± 25
50/50	181 ± 0.68	1037 ± 1.53	52.1 ± 1.77	119 ± 23

consult comment contact
click for feedback

Decreasing of fibers diameter when CS-EDTA content increased were mainly roled by viscosity of solutions. Fig 1 shows the SEM images of nanofiber mats with different CS-EDTA/PVA weight ratios of 10/90, 20/80, 30/70, 40/60 and 50/50. When the content of CS-EDTA was increased from 10 to 50% wt, the average diameter of the nanofibers decreased from 228 ± 26 to 119 ± 23 nm. The diameter distribution of the nanofiber mats is shown in Fig. 1. This result is similar to previous studies of CS-HOBt/PVA blend nanofiber membranes [3]; the diameter gradually decreased with increasing CS-EDTA amount in the blend, and more beads were observed in the composite. The beads in mats observed when the content of CS-EDTA in the blended solution increased to 40% wt (Fig. 1d). When the CS-EDTA content was more than 60% wt, fibers could not form a jet during the electrospinning process. A similar result was previously reported [3]. This indicated that the repulsive forces between ionic groups in the CS backbone obstructed the formation of continuous fiber during electrospinning.

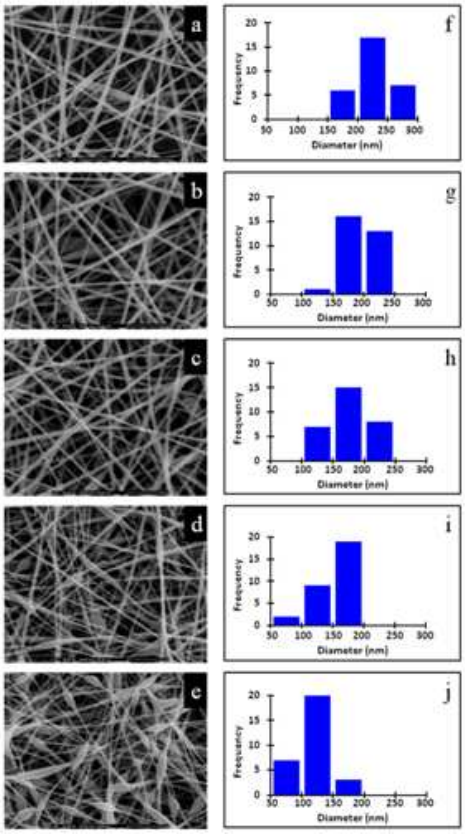


Fig 1. SEM images and diameter distribution of nanofiber mats with different weight ratios of CS-EDTA/PVA: (a,f) 10/90 (b,g) 20/80 (c,h) 30/70 (d,i) 40/60 (e,j) 50/50.

The FT-IR spectra of nanofiber mats of CS-EDTA/PVA weight ratios 50/50 with PVA nanofiber mats and pure chitosan powder shows in Fig 2. The PVA nanofiber mats' spectrum represented the remarkable absorption peaks at 3360, 2940, 1430 and 1095 cm^{-1}, which were attributed to the ν (O-H), ν_s (CH_2), δ (CH-O-H) and ν (C-O), respectively [4]. CS-EDTA/PVA nanofiber mats also exhibited the same peaks as those found in the PVA nanofiber mats and found the peak at 1655 cm^{-1}, the ν(C=O) of a primary amide [5], same as in the CS powder spectrum. The results indicated that CS-EDTA and PVA were molecularly dispersed in nanofiber mats [4].

Fig 3. shows the DSC thermograms of the nanofiber mats of different weight ratio blends of CS-EDTA/PVA. The endothermic curves of all of the nanofiber mats were obtuse and broad, illusitating that the crystalline structure could not be developed well in mats. The results show that when the amount of CS-EDTA in the blend increased, the endothermic peak decreased. This indicated that the CS-EDTA content in the blend resulted in less suitable conditions for the crystallization of the nanofiber mats [4].

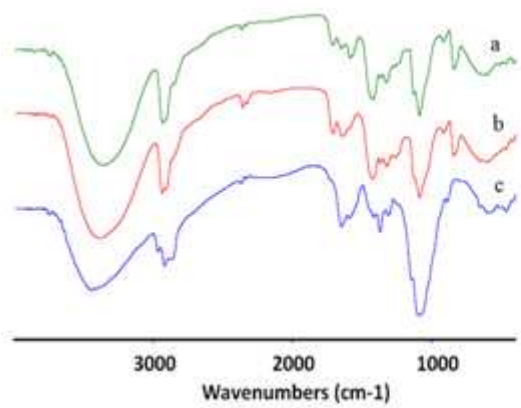


Fig 2. FT-IR spectra of (a) PVA nanofibers, (b) 50/50 CS-EDTA/PVA nanofiber and (c) chitosan powder

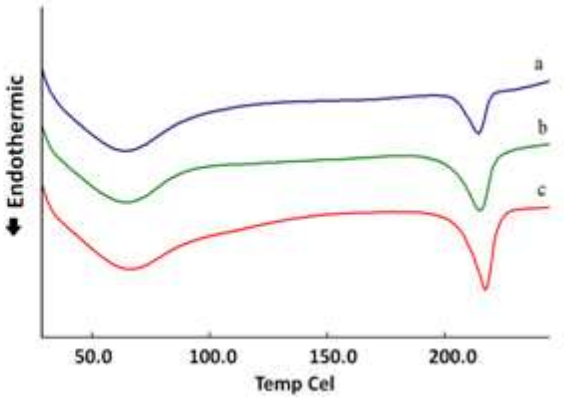


Fig 3. DSC thermograms of the nanofiber with different weight ratios of CS-EDTA /PVA (a) 50/50, (b)30/70 and (c) 10/90

Conclusion

Electrospun CS nanofiber mats have been successfully prepared without organic solvent by blending CS with PVA. The weight ratio in this blend affects the viscosity, conductivity and surface tension of the solution. The morphology of fibers and their diameters were strongly influenced by the composition of the solution. This approach could have potential application in the field of drug delivery and wound dressing.

Acknowledgements

This work was financially supported by Commission of Higher Education (Thailand), the Thailand Research Funds through the Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No.PHD/0183/2550) and the Silpakorn University Research and Development Institute.

References

[1] N. Bhardwaj and S. C. Kundu: Biotechnology Advances Vol. 28 (2010), p. 325

[2] T. J. Sill and H. A. V. Recum: Biomaterials Vol. 29 (2008), p. 1989

[3] N. Charernsriwilaiwat, P. Opanasopit, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat and P. Supaphol: Carbohydrate Polymers Vol. 81 (2010), p. 675

[4] Y. T. Jia, J. Gong, X. H. Gu, H. Y. Kim, J. Dong and X. Y. Shen: Carbohydrate Polymers Vol. 67 (2007), p. 403

[5] M. Ignatova, K. Starbova, N. Markova, N. Manolova and I. Rashkov: Carbohydrate Research Vol. 341 (2006), p. 2098

click for feedback
consult - comment - contact

Tropical Journal of Pharmaceutical Research April 2012; 11 (2): 235-242
© Pharmacotherapy Group,
Faculty of Pharmacy, University of Benin,
Benin City, 300001 Nigeria.

All rights reserved.

Available online at http://www.tjpr.org
http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v11i2.9

Research Article

In Vitro Antioxidant Activity of Chitosan Aqueous Solution: Effect of Salt Form

Natthan Charernsriwilaiwat, Praneet Opanasopit*, Theerasak Rojanarata and Tanasait Ngawhirunpat
Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand

Abstract

Purpose: *To investigate the effect of salt form on the antioxidant activities of chitosan aqueous solution.*
Methods: *The antioxidant activities of chitosan acetate (CS-acetate), chitosan hydroxybenzotriazole (CS-HOBt), chitosan thiamine pyrophosphate (CS-TPP) and chitosan ethylenediaminetetraacetic acid (CS-EDTA) solution were determined employing various established in vitro system such as superoxide and hydroxyl radicals scavenging, metal ion chelating and reducing power. Their chemical structures were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) and Fourier transform infrared spectrophotometry (FT-IR).*
Results: *NMR and FT-IR show confirmed formation of chitosan salts. The 50 % inhibition concentration (IC_{50}) of superoxide and hydroxyl radicals was 0.349 – 1.34 and 0.34 – 1.54 mg/mL, respectively. Among the salt forms, CS-acetate (IC_{50} = 0.349 mg/mL) showed the highest superoxide radical scavenging effect while CS-HOBt (IC_{50} = 0.34 mg/mL) showed the highest hydroxyl radical scavenging effect. With regard to metal ion chelating activity, CS-EDTA showed the highest chelating activity (approx 100 % at 1 mg/mL) while the others showed 20 % activity at a concentration of 1 mg/mL. The results for reducing power indicate that CS-TPP had the highest reducing power.*
Conclusion: *The results indicate that antioxidant activity varied with the salt form. Thus, CS salts may be used as a source of antioxidants for pharmaceutical applications.*

Keywords: *Chitosan, Antioxidant, Hydroxybenzotriazole, Thiamine pyrophosphate, Ethylenediaminetetraacetic acid*

Received: 14 January 2011 *Revised accepted: 17 February 2012*

*Corresponding author: ***Email:*** *praneet@su.ac.th;* ***Tel:*** *+66-34-255800;* ***Fax:*** *+66-34-255801*

INTRODUCTION

Chitosan (CS) is a natural copolymer of D-glucosamine (GlcN) and *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) and is produced by alkaline deacetylation of chitin. It is insoluble at neutral and alkaline pH but is soluble in acidic media. It is also biodegradable, biocompatible, and non-toxic and, therefore, has been employed in biomedical applications such as tissue engineering, wound healing and drug delivery [1-3].

Recently, the antioxidant activities of CS and its derivatives were investigated since CS chains have active hydroxyl and amino groups that can react with free radicals [4]. The derivative studied include water-soluble disaccharide chitosan [5], carboxymethyl chitosan [6], sulfated chitosan [7,8], quaternized chitosan [9], sulfanilamide derivatives of chitosan [10], chitosan crab shells [11], chitosan-N-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride [12], 2-[phenylhydrazine -thiosemicarbazone] – chitosan [13] and dietary chitosan [14].

Although CS salts such as hydroxybenzo-triazole (HOBt), thiamine pyrophosphate (TPP) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) have been investigated for their biomedical applications, however, their antioxidant activities have not yet been investigated. HOBt is an organic compound often used as a racemization suppressor and is popular for its ability to improve yields in peptide synthesis [15]. Due to the hydroxyl groups presented in HOBt, the molecule can form a salt with the amine groups of CS, thus improving CS water solubility and allowing CS to be dissolved in water. We have previously prepared CS-HOBt for use in nucleic acid delivery [16] as well as CS-HOBt/polyvinyl alcohol blend of biodegradable nanofibers intended for drug delivery or tissue engineering applications [17].

TPP is a thiamine derivative. It plays an essential role as cofactor in key reactions in carbohydrate metabolism [18]. Due to the phosphate groups of TPP, the molecular can salt form with amine groups of CS, helps to improve CS water solubility [18]. The amine groups of TPP, especially at the nitrogen atom (N) of thiazolium can be deprotonated and are always positive even at physiological pH [18]. CS-TPP has been successfully prepared as a novel carrier for siRNA delivery [19]. EDTA is a well-established metal chelator and is soluble at alkaline pH. It has been used to form a complex with CS due to the decreased positive charge of the latter. CS can be rendered readily soluble in water with EDTA due to the carboxyl groups in EDTA structure. CS-EDTA conjugate has been successfully used tp prepare a nanoparticulate gene delivery system [20] and hydrogel films for transbuccal delivery [21].

Therefore, the purpose of this study was to prepare CS-HOBt, CS-TPP and CS-EDTA, and characterize their chemical structures by Fourier transform infrared spectrophotometer (FT-IR) and nuclear magnetic resonance (NMR), as well as evaluate their antioxidant activities.

EXPERIMENTAL

Materials

Chitosan low molecular weight (degree of deacethylation 0.85, MW 110 kDa), hydroxybenzotriazole (HOBt), ethylenedia-minetetraacetic acid (EDTA), thiamine pyrophosphate (TPP), nitro blue tetrazolium (NBT), phenazine methosulphate (PMS), hydrogen peroxide (H_2O_2), thiobarbituric acid (TBA), ferrozine, nicotinamide adenine dinucleotide-reduced (NADH), trichloroacetic acid (TCA), and deoxyribose (DR) were all purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company, USA. All other reagents and solvents were commercially procured and of analytical grade.

Preparation of chitosan solutions

Aqueous CS solutions were prepared by dissolving CS with HOBt, TPP or EDTA at different weight ratio 1:1, 1:1 and 2:1, respectively. Briefly, HOBt (10 mg), TPP (10 mg) or EDTA (5 mg) was dissolved together with CS (10 mg) in 10 mL of distilled water and vigorously stirred with a magnetic stirrer at ambient temperature until the solution became clear. CS-acetate was prepared by dissolving CS (10 mg) in 10 mL of 1 %v/v acetic acid.

Characterization of chitosan salts

The chemical structure of chitosan salts was characterized using Fourier transform infrared spectrophotometer (FTIR, Nicolet 4700, Becthai, USA). The spectra were obtained by accumulating 32 scans within the range 400 – 4000 cm^{-1}. A ^{1}H-nuclear magnetic resonance spectrometer (NMR, Bruker 300 MHz) was used to investigate the chemical integrity of the chitosan salts (sample weight: 5 mg) using deuterated water (D_2O) as solvent.

Superoxide radical scavenging assay

The superoxide scavenging ability of the CS salts was investigated by the method of Nishikimi et al [22]. The reaction mixture, comprising in each case, CS solution (0.1 - 2 mg/mL), PMS (30 μM), NADH (338 μM) and NBT (72 μM) in phosphate buffer (0.1M pH 7.4), was incubated at room temperature for 5 min and the absorbance measured spectrophotmetrically (Agilent model 8453 E, Germany) at 560 nm against a blank (water). The sample without chitosan salts was used as control. Their scavenging activity was calculated using Eq 1.

Scavenging activity (%) = (1 – As/Ac) x 100 … (1)

where As and Ac are the absorbance of the test sample and control, respectively.

Hydroxyl radical scavenging assay

The hydroxyl radical scavenging of the CS salts was investigated by the method of Halliwell et al [23]. CS solutions (0.1 - 2 mg/mL) was incubated with deoxyribose (3.75 mM), H_2O_2 (1mM), $FeCl_3$ (100 μM), EDTA (100 μM) and ascorbic acid (100 μM) in potassium phosphate buffer (20 mM, pH7.4) for 60 min at 37 ^{o}C in a tube. The reaction was terminated by adding 1 mL of TBA (1 %w/v) and 1mL of TCA (2 %w/v), and then heating the mixture in a boiling water bath for 15 min. The contents were cooled and the absorbance of the mixture was measured spectrophotometrically at 535 nm against a blank. The sample without chitosan salts was used as control. Increase in the absorbance of the reaction mixture indicates that oxidation of deoxyribose is increased. Scavenging activity was determined as in Eq 2.

Scavenging activity (%) = (1 – As/Ac) x 100 … (2)

where As and Ac are the absorbance of the test sample and control, respectively.

Metal ion chelating assay

The ferrous ion-chelating potential of the CS salts was investigated according to the method of Decker & Welch [24]. The ferrous ion-chelating ability was monitored by the absorbance of the ferrous iron-ferrozine complex at 562 nm. Briefly, the reaction mixture comprised of the CS solution with varying concentrations, $FeCl_2$ (2 mM) and ferrozine (5 mM), and adjusted to a total volume of 0.8 mL with water, shaken well and incubated for 10 min at room temperature. The absorbance was then measured spectrophotometrically at 562 nm. The ability of CS salts to chelate ferrous ion was calculated using Eq 3.

Chelating activity (%) = (1 – As/Ac) x 100 …. (3)

where As and Ac are the absorbance of the test sample and control, respectively.

Evaluation of reducing power

The reducing power of the salts was determined according to the method of Oyaizu [25]. Each CS solution (0.1 - 2 mg/mL, 2.5 mL) was mixed with 2.5 mL of 200 mM sodium phosphate buffer (pH 6.6) and 2.5 mL of 1 % potassium ferricyanide, and the mixture incubated at 50 °C for 20 min. Thereafter, 2.5 mL of 10 % trichloroacetic acid was added and the mixture centrifuged at 200 g for 10 min. The upper layer (5 mL) was mixed with 5 mL of deionized water and 1 mL of 0.1 % ferric chloride, and the absorbance measured spectrophotometrically at 700 nm against a blank. A higher absorbance indicates a higher reducing power. The sample without chitosan salts was used as control.

Statistical analysis

Data were obtained in triplicate and expressed as the mean ± standard deviation (SD). The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using SPSS software (version 11). The significance level was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Characteristics of the chitosan salts

The pure chitosan powder FT-IR spectrum (Fig 1A) showed prominent absorption peaks of chitosan at 896, 1087, 1598, 1653 and 3430 cm^{-1} representing pyranose ring, glucoside, amino, acetamide and hydroxyl groups, respectively [26]. The spectrum of CS-HOBt showed additional peaks at 748 and 1389 cm^{-1} which are attributable to aromatic and azobenzene rings in the HOBt structure. Peaks of phosphate compound in the spectrum of CS-TPP were found at 768 and 1223 cm^{-1}. Strong peaks at 1400 and 1629 cm^{-1}, corresponding to carboxylic acid salt, were observed in CS-EDTA spectrum [27].

NMR spectra are shown in Fig 1B. It shows that the NMR spectrum of CS-acetate showed chemical shifts of the N-acetylglucosamine unit (3.1 ppm) and acetyl group (2 ppm), whereas CS-HOBt showed chemical shifts of aromatic and azobenzene ring at 7.3 and 7.8 ppm. The chemical shifts at 2.6, 5.5 and 8 ppm, corresponding to sulfide group, phosphate group and pyrimidine, respectively, were found in CS-TPP NMR spectrum. Carboxyl chemical shift (3.7 and 4 ppm) was observed in the CS-EDTA NMR spectrum.

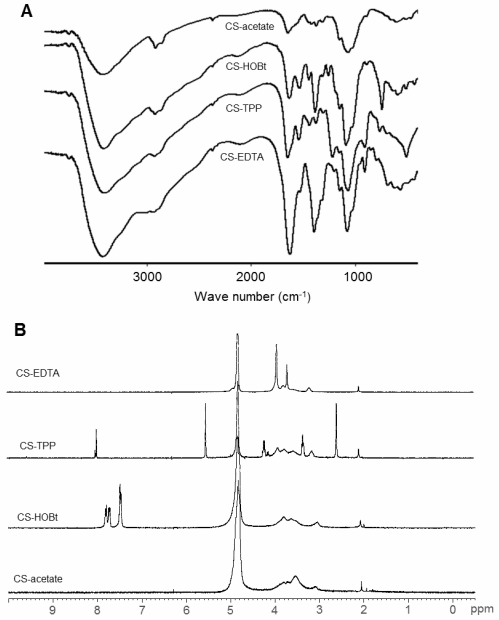


Figure 1: (A) FT-IR and (B) NMR spectra of CS salts

Superoxide radical scavenging

Figure 2 shows the scavenging effects of the CS salt on superoxide radicals. All the salts scavenged superoxide in a concentration-dependent manner. IC_{50} value is the concentration of the sample required to achieve 50 % scavenging of the superoxide free radical and it was determined from the plot of % scavenging against concentration. The IC_{50} of CS-acetate, CS-EDTA, CS-TPP and CS-HOBt was 0.349, 0.611, 0.890 and 1.342 mg/mL, respectively. Thus, the order of

scavenging activity was: CS-acetate > CS-EDTA > CS-TPP > CS-HOBt. The scavenging activity of CS-acetate and CS-EDTA at 2 mg/mL was 87.6 and 76.4 %, respectively.

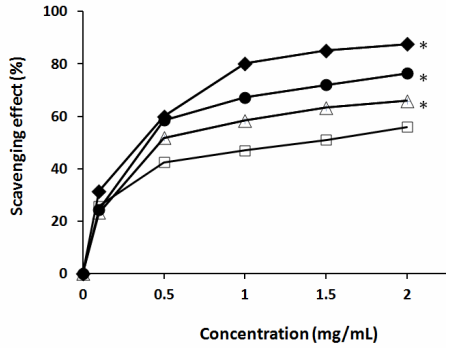


Figure 2: Scavenging activity (n = 3) of CS salts against superoxide radicals: CS-acetate (◆),CS-HOBt (□), CS-TPP (Δ) and CS-EDTA (●);..* indicates significance difference at $p < 0.05$

Hydroxyl radical scavenging activity of chitosan salts

The scavenging activity of the chitosan salts against hydroxyl radicals is shown in Fig 3. The IC_{50} of CS-HOBt, CS-TPP, CS-acetate and CS-EDTA were 0.34, 0.853, 1.43 and 1.54 mg/mL, respectively, giving a scavenging order of CS-HOBt > CS-TPP > CS-acetate > CS-EDTA.

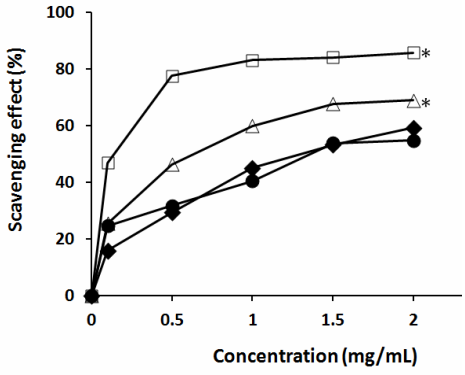


Figure 3: Scavenging activity (n = 3) of CS salts against hydroxyl radicals; CS-acetate (◆),CS-HOBt (□), CS-TPP (Δ) and CS-EDTA (●);* indicates significance difference at $p < 0.05$

Metal ion chelating activity of chitosan salts

The ferrous ion-chelating activity of the CS-salts is shown in Fig 4. The chelating effect of CS-acetate, CS-HOBt and CS-TPP was approximately 20 % at 2 mg/mL. However, CS-EDTA showed the highest chelating effect which was approximately 100 % at 2 mg/mL.

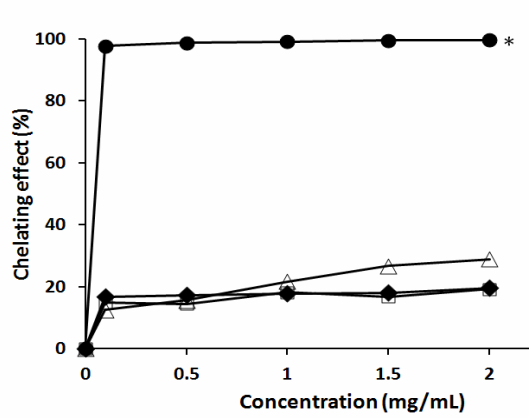


Figure 4: Metal-ion chelating activity (n = 3) of CS salts; CS-acetate (◆), CS-HOBt (□), CS-TPP (Δ) and CS-EDTA (●);* indicates significance difference at $p < 0.05$

Reducing power of chitosan salts

Figure 5 shows the reducing power of the CS salts. The results reveal that the reducing power of CS salts were not-concentration dependent. The reducing power of CS-acetate, CS-HOBt, CS-TPP and CS-EDTA at 1 mg/mL was 0.19, 0.09, 2.40 and 0.08, respectively.

DISCUSSION

Superoxide anion radicals are generated by a number of cellular reactions, including various enzyme systems, such as lipoxygenases, peroxidase, NADPH oxidase and xanthine oxidase. They play an important regulatory role in the formation of other cell-damaging free radicals, such as hydrogen peroxide, hydroxyl radical, or singlet oxygen in living systems [28]. The scavenging effect

of ascorbic acid on superoxide radical at 2 mg/mL was 68.2 % [8]. These results indicated that the superoxide radical scavenging activities of CS-acetate and CS-EDTA at the same level were higher than that of ascorbic acid, while those of CS-TPP and CS-HOBt were lower. This might be due to the ability of TPP and HOBt to bond with the hydroxyl and amino groups of CS and hence the hydroxyl and amine groups of CS were not free to react with the superoxide**.**

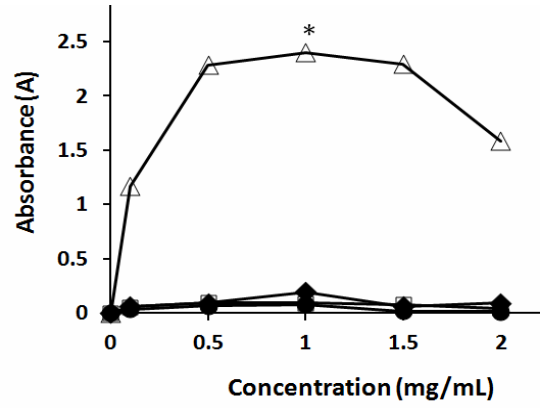


Figure 5: Reducing power (n = 3) of CS salts: CS-acetate (◆), CS-HOBt (□), CS-TPP (Δ) and CS-EDTA (●); * indicates significance difference at $p < 0.05$

Hydroxyl radical is the most reactive free radical and can be formed from superoxide anion and hydrogen peroxide in the presence of metal ions such as Cu^{2+} or Fe^{2+}. However, Cu^{2+} and Fe^{2+} do not exist free in body but they can be bound with albumin, ATP, citrate, DNA and membrane lipids [29]. In this study, the hydroxyl radical produced by the reaction of Fe^{2+}-EDTA complex with H_2O_2 in the presence of ascorbic acid, attacks deoxyribose to form products that upon heating with 2-thiobarbituric acid under acidic conditions, yield a pink tint. Added hydroxyl radical scavengers compete with deoxyribose for the resulting hydroxyl radicals and diminish tint formation [30]. Xing et al [8] found, with regard to the scavenging effects on hydroxyl radical, that IC_{50} of chitosan sulfate was in the range of 0.350 – 3.269 mg/mL while the IC_{50} of ascorbic acid was 1.537 mg/mL. In this study, CS-HOBt and CS-TPP showed higher scavenging effect on hydroxyl radical. The hydroxyl radical scavenging mechanism of CS salt to be further investigated.

The results showed that CS-EDTA exhibited the highest metal ion chelating activity of all the CS salts. Xing et al [8] previously reported that the chelating activity of chitosan sulfate was low; and was not greater than 40% at 1 g/mL. These results indicated that CS-acetate, CS-HOBt and CS-TPP had low chelating effect compared with CS-EDTA. EDTA is strongly chelating agent itself.

The results showed that CS-TPP had the highest reducing power. Yen *et al* [11] reported reducing power of approximately 0.2 at 1 mg/mL for crab chitosans while. Zhong *et al* [10] found that reducing power of low molecular weight (MW = 4 kDa) chitosan was approximately 0.06 at 1 mg/mL. Thus, CS-acetate, CS-HOBt and CS-EDTA had reducing power similar to the previous study. The high reducing power of CS-TPP is due to the structure of TPP that can itself act as a reducing agent.

CONCLUSION

The results of the present work indicated that CS salts possess varying levels of antioxidant and free radical scavenging activities, including superoxide and hydroxyl radicals scavenging, metal ion chelating activity and reducing power. CS-acetate showed the highest superoxide radical scavenging effect while CS-HOBt and CS-TPP showed the greatest hydroxyl radical scavenging activities. CS-EDTA and CS-TPP had the highest chelating effect and reducing power, respectively. Overall, the results indicate that the antioxidant activity of chitosan (CS) can be improved by formation of its salts. These

salts may be useful as a source of antioxidants in pharmaceutical products.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors wish to thank the Commission of Higher Education (Thailand), the Thailand Research Funds through the Golden Jubilee Ph.D. Program Grant No. PHD/0183/2550 and Project No.DBG5480004 for financial support.

REFERENCES

1. *Kumar MNVR. A review of chitin and chitosan applications. React Funct Polym 2000; 46: 1-27.*
2. *Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. Prog Polym Sci 2006; 31: 603-632.*
3. *Jayakumara R, Menona D, Manzoora K, Naira SV, Tamurab H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials-A short review. Carbohydr Polym 2010; 82: 227-232.*
4. *Xue C, Yu G, Hirata T, Terao J, Lin H. Antioxidative activities of several marine polysaccharides evaluated in a phosphatidylcholine-iposomal suspension and organic solvents. Biosci Biotech Bioch 1998; 62: 206-209.*
5. *Lin HY, Chou CC. Antioxidative activities of water-soluble disaccharide chitosan derivatives. Food Res Int 2004; 37: 883-889.*
6. *Guo Z, Xing R, Liu S, Yu H, Wang P, Li C, Li P. The synthesis and antioxidant activity of the Schiff bases of chitosan and carboxymethyl chitosan. Bioorg Med Chem Lett 2005; 15: 4600-4603.*
7. *Xing R, Liu S, Yu H, Guo Z, Li Z, Li P. Preparation of high-molecular weight and high-sulfate content chitosans and their potential antioxidant activity in vitro. Carbohydr Polym 2005; 61: 148-154.*
8. *Xing R, Yu H, Liu S, Zhang W, Zhang Q, Li Z, Li P. Antioxidant activity of differently regioselective chitosan sulfates in vitro. Bioorg Med Chem 2005; 13: 1387–1392.*
9. *Guo Z, Liu H, Chen X, Jia X, Lia P. Hydroxyl radicals scavenging activity of N-substituted chitosan and quaternized chitosan. Bioorg Med Chem Lett 2006; 16: 6348-6350.*
10. *Zhong Z, Ji X, Xing R, Liu S, Guo Z, Chen X, Li P. The preparation and antioxidant activity of the sulfanilamide derivatives of chitosan and chitosan sulfates. Bioorg Med Chem 2007; 15: 3775-3782.*
11. *Yen MT, Yang JH, Mau JL. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. Carbohydr Polym 2008; 74: 840–844.*
12. *Xing R, Liu S, Guo Z, Yu H, Zhong Z, Ji X, Li P. Relevance of molecular weight of chitosan-N-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride and their antioxidant activities. Eur J Med Chem 2008; 43: 336-340.*
13. *Zhong Z, Zhong Z, Xing R, Li P, Mo G. The preparation and antioxidant activity of 2-[phenylhydrazine (or hydrazine)-thiosemicarbazone]-chitosan. Int J Biol Macromol 2010; 47: 93-97.*
14. *Anraku M, Fujii T, Kondo Y, Kojima E, Hata T, Tabuchi N, Tsuchiya D, Goromaru T, Tsutsumi H, Kadowaki D, et al. Antioxidant properties of high molecular weight dietary chitosan in vitro and in vivo. Carbohydr Polym 2011; 83: 501-505.*
15. *Fangkangwanwong J, Akashi M, Kida T, Chirachanchai S. Chitosan-hydroxybenzotriazole aqueous solution: a novel water-based system for chitosan functionalization. Macromol Rapid Comm 2006; 27: 1039-1046.*
16. *Opanasopit P, Techaarpornkul S, Rojanarata T, Ngawhirunpat T, Ruktanonchai U. Nucleic acid delivery with chitosan hydroxybenzotriazole. Oligonucleotides 2010; 20: 127-136.*
17. *Charernsriwilaiwat N, Opanasopit P, Rojanarata T, Ngawhirunpat T, Supaphol P. Preparation and characterization of chitosan-hydroxybenzotriazole/polyvinyl alcohol blend nanofibers by the electrospinning technique. Carbohydr Polym 2010; 81: 675-680.*
18. *Engel PC; Engel PC (Eds). Enzyme cofactors. California: , Enzymology LabFax, Academic; 1996; p 244.*
19. *Rojanarata T, Opanasopit P, Techaarpornkul S, Ngawhirunpat T, Ruktanonchai U. Chitosan-Thiamine Pyrophosphate as a Novel Carrier for siRNA Delivery. Pharm Res 2008; 25: 2807-2814.*
20. *Loretz B, Schnurch AB. In vitro evaluation of chitosan-EDTA conjugate polyplexes as a nanoparticulate gene delivery system. AAPS Journal 2006; 8: E756-E764.*
21. *Cui F, He C, He M, Tang C, Yin L, Qian F, Yin C. Preparation and evaluation of chitosan-ethylenediaminetetraacetic acid hydrogel films for the mucoadhesive transbuccal delivery of insulin. J Biomed Mater Res 2009; 89A: 1063-1071.*
22. *Nishikimi M, Rao NA, Yagi K. The Occurrence of Superoxide Anion in the Reaction of Reduced Phenazine Methosulfate and Molecular Oxygen. Biochem Bioph Res Co 1972; 46: 849-854.*
23. *Halliwell B, Gutteridge JMC, Aruoma OI. The Deoxyribose Method: A Simple "Test-Tube" Assay for Determination of Rate Constants for Reactions of Hydroxyl Radicals. Anal Biochem 1987; 165: 215-219.*
24. *Decker EA, Welch B. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food. J Agr Food Chem 1990; 38: 674-677.*
25. *Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of*

browning reaction prepared from glucosamine. Jpn J Nutri 1986; 44: 307-315.

26. *Fang T, Du Y, Li J, Hu Y, Kennedy JF. Enhancement of antioxidant activity of chitosan by irradiation. Carbohydr Polym 2008; 73: 126-132.*
27. *Günzler, Helmut; Gremlich, Hans–Ulrich editors. IR spectroscopy an introduction. Mörlenbach: Strauss offsetdruck; 2002: 170P.*
28. *Bloknina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. Ann Bot 2003; 91: 179-194.*
29. *Gutteridge JMC. Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. Biochem J 1984; 224: 761-767.*
30. *Cheng Z, Ren J, Li Y, Chang W, Chen Z. Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl radical and phenolic compounds by qualitative structure and activity relationship. Bioorg Med Chem 2002; 10: 4067-4073.*

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

http://www.elsevier.com/copyright

Author's personal copy

International Journal of Pharmaceutics 427 (2012) 379–384

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Pharmaceutical Nanotechnology

Lysozyme-loaded, electrospun chitosan-based nanofiber mats for wound healing

Natthan Charernsriwilaiwat, Praneet Opanasopit*, Theerasak Rojanarata, Tanasait Ngawhirunpat

Pharmaceutical Development of Green Innovations Group (PDGIG), Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 November 2011
Received in revised form 4 January 2012
Accepted 7 February 2012
Available online 14 February 2012

Keywords:
Electrospinning
Lysozyme
Chitosan
Ethylenediaminetetraacetic acid

ABSTRACT

In this study, a blend mixture of chitosan–ethylenediaminetetraacetic acid (CS 2 wt%–EDTA) at a weight ratio of 30/70 and polyvinyl alcohol (PVA) solution (10 wt%) was electrospun to produce fibrous mats with lysozyme (10, 20 and 30 wt%) used for wound healing. The morphology and diameter of the electrospun fiber mats with and without lysozyme were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The amount of lysozyme loaded in the nanofiber mats was measured by HPLC. The cell lysis activity of the lysozyme was investigated with *Micrococcus lysodeikticus* cells as a substrate. The wound healing activity was performed in vivo using male Wistar rats. The SEM images of all lysozyme-loaded fibers show a smooth fiber without beads with an average diameter of 143–209 nm. The amount of lysozyme loaded in the nanofiber mats was slightly decreased when the initial concentration of lysozyme was increased. The rapid lysozyme release from the nanofiber mats was obtained and is dependent on the lysozyme-loading amount. In animal wound healing, lysozyme loaded CS–EDTA nanofiber mats accelerated the rate of wound healing when compared to the controls (gauze). In conclusion, our experiments demonstrated that biomaterials composed of lysozyme loaded CS–EDTA nanofibers have a potential for wound healing.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Electrospinning is a versatile technique for creating nanofibers from many materials. The fibers produced by this method have shown unique characteristics, such as a very large surface to volume ratio and a high porosity with a small pore size (Bhardwaj and Kundu, 2010; Huang et al., 2003). In the electrospinning process, a high voltage is applied to a capillary containing a polymer solution. A droplet of the polymer solution drive fluid forms at the tip of the capillary, and as electrostatic forces overcome the surface tension of the polymer solution, the solution is ejected from the tip. The charged jets of polymer solution move toward a collector, the solvent rapidly evaporates and a non-woven fiber mat is collected on the collector (Reneker and Yarin, 2008). The morphology of the electrospun nanofibers can be easily controlled by adjusting the electrospinning parameter (Baji et al., 2010; Deitzel et al., 2001). Because of this characteristic, electrospun nanofibers have been applied in many fields, including biomedical sciences, filtration, and optical sensor fields. In biomedical applications, electrospun nanofibers can be used as a tissue engineering scaffold and are also valuable in drug delivery and wound dressing (Agarwal et al., 2008; Sill and Recum, 2008).

Materials for wound dressing made from the electrospinning product have been increasingly investigated. The electrospun nanofiber is appropriate for use as a wound dressing material due to its useful properties, including oxygen-permeable high porosity, variable pore-size distribution, high surface to volume ratio, and most importantly, morphological similarity to the natural extracellular matrix (ECM) in the skin, all of which promote cell adhesion, migration and proliferation (Jayakumar et al., 2011). For wound dressing applications, the electrospun nanofiber can be used with or without agents that promote wound healing and the polymer must be biocompatible, biodegradation and low toxicity. Only few polymers were used to prepare electrospun nanofiber for wound healing such as polyvinyl alcohol (PVA), poly(L-lactic acid) (PLA), polycaprolactone (PCL), gelatin and chitosan (CS) (Venugopal and Ramakrishna, 2005; Zahedi et al., 2010).

CS is produced by the alkaline deacetylation of chitin that is a copolymer of *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) and D-glucosamine (GlcN). CS is soluble in acidic media and insoluble in neutral and alkaline media. Because it is biodegradable, biocompatible, and non-toxic, CS has been proposed as a safer material for use in biomedical applications (Rinaudo, 2006). CS has been widely investigated as a wound dressing material and is available in proliferation, antibacterial and activates macrophages. Moreover, chitosan will gradually depolymerize into *N*-acetyl-D-glucosamine, which initiates fibroblast proliferation, assists in ordered collagen deposition and stimulates increased levels of natural hyaluronic acid synthesis at the wound site (Jayakumar et al., 2011; Paul

* Corresponding author. Tel.: +66 34 255800; fax: +66 34 255801.
E-mail addresses: praneet@su.ac.th, opraneet@hotmail.com (P. Opanasopit).

0378-5173/$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ijpharm.2012.02.010

Author's personal copy

and Sharma, 2004). Recently, CS nanofibers have been successfully generated from the electrospinning of pure CS, CS derivatives and CS blends with other polymers. However, some organic solvents or toxic acids, such as 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) (Min et al., 2004), trifluoroacetic acid (TFA) (Sangsanoh and Supaphol, 2006) and acetic acid (Geng et al., 2005), may form residues in the chitosan nanofibers. To reduce the toxicity of solvents, water soluble CS were used to prepare nanofibers such as carboxyethyl chitosan/PVA (Zhou et al., 2008) and quaternary chitosan (Ignatova et al., 2007) for wound dressing applications. Moreover, in our research, CS was also prepared in aqueous salt to form nanofibers without the use of organic solvents or toxic acids such as CS–hydroxybenzotriazole (HOBt)/PVA (Charernsriwilaiwat et al., 2010) and CS–ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)/PVA (Charernsriwilaiwat et al., 2011).

In this study, we used electrospinning to fabricate nanofiber mats from a CS–EDTA blend with PVA solution. In a previous study, the best weight ratio of CS–EDTA and PVA was 30/70 CS–EDTA/PVA, which produced a smooth fiber without beads in the structure. To enhance the wound healing effect, lysozyme (LZ) was chosen to be loaded into these CS–EDTA/PVA nanofibers due to its antibacterial properties (Hughey et al., 1989; Mecitoflu et al., 2006), solubility in water and synergistic antibacterial effects with EDTA (Branen and Davidson, 2004). Moreover, the enzymes that are effective in promoting the healing process (muramidase or *N*-acetylmuramide glycanhydrolase) are those that break down the bacterial cell walls and depolymerize CS to release *N*-acetyl-D-glucosamine (Reshetov et al., 2004). Therefore, the aim of this study was to prepare CS–EDTA/PVA nanofiber mats loaded with LZ for wound dressing applications. The morphology and structure of the nanofiber mats were characterized by scanning electron microscopy (SEM). The composites of the LZ loaded 30/70 CS–EDTA/PVA nanofiber mats were characterized by differential scanning calorimetry (DSC). The cytotoxicity tests for the CS–EDTA/PVA nanofiber mats were performed with MTT assays using human fibroblast cells. Finally, in vivo wound healing activities were evaluated using an animal model.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Chitosan (degree of deacetylation 0.85, MW 110 kDa), ethylenediaminetetraacetic acid and lysozyme from chicken egg whites were purchased from Sigma–Aldrich Chemical Company, USA. Polyvinyl alcohol (PVA) (degree of polymerization ≈ 1600, degree of hydrolysis ≈ 97.5–99.5 mol%) was purchased from Fluka, Switzerland. Normal human foreskin fibroblast (NHF) cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) in Rockville, MD, USA. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was obtained from BDH Laboratories, UK. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Trypsin–EDTA, and penicillin–streptomycin were purchased from Gibco BRL Rockville, MD, USA. All other reagents and solvents were commercially available and were of analytical grade.

2.2. Electrospinning

The 2% (w/v) CS solution was prepared by dissolving CS and EDTA in distilled water at a weight ratio of 2:1. In the case of CS–acetate, a 2% (w/v) CS solution was prepared by dissolving CS and a 2% (v/v) acetic acid solution. The 10% (w/v) PVA solution was prepared by dissolving PVA in distilled water at 80 °C and then allowing the solution to stir for 4 h. The CS–EDTA solution was mixed with a PVA solution at a weight ratio of 30/70. LZ (10, 20 and 30 wt% to polymer) was added into the 30/70 CS–EDTA/PVA solution. The viscosity, conductivity and surface tension of the solutions were measured. The electrospinning solution was contained in a 5-mL glass syringe connected with a 20-gauge stainless steel needle (diameter = 0.9 mm) at the nozzle. The needle was connected to the emitting electrode of positive polarity of a Gamma High Voltage Research device. The electric potential was fixed at 15 kV. The nanofibers were collected as-spun on an aluminum sheet that was wrapped on a rotating collector. The solution was electrospun at room temperature, and the collection distance was fixed at approximately 20 cm. The solution feed was driven by a syringe pump, with the rate fixed at 0.25 mL/h during spinning.

2.3. Characterization of LZ loaded CS-based nanofibers

The morphology and diameter of the nanofiber mats were determined using scanning electron microscopy (SEM; Camscan Mx2000, England). For this process, a small section of the electrospun fiber mats was sputtered with a thin layer of gold prior to SEM observation. The average diameter of the nanofiber mats were analyzed by randomly measuring the diameters of the nanofibers at 100 different points from the SEM images.

The thermal behavior of the nanofiber mats was evaluated by differential scanning calorimetry (DSC, Pyris Sapphire DSC, PerkinElmer instrument, USA) in an atmosphere of nitrogen. DSC traces were recorded from 25 to 250 °C at a heating rate of 5 °C/min.

2.4. Determination of lysozyme content

The content of LZ in the 30/70 CS–EDTA/PVA nanofiber mats was analyzed by HPLC (Agilent Technology, USA). A VertiSep® AQS C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm particle size) with a C18 guard column was used. The elution was carried out with gradient solvent systems consisting of 1% acetonitrile, 0.2% trifluoroacetic acid and 98.8% water (mobile A) and 70% acetonitrile, 0.2% trifluoroacetic acid and 29.8% water (mobile B) with a flow rate of 1 mL/min at ambient temperature. The gradient was programmed as follows: 100% A for 0–3 min, constant at 45% A for 9 min, 45% A to 20% A in 3 min, and 20% A to 100% A in 5 min. The wavelengths of the spectrofluorimetric detector were set at *Ex* = 276 nm and *Em* = 345 nm (Riponi et al., 2007). The nanofiber mats (5 mg) were dissolved in 5 mL of distilled water at room temperature and continuously stirred for 24 h. Then, the amount of LZ in the nanofiber mats was analyzed. The LZ content was calculated using Eq. (1).

$$\text{LZ content}\,(\%) = \left(\frac{L_a}{L_t}\right) \times 100, \tag{1}$$

where L_a is the amount of LZ embedded in the nanofibers, and L_t is the theoretical amount of LZ (obtained from feeding condition) incorporated into the nanofibers.

2.5. Lysozyme activity assay

The biological activities of the LZ loaded CS–EDTA/PVA nanofiber mats were measured with an EnzChek lysozyme assay kit (E-22013). *Micrococcus lysodeikticus* cells were used as a substrate. The samples were prepared by dissolving the nanofiber mats in pH 7.4 phosphate buffer (50 μL) at room temperature and continuously stirred for 24 h and mixed with 50 μg/mL (50 μL) of *M. lysodeikticus*, labeled with fluorescein at each LZ concentration in a 96-well plate. The mixtures were incubated at 37 °C for 30 min, and the fluorescence intensity of each sample was measured in a microplate reader (Universal Microplate Analyzer, Model AOPUS01 and AI53601, Packard BioScience, CT, USA). The fluorescence absorption maxima and emission maxima of the digested

Author's personal copy

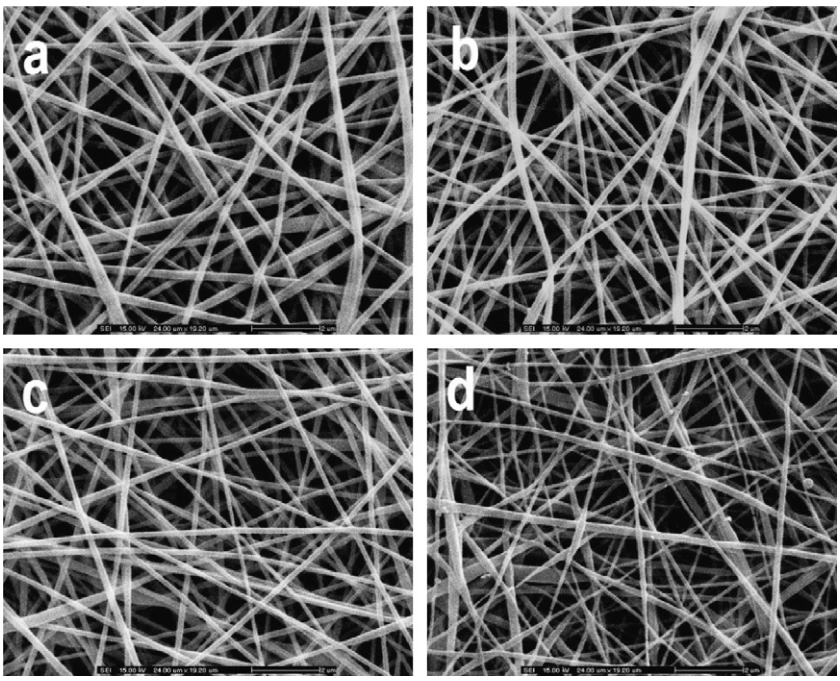


Fig. 1. The SEM image of the LZ loaded CS–EDTA/PVA nanofiber mats with different concentrations of LZ: (a) 0%, (b) 10%, (c) 20% and (d) 30%.

products from the substrate were at 494 nm and 518 nm, respectively. Specific activity was defined in terms of units of activity per milligram of protein (U/g). All samples were assayed in triplicate.

2.6. In vitro release of lysozyme

The release characteristics of LZ from the LZ loaded CS–EDTA/PVA nanofiber mats were investigated using Franz's diffusion cells with a water jacket connected to a water bath at 37 °C, each cell having a 6.5 mL volume and 2.43 cm^2 effective diffusion area. The receiver compartments were filled with acetate buffer (pH 5.5) and stirred with a Teflon magnetic stirrer at 600 rpm. The nanofiber mats were cut with an equal diameter effective diffusion area and were mounted between two half cells of the diffusion cell. At a given time interval, an aliquot (1.0 mL) of the receiver solution was withdrawn and replaced with the same volume of fresh medium to keep the volume constant. The concentration of LZ in the samples was assayed by HPLC (Agilent Technology, USA) using the same conditions. The concentration of LZ and their cumulative amounts were plotted against time. The experiments were carried out in triplicate.

2.7. Indirect cytotoxicity evaluation

The cytotoxicity of the nanofiber mats was evaluated based on a procedure adapted from the ISO10993-5 standard test method (indirect contact) (Chen et al., 2008). The LZ-loaded nanofiber mats were sterilized by UV radiation for 1 h. The mats were then extracted in a serum-free medium (SFM; containing DMEM, 1% (v/v) L-glutamine, 1% (v/v) lactalbumin, 1% (w/v) antibiotic and antimycotic formulation) in an incubator for 24 h to produce extraction media of varying concentrations (10, 7.5, 5, 2.5 and 1 mg/mL). Normal human foreskin fibroblast (NHF) cells were plated in 90 μL of DMEM, supplemented with 10% FBS, at a density of 8000 cells/well in 96-well plates. When the cultures reached confluency (typically 48 h after plating), the tested extraction media with varying concentrations were replaced, and the cells were re-incubated for 24 h. After treatment, the tested extraction solutions were removed. Finally, the cells were incubated with 100 μL of a MTT-containing medium (1 mg/mL) for 4 h. The medium was removed, the cells were rinsed with PBS (pH 7.4), and the formazan crystals that had formed in the living cells were dissolved in 100 μL DMSO per well. Cell viability (%) was calculated based on the absorbance at 550 nm using a microplate reader. The viability of the non-treated control cells was arbitrarily defined as 100%.

2.8. Wound healing test

Male Wistar rats (240–280 g) were used in this study, and the study was approved by an Investigational Review Board (Animal Studies Ethics Committee, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Approval No. 2-2553). After anesthetization, two full-thickness rectangular wounds with a surface area of 0.8 cm^2 were cut from the back of each of rat's neck. The wound was covered with a nanofiber mat equal size to its size, gauze and commercial antibacterial gauze dressing (Sofra-tulle®, Sanofi Aventis, UK) ($n = 6$). The area of the wound was measured every day using the planimetry method until the wound completely healed. The percentage of wound healing is defined by Eq. (2).

$$\text{Wound area}\,(\%) = \left(\frac{A}{A_i}\right) \times 100, \tag{2}$$

where A_i is the initial wound area, and A is the wound area after a fixed time interval.

2.9. Statistical analysis

Data were collected from triplicate samples and were depicted as the mean ± standard deviation (S.D.). Statistically significant differences were examined using Student's t-test. The significance level was set at $p < 0.05$.

Author's personal copy

Table 1
Solution parameters of LZ loaded 30/70 CS–EDTA/PVA solution and average diameter at each concentrations.

LZ concentration (%)	Viscosity (mPa s)	Conductivity ($\mu S\,cm^{-1}$)	Surface tension ($mN\,m^{-1}$)	Fiber diameter (nm)
0	254.74 ± 0.76	1016.3 ± 0.66	49.46 ± 1.43	209.91 ± 35.68
10	221.27 ± 0.76	1366.0 ± 0.66	49.01 ± 0.44	168.72 ± 24.16
20	204.27 ± 1.36	1689.7 ± 1.36	49.31 ± 0.48	160.50 ± 26.84
30	198.82 ± 0.66	2013.0 ± 0.76	49.60 ± 0.21	143.65 ± 50.41

3. Results and discussion

3.1. Electrospinning

LZ was added to the CS–EDTA/PVA (weight ratio of 30/70) electrospinning solution. The maximum concentration of LZ for the preparation of electrospun nanofibers was 30 wt%. When the LZ concentration was greater than 30 wt%, nanofibers could not be obtained via electrospinning. Fig. 1 shows the morphology of 0–30 wt% LZ loaded CS–EDTA/PVA fiber mats. The SEM images of all concentrations of LZ show a smooth fiber without beads. When the concentrations of LZ were increased, the diameter of the nanofibers decreased from 209.91 ± 35.68 to 143.65 ± 50.41 nm. The decrease in diameter may be due to the change in the solution parameter (Table 1). The conductivity of the electrospun solution increased when the concentration of LZ increased, whereas the viscosity and surface tension of the solution were slightly decreased and did not change at each concentration. Therefore, the decrease in the diameter of the nanofibers is mainly due to the conductivity of the solution. When the conductivity of a solution increases, the diameter of the nanofiber decreases. LZ is a protein that can provide charge when dissolved in water. Because of the amine groups in its structure, an increase in the conductivity of the solution occurs when the concentration of LZ increases. This result corresponds to our previous study, which showed that the diameter of the CS–HOBt/PVA nanofiber mats decreased when the conductivity of the aqueous solution increased (Charernsriwilaiwat et al., 2010).

3.2. Characterizations

Fig. 2 shows the DSC thermograms of the CS–EDTA/PVA nanofiber mats with and without LZ and pure LZ powder. The endothermic curves of the bare-nanofiber mats (0% LZ) showed that the melting point slightly decreased from approximately 218.5 °C to 217.3, 216.7 and 216.1 °C when the concentration of LZ increased to 10, 20 and 30%, respectively. For the pure LZ powder, the melting point was observed at approximately 200 °C, which is lower than that of the CS–EDTA/PVA nanofiber mats. This indicates that the LZ content in the nanofiber mats does not affect the thermal behavior of the mats.

Table 2
% LZ content and activity of LZ loaded 30/70 CS–EDTA/PVA nanofiber mats at each concentrations.

LZ concentration (%)	% LZ content	LZ activity (U/g)
10	95.44 ± 2.54	4.40 ± 1.23
20	93.86 ± 1.91	8.89 ± 1.56
30	92.39 ± 1.76	16.30 ± 2.39

3.3. LZ content and activity

The LZ content and activity in the CS–EDTA/PVA nanofiber mats are shown in Table 2. The content of LZ in the nanofiber mats was 92.39–95.44%, which shows the excellent incorporation of LZ in the nanofiber mats. When the concentration of LZ increased, the % content slightly decreased. This might be the capacity of nanofiber mats was maximum at 10% LZ. The activity of LZ in the CS–EDTA/PVA nanofiber mats was between 4.4 and 16.3 U/g. LZ is a water-soluble enzyme that homogenously mixes with the hydrophilic polymer. Therefore, it can be readily dissolved in CS–EDTA/PVA solution and provides high content and activity. This result shows that LZ is not eliminated during the electrospinning process under high electric voltage conditions (Kim et al., 2007).

3.4. In vitro release study

Fig. 3 shows the LZ release profiles from CS–EDTA/PVA nanofiber mats with different concentrations. It can be observed that the lysozyme is rapidly released. The percentage of cumulative LZ release reaches approximately 80% within 30 min. This result reveals that the LZ was burst released from the nanofiber mats. The maximum total amount of LZ release from the nanofiber mats within 4 h was approximately 90%. This result was similar to the

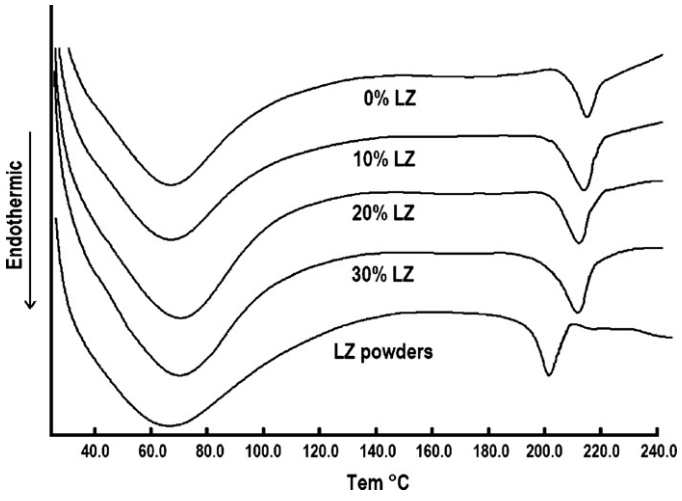


Fig. 2. DSC thermogram of the LZ loaded CS–EDTA/PVA nanofiber mat with different concentrations of LZ and pure LZ powders.

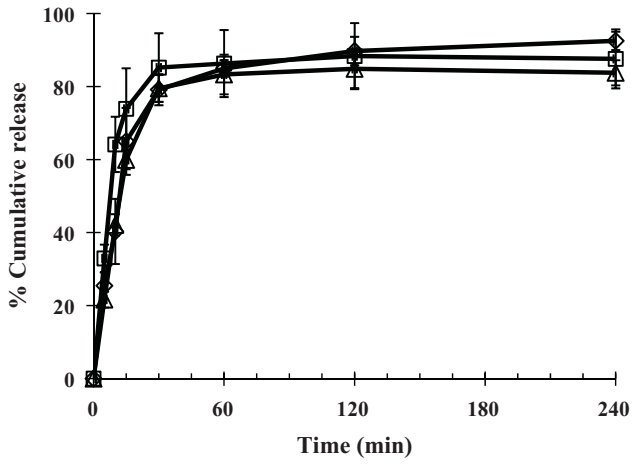


Fig. 3. Lysozyme release profiles from CS–EDTA/PVA nanofiber mats with various initial lysozyme concentrations: (◊) 10%, (□) 20% and (△) 30%.

Author's personal copy

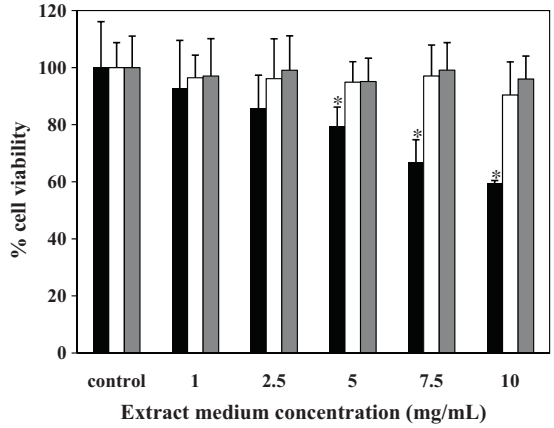


Fig. 4. Cell viability of the extract of nanofiber mats (■) bare-CS–acetate/PVA (□) bare-CS–EDTA/PVA and (■) 30% LZ loaded CS–EDTA/PVA nanofiber mats at various concentrations in NHF cells. Difference values * were statistically significant ($p < 0.05$) compared with control. The data are presented as mean ± S.D. ($n = 5$).

release of LZ from the electrospun hydrophilic PVA/gelatin scaffold (Yang et al., 2008). This result indicates that LZ could release well from the CS–EDTA/PVA nanofiber mats, and the LZ release patterns may be explained by both the mechanism of polymer erosion and lysozyme diffusion (Kim et al., 2007).

3.5. Indirect cytotoxicity

The cytotoxicity of various concentrations of the extract medium from 30% LZ loaded CS–EDTA/PVA, bare-CS–EDTA/PVA and bare-CS–acetate/PVA nanofiber mats were shown in Fig. 4. There was a significant decrease in cell viability when the NHF cells were incubated with higher concentrations (5–10 mg/mL) of the extraction media of the nanofiber mats of bare- CS–acetate/PVA nanofiber mats when compared with the control ($p < 0.05$). The average cell viability was decreased when the weight of the nanofiber mats increased. However, cell viability remained similar to that of the control non-transfected cells in all concentrations of the CS–EDTA/PVA extract medium and 30% LZ loaded CS–EDTA/PVA nanofiber mats. This may be because the acetic acid that was used as a solvent remained in the nanofiber mats. Our results indicate that the CS–EDTA/PVA nanofiber mats with and without LZ is safe at the concentrations used (1–10 mg/mL).

3.6. Wound healing test

In the wound healing test, two full-thickness round wounds with surface areas of 0.8 cm^2 were created on the back of each rat. Fig. 5 shows the representative images of the wound healings at 1, 4, 7 and 10 days after treatment with 30% LZ loaded CS–EDTA/PVA nanofiber mats, gauze (negative control) and commercial antibacterial gauze dressing (positive control). Wound closure in all treatments was recovered within 10 days. The healing treatment with 30% LZ loaded CS–EDTA/PVA nanofiber mats was faster than that of the gauze and commercial antibacterial gauze dressing treatments at 4 and 7 days after operation. Fig. 6 shows the changes in wound areas at different healing times. The wound areas decreased gradually and achieved approximately 2% after 10 days when treated with three different wound dressings. In the first 1–5 days, the healing effect of 30% LZ loaded CS–EDTA/PVA nanofiber mats was better than that of the gauze ($p < 0.05$) and was similar to that of the commercial antibacterial gauze dressing. This may be because the LZ was rapidly released from the nanofiber mats, which assists in the acceleration of the healing process by deactivating bacterial and depolymerizing the CS (Mecitoflu et al., 2006). Byproducts from CS depolymerization such as EDTA and *N*-acetyl-D-glucosamine can also enhance the healing rate because of their antibacterial properties and aid in fibroblast proliferation (Reshetov et al., 2004). After that, the % wound area of all treatments between day 5 and recovery was similar. This revealed that wound healing was processed by a mechanism of the body, independent from the effects of the treatment. Chen et al. (2008) also reported similar results for electrospun collagen/chitosan nanofibrous membranes, which proved to be better than gauze and commercial collagen sponge for wound healing.

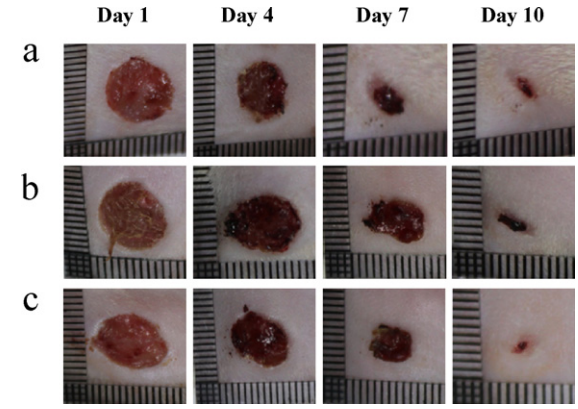


Fig. 5. Appearance of would healings at 1, 4, 7 and 10 day after treat with (a) 30% LZ loaded CS–EDTA/PVA nanofiber mats, (b) gauze (negative control) and (c) commercial antibacterial gauze dressing (Sofra-tulle®) (positive control).

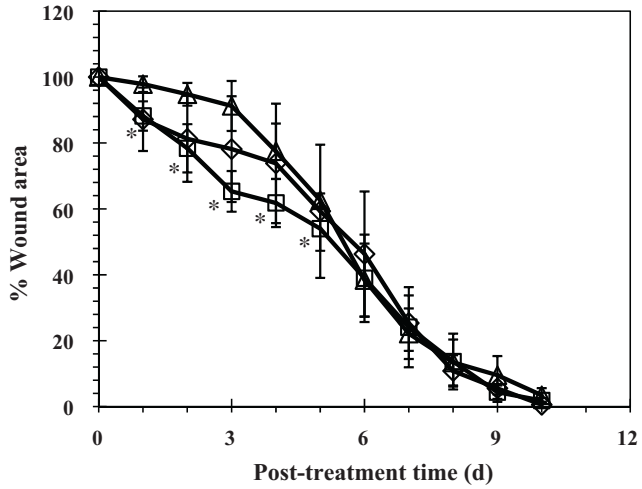


Fig. 6. Wound healing tests of (□) 30% LZ loaded CS–EDTA/PVA nanofiber mats, (△) gauze (negative control) and (◊) commercial antibacterial gauze dressing (Sofra-tulle®) (positive control). Difference values * were statistically significant ($p < 0.05$) compared with gauze. The data are presented as mean ± S.D. ($n = 6$).

4. Conclusion

An ideal wound dressing should be biocompatible, biodegradable and able to enhance the healing process. LZ was successfully loaded into CS–EDTA/PVA nanofiber mats using the electrospinning method. The 30% LZ loaded CS–EDTA/PVA nanofiber mats are in the nanometer range, are non-toxic and rapidly released, retains the LZ activity, and enhance the healing process. These biodegradable, biocompatible, electrospun chitosan-based nanofiber mats have great potential for use as wound dressings.

Author's personal copy

Acknowledgements

The authors wish to thank the Commission of Higher Education (Thailand), the Thailand Research Funds through the Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0183/2550) and Project No. DBG5480004 for financial support.

References

Agarwal, S., Wendorff, J.H., Greiner, A., 2008. Use of electrospinning technique for biomedical applications. Polymer 49, 5603–5621.

Baji, A., Mai, Y.-W., Wong, S.-C., Abtahi, M., Chen, P., 2010. Electrospinning of polymer nanofibers. Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. Compos. Sci. Technol. 70, 703–718.

Bhardwaj, N., Kundu, S.C., 2010. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. Biotechnol. Adv. 28, 325–347.

Branen, J.K., Davidson, P.M., 2004. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. Int. J. Food Microbiol. 90, 63–74.

Charernsriwilaiwat, N., Opanasopit, P., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., 2011. Fabrication and characterization of chitosan–ethylenediaminetetraacetic acid/polyvinyl alcohol blend electrospun nanofibers. Adv. Mater. Res. 195–196, 648–651.

Charernsriwilaiwat, N., Opanasopit, P., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., Supaphol, P., 2010. Preparation and characterization of chitosan–hydroxybenzotriazole/polyvinyl alcohol blend nanofibers by the electrospinning technique. Carbohydr. Polym. 81, 675–680.

Chen, J.-P., Chang, G.-Y., Chen, J.-K., 2008. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. Colloid. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects 313–314, 183–188.

Deitzel, J.M., Kleinmeyer, J., Harris, D., Beck Tan, N.C., 2001. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. Polymer 42, 261–272.

Geng, X., Kwon, O.-H., Jang, J., 2005. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. Biomaterials 26, 5427–5432.

Huang, Z.M., Zhang, Y.-Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S., 2003. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. Compos. Sci. Technol. 63, 2223–2253.

Hughey, V.L., Wilger, P.A., Johnson, E.A., 1989. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme against *Listeria monocytogenes* Scott A in foods. Am. Soc. Microbiol. 55, 631–638.

Ignatova, M., Manolova, N., Rashkov, I., 2007. Novel antibacterial fibers of quaternized chitosan and poly(vinyl pyrrolidone) prepared by electrospinning. Eur. Polym. J. 43, 1112–1122.

Jayakumar, R., Prabaharan, M., Kumar, P.T.S., Nair, S.V., Tamura, H., 2011. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. Biotechnol. Adv. 29, 322–337.

Kim, T.G., Lee, D.S., Park, T.G., 2007. Controlled protein release from electrospun biodegradable fiber mesh composed of poly(e-caprolactone) and poly(ethylene oxide). Int. J. Pharm. 338, 276–283.

Mecitoflu, Ç., Yemenicioflu, A., Arslanoflu, A., ElmacÂ, Z.S., Korel, F., Çetin, A.E., 2006. Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. Food Res. Int. 39, 12–21.

Min, B.-M., Lee, S.W., Lim, J.N., You, Y., Lee, T.S., Kang, P.H., Park, W.H., 2004. Chitin and chitosan nanofibers: electrospinning of chitin and deacetylation of chitin nanofibers. Polymer 45, 7137–7142.

Paul, W., Sharma, C.P., 2004. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. Trends Biomater. Artif. Organs 18, 18–23.

Reneker, D.H., Yarin, A.L., 2008. Electrospinning jets and polymer nanofibers. Polymer 49, 2387–2425.

Reshetov, I.V., Yudanova, T.N., Matorin, O.V., Morozov, D.S., 2004. A coating material containing chlorhexidine and lysozyme for wound treatment. Pharm. Chem. J. 38, 388–390.

Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. Prog. Polym. Sci. 31, 603–632.

Riponi, C., Natali, N., Chinnici, F., 2007. Quantification of hen's egg white lysozyme in wine by an improved HPLC-FLD analytical method. Am. J. Enol. Viticult. 58, 405–409.

Sangsanoh, P., Supaphol, P., 2006. Stability improvement of electrospun chitosan nanofibrous membranes in neutral or weak basic aqueous solutions. Biomacromolecules 7, 2710–2714.

Sill, T.J., Recum, H.A.V., 2008. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. Biomaterials 29, 1989–2006.

Venugopal, J., Ramakrishna, S., 2005. Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology. Appl. Biochem. Biotechnol. 125, 147–157.

Yang, D.-z., Long, Y.-h., Nie, J., 2008. Release of lysozyme from electrospun PVA/lysozyme-gelatin scaffolds. Front. Mater. Sci. China 2, 261–265.

Zahedi, P., Rezaeian, I., Ranaei-Siadat, S.-O., Jafari, S.-H., Supaphol, P., 2010. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. Polym. Adv. Technol. 21, 77–95.

Zhou, Y., Yang, D., Chen, X., Xu, Q., Lu, F., Nie, J., 2008. Electrospun water-soluble carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibrous membrane as potential wound dressing for skin regeneration. Biomacromolecules 9, 349–354.

Advanced Materials Research Vol. 506 (2012) pp 118-121
Online available since 2012/Apr/25 at www.scientific.net
© (2012) Trans Tech Publications, Switzerland
doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.506.118

Preparation of Chitosan-Thiamine Pyrophosphate/Polyvinyl Alcohol Blend Electrospun Nanofibers

N. Charernsriwilaiwat[1,a,*], T. Rojanarata[1,b], T. Ngawhirunpat[1,c], P. Opanasopit[1,d]

[1]Pharmaceutical Development of Green Innovations Group (PDGIG),

Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand

[a]natthongs@hotmail.com, [b]teerasak@su.ac.th, [c]tanasait@su.ac.th, [d]praneet@su.ac.th

Keywords: Chitosan, Electrospinning, Thiamine pyrophosphate

Abstract. Electrospinning of chitosan (CS) has been interested due to the excellent properties of CS such as biocompatibility, biodegradability, antibacterial and non toxic. In this study, chitosan-thiamine pyrophosphate (CS-TPP)/polyvinyl alcohol (PVA) blend nanofibers were prepared using electrospinning techniques without acidic and organic solvent. CS was dissolved with TPP aqueous solution and then blended with PVA solution at various weight ratios. Physicochemical properties of CS-TPP/PVA solution such as viscosity, conductivity and surface tension were evaluated. The morphology and diameter of the electrospun fiber mats were investigated by using scanning electron microscopy (SEM). The chemical structure was characterized by Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy and Differential Scanning Calorimetry (DSC). The morphology and diameter of the nanofibers were mainly affected by the weight ratio of the blend polymers. Nanofibers were obtained when the CS-TPP content was less than 50 % wt. The average diameter of the nanofibers was 99.91-216.42 nm, and the fiber diameter decreased with increasing CS-TPP content. Cytotoxicity tests in human fibroblast cells showed that the fibers had low toxic to the cells. In conclusion, these CS electrospun nanofiber mats can be applied for the wound dressing or transdermal drug delivery systems.

Introduction

Production of chitosan nanofibers via electrospinning techniques has recently been attractively investigated due to potential in biomedical application such as tissue engineering, delivery of pharmaceutical substance and wound dressing. Recently, electrospun chitosan (CS) nanofibers have been successfully fabricated from the CS, CS derivatives and CS blend with others polymer solution. However, some organic solvents or acids, such as 1,1,1,3,3,3-hexa fluoro-2-propanol (HFIP), trifluoroacetic acid (TFA) and concentrated acetic acid must be residued in electrospun chitosan nanofibers. The toxic organic solvents or acids in electrospun nanofiber mats are unsafe when applied to wounded human skin or tissue [1,2]. Thiamine pyrophosphate (TPP) is a thiamine derivative. Due to the phosphate groups of TPP, the molecular can form salt with amine groups of CS, help improving CS water solubility The amine groups of TPP, especially at N of thiazolium can be deprotonated and always positive even at physiological pH. Chitosan thiamine pyrophosphate (CS-TPP) was successfully prepared as a novel carrier for siRNA delivery [3]. In this study, electrospinning was used to prepare nanofiber mats from a CS-TPP aqueous solution. In a preliminary study, we attempted to use electrospinning to prepare a nanofiber mat from 100% CS-TPP solution; however no product of nanofiber was obtained. Therefore, we added poly(vinyl alcohol) (PVA) to the CS-TPP solution as a blend polymer in the different weight ratio. PVA is a water-soluble, non-toxic, biodegradable and biocompatible polymer with enhanced fiber-forming ability, and it is therefore well-suited as a guest polymer in blends with CS [4-6].

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 TTP, www.ttp.net. (ID: 202.44.135.34-06/06/12,04:25:59)

Experimental Procedure

Chitosan (low molecular weight) and thiamine pyrophosphate were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company, USA. Polyvinyl alcohol (PVA) (degree of polymerization ≈ 1600, degree of hydrolysis ≈ 97.5-99.5 mol%) was purchased from Fluka, Switzerland.

The 2% w/v CS solution was prepared by dissolving CS and TPP in distilled water at a weight ratio of 1:1. The 10% (w/v) PVA solution was prepared by dissolving PVA in distilled water at 80°C and then allowing the solution to stir for 4 h. The 2% CS-TPP solution was mixed with a 10% PVA solution at weight ratios. The solutions viscosity, conductivity and surface tension were measured. The polymer solution was placed in a 5-mL glass syringe connected with a 20G stainless steel needle (diameter = 0.9 mm) at the nozzle. The needle was connected to the emitting electrode of positive polarity of a Gamma High Voltage Research device. The electric potential was fixed at 15 kV. The nanofibers were collected as-spun on an aluminum sheet that was wrapped on a rotating collector. The solution was electrospun at room temperature, and the collection distance was fixed at approximately 20 cm. The solution feed was set by syringe pump that was controlled to 0.25 mL h^{-1}. Morphology of CS-TPP/PVA nanofiber mats were observed by scanning electron microscope (SEM). The thermal behavior of the nanofiber mats were studied by differential scanning calorimetry (DSC). FT-IR spectra of nanofiber mats were collected by fourier transform infrared spectrophotometer in the wave number range of 400-4000 cm^{-1}. The indirect cytotoxicity on normal human fibroblast (NHF) was evaluated by (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. MTT (a yellow tetrazole) is reduced to purple formazan in living cells that measuring by UV spectrophotometry at 550 nm [7]. The nanofiber mats of CS-TPP/PVA and CS-acetate/PVA at the weight ratios of 10/90, 30/70, 50/50 were immersed in a serum-free medium (SFM) for 24 h at vary concentration. The SFM without mats was used as control.

Results and Discussion

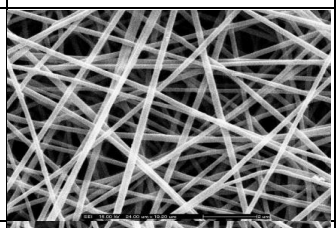
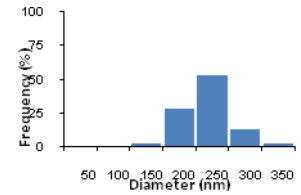
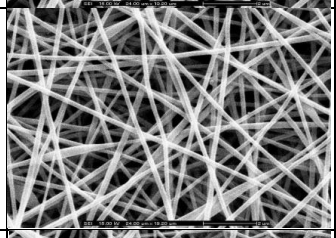
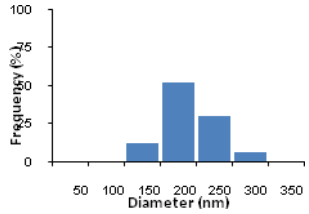
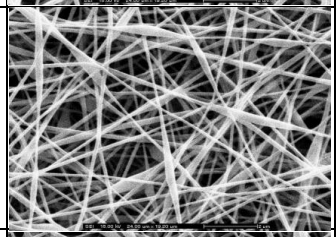
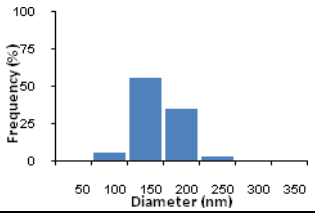
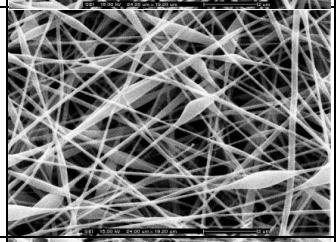
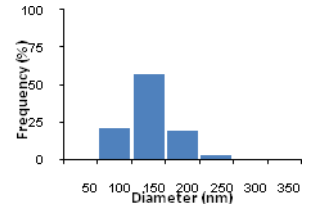
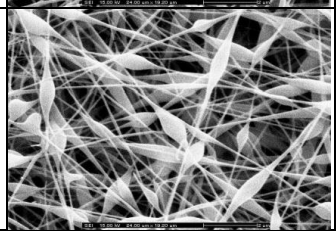
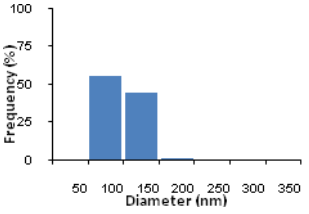
The viscosity, conductivity and surface tension of the CS-TPP/ PVA at different weight ratio are shown in Table 1.The viscosities of the CS-TPP/PVA blend solutions decreased from 568 ± 0.38 to 124 ± 0.12 cP. The conductivities and surface tensions of the CS-TPP/PVA blend solutions increased from 1161 ± 9.71 to 2110 ± 10.0 μS cm^{-1} and from 46.6 ± 0.37 to 52.6 ± 0.23 mN m^{-1}, respectively when increasing the CS-TPP content of the blend from 10 to 50% wt.

Table 1. Physiochemical properties of CS-TPP/PVA at different weight ratio

CS-TPP/PVA weight ratio	Viscosity (cP)	Conductivity (μS cm^{-1})	Surface tension (mN m^{-1})
10/90	568 ± 0.38	1161 ± 9.71	46.6 ± 0.37
20/80	460 ± 2.48	1269 ± 6.51	48.6 ± 0.24
30/70	347 ± 5.29	1574 ± 9.02	50.0 ± 0.58
40/60	260 ± 0.38	1771 ± 2.08	51.6 ± 0.22
50/50	124 ± 0.12	2110 ± 10.0	52.6 ± 0.23

Table 2 shows the SEM images of nanofiber mats with different CS-TPP/PVA weight ratios of 10/90, 20/80, 30/70, 40/60 and 50/50. When the content of CS-TPP was increased from 10 to 50% wt, the average diameter of the nanofibers decreased from 216.42 ± 34.45 to 99.91 ± 18.67 nm and bead on mats were observed. Decreasing of fibers diameter when CS-TPP content increased were mainly roled by viscosity and conductivity of solutions. The diameter distribution of the nanofiber mats is shown in Table 2. The diameter gradually decreased with increasing CS-TPP amount in the blend, and more beads were observed in the composite. This result is similar to previous studies of CS-HOBt/PVA blend nanofiber membranes [5]. The beads in mats were observed when the content of CS-TPP in the blended solution increased to 30% wt (Table 2). When the CS-TPP content was more than 60% wt, fibers could not form a jet during the electrospinning process. This due to the repulsive forces between ionic groups in the CS backbone obstructing the formation of continuous fiber during electrospinning.

Table 2. SEM images, diameter distribution and diameter average of nanofiber mats with different weight ratios of CS-TPP/PVA.

Weight ratios of CS-TPP/PVA	SEM Image	Diameter distribution	Diameter average (nm) ± SD.
10/90			216.42 ± 34.45
20/80			188.66 ± 33.69
30/70			141.51 ± 29.39
40/60			126.77 ± 32.46
50/50			99.91 ± 18.67

The FT-IR spectra of nanofiber mats of pure chitosan powder, CS-TPP/PVA weight ratios 50/50 and PVA nanofiber mats are shown in Fig. 1. The PVA nanofiber mats' spectrum represented the absorption peaks at 3360, 2940, 1430 and 1095 cm^{-1}, which were attributed to the ν (O-H), ν_s (CH_2), δ (CH-O-H) and ν (C-O), respectively [4]. CS-TPP/PVA nanofiber mats also exhibited the same peaks as those found in the PVA nanofiber mats and the peak at 1655 cm^{-1}, the ν(C=O) of a primary amide [8], same as in the CS powder spectrum.The results indicated that CS-TPP and PVA were homogenously dispersed in nanofiber mats [5,6]. Fig. 2 shows the DSC thermograms of the nanofiber mats of different weight ratio blends of CS-TPP/PVA. The endothermic curves of all of the nanofiber mats were obtuse and broad when the amount of CS-TPP in the blend increased, the endothermic peak shifted to lower temperature. This indicated that the CS-TPP content in the blend resulted in less suitable conditions for the crystallization of the nanofiber mats [5,6].

The cytotoxicity to human fibroblast of CS-TPP/PVA compare with CS-acetate/PVA nanofiber mats is shown in Fig. 2. The results represented that cell viability was not significantly different in any concentration of CS-TPP/PVA. This indicated that CS-TPP/PVA was non-toxic to NHF cells. On the other hand CS-acetate/PVA nanofiber mats showed lower cell viability than CS-TPP/PVA nanofiber. This indicated that the acetic acid that dissolve CS might be residue in nanofibers cause toxic to NHF cells [5,6].

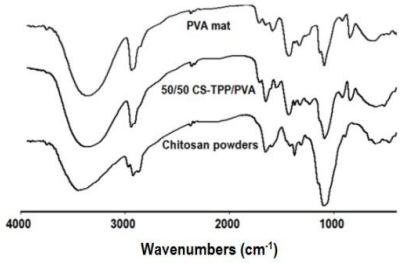


Fig. 1 FT-IR spectra of CS-TPP/PVA nanofiber mats

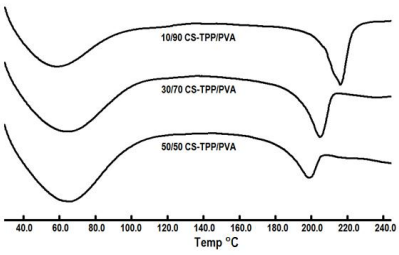


Fig. 2 DSC thermogram of CS-TPP/PVA nanofiber mats

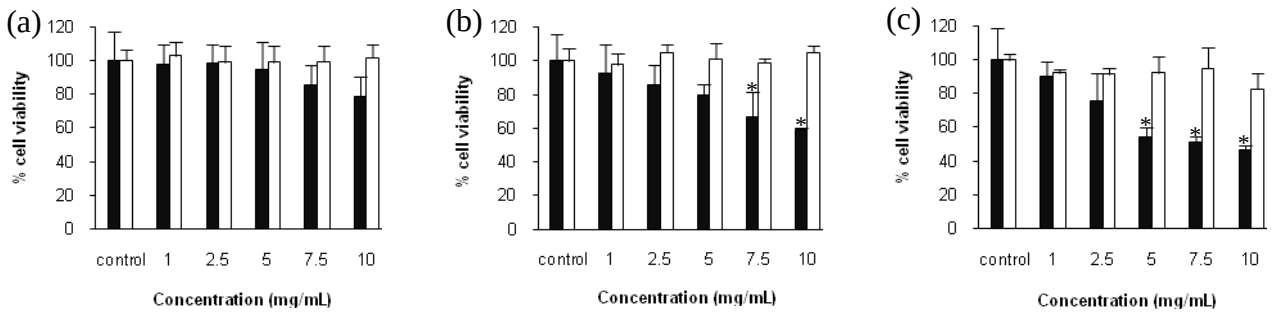


Fig. 3 Cell viability of the extract of nanofiber mats (■) CS-acetate/PVA and (□) CS-TPP/PVA with different weight ratio (a) 10/90, (b) 30/70 and (c) 50/50 at various concentrations in normal human fibroblast (NHF) cells. *Significant difference compared to control; $P < 0.05$

Conclusion

The non-toxic CS-TPP/PVA nanofiber mats were successfully prepared by electrospinning technique with different weight ratios. Indirect cytotoxicity assessment of CS-TPP/PVA nanofiber mats with human fibroblasts indicated that CS-TPP/PVA nanofiber mats had non-toxic and good biocompatability. CS-TPP/PVA nanofiber mats seem to have a potential for the wound dressing or transdermal drug delivery systems.

Acknowledgements

This work was financially supported by Commission of Higher Education (Thailand), the Thailand Research Funds through the Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No.PHD/0183/2550) and the Silpakorn University Research and Development Institute.

References

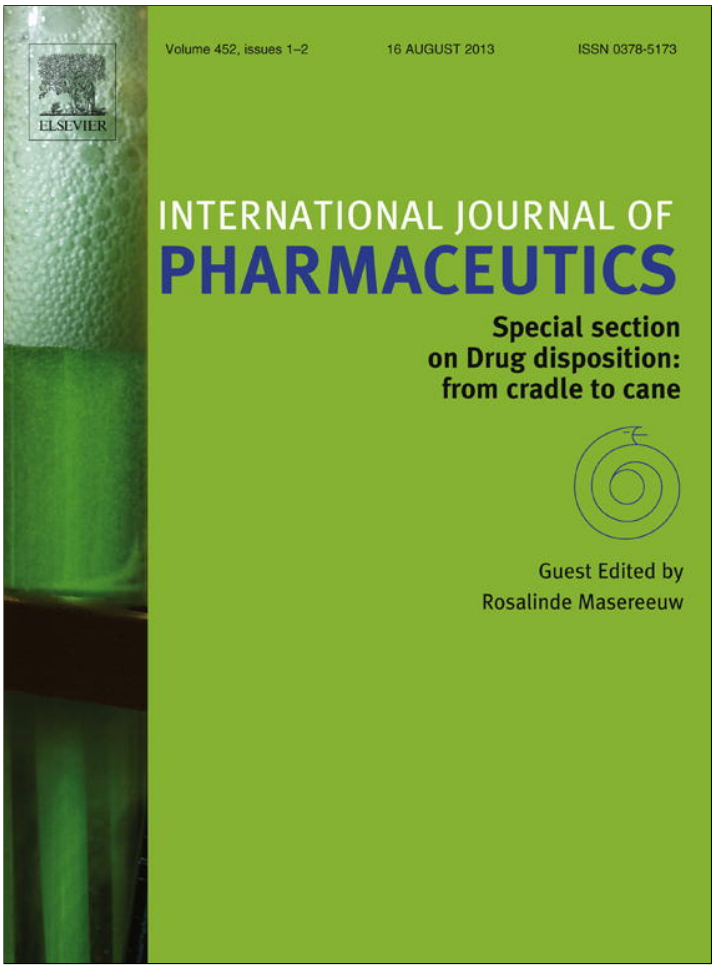
[1] M. Rinaudo: Prog polym sci, Vol. 31(7) (2006), p.603
[2] R. Jayakumar, M. Prabaharan, S. V. Nair, H.Tamura: Biotech Adv Vol. 28 (2010), p.142
[3] T. Rojanarata, P. Opanasopit, S. Techaarpornkul, T. Ngawhirunpat, U. Ruktanonchai: Pharm Res, Vol. 25(12) (2008), p.2807
[4] Y. T. Jia, J. Gong, X. H. Gu, H. Y. Kim, J. Dong, X. Y. Shen: Carbohyd Polym Vol. 67 (2007), p. 403
[5] N. Charernsriwilaiwat, P. Opanasopit, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat, P. Supaphol: Carbohyd Polym Vol. 81 (2010), p.675
[6] N. Charernsriwilaiwat, P. Opanasopit, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat Adv Mater Res Vol. 195-196 (2011),p.648
[7] J.-P. Chen, G.-Y. Chang, J.-K. Chen: Colloids Surfaces Physicochem Eng Aspects Vol. 313-314 (2008),p.183
[8] M. Ignatova, K. Starbova, N. Markova, N. Manolova, I. Rashkov: Carbohyd Res Vol. 341 (2006), p.2098

Biomaterials and Applications
10.4028/www.scientific.net/AMR.506

Preparation of Chitosan-Thiamine Pyrophosphate/Polyvinyl Alcohol Blend Electrospun Nanofibers

10.4028/www.scientific.net/AMR.506.118

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

http://www.elsevier.com/authorsrights

Author's personal copy

International Journal of Pharmaceutics 452 (2013) 333–343

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Pharmaceutical nanotechnology

Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with *Garcinia mangostana* extracts

Natthan Charernsriwilaiwat, Theerasak Rojanarata, Tanasait Ngawhirunpat, Monrudee Sukma, Praneet Opanasopit*

Pharmaceutical Development of Green Innovations Group (PDGIG), Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 February 2013
Received in revised form 18 March 2013
Accepted 2 May 2013
Available online 13 May 2013

Keywords:
Electrospinning
Chitosan
Garcinia mangostana
Wound healing

ABSTRACT

The aim of this study was to prepare electrospun chitosan-based nanofiber mats and to incorporate the fruit hull of *Garcinia mangostana* (GM) extracts into the mats. Chitosan-ethylenediaminetetraacetic acid/polyvinyl alcohol (CS-EDTA/PVA) was selected as the polymers. The GM extracts with 1, 2 and 3 wt% α-mangostin were incorporated into the CS-EDTA/PVA solution and electrospun to obtain nanofibers. The morphology and diameters of the mats were analyzed using scanning electron microscopy (SEM). The mechanical and swelling properties were investigated. The amount of GM extracts was determined using high-performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidative activity, antibacterial activity, extract release and stability of the mats were evaluated. In vivo wound healing tests were also performed in Wistar rats. The results indicated that the diameters of the fibers were on the nanoscale and that no crystals of the extract were observed in the mats at any concentration. The mats provided suitable tensile strength and swelling properties. All of the mats exhibited antioxidant and antibacterial activity. During the wound healing test, the mats accelerated the rate of healing when compared to the control (gauze-covered). The mats maintained 90% of their content of α-mangostin for 3 months. In conclusion, the chitosan-based nanofiber mats loaded with GM extracts were successfully prepared using the electrospinning method. These nanofiber mats loaded with GM extracts may provide a good alternative for accelerating wound healing.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chitosan is a copolymer of N-acetyl-D-glucosamine (Glc-NAc) and D-glucosamine (GlcN) that is produced by alkaline deacetylation of chitin. Chitosan is biodegradable, biocompatible, and non-toxic; therefore, it has been used as a material for use in biomedical applications (Dash et al., 2011; Rinaudo, 2006). Chitosan has been candidate as a wound dressing material due to the special properties as proliferation, antioxidant, antibacterial, activates macrophages and hemostasis. Moreover, chitosan will gradually depolymerize into N-acetyl-D-glucosamine, which initiates fibroblast proliferation, assists in ordered collagen deposition and stimulates increased levels of natural hyaluronic acid synthesis at the wound site. Because of these reasons, chitosan have been one of the important biomaterials for wound management in recent years (Jayakumar et al., 2011; Muzzarelli, 2009; Paul and Sharma, 2004). Hence chitosan biopolymer is the one choice for developing nanofibrous wound dressing material via electrospinning technique. The electrospun nanofiber is appropriate for use as a wound dressing material due to its useful properties, including oxygen-permeable high porosity, variable pore-size distribution, high surface to volume ratio, and most importantly, morphological similarity to the natural extracellular matrix (ECM) in the skin, all of which promote cell adhesion, migration and proliferation (Jayakumar et al., 2011; Zahedi et al., 2010). For wound dressing applications, the electrospun nanofiber can be used with or without agents that promote wound healing and the polymer must be biocompatible, biodegradation and low toxicity (Heunis and Dicks, 2010; Venugopal and Ramakrishna, 2005).

Recently, chitosan nanofibers have been successfully generated from the electrospinning of pure chitosan, chitosan derivatives and chitosan blends with other polymers. For wound healing applications, blended chitosan was used to prepare nanofiber such as chitosan/collagen (J.-P. Chen et al., 2008; Wang et al., 2008), chitosan/silk (Cai et al., 2010), carboxyethyl chitosan/polyvinyl alcohol (PVA) (Zhou et al., 2008) and quaternary chitosan/polyvinyl pyrrolidone (PVP) (Ignatova et al., 2007). However, the chitosan electrospun nanofiber which incorporated wound healing enhancement agent has been few reported for wound dressing application. Many varieties of active agent have been used to accelerate wound healing process such as antimicrobials and antibiotic, epithelia growth factor, fibroblasts growth factor, vitamin and

* Corresponding author. Tel.: +66 34 255800; fax: +66 34 255801.
E-mail addresses: praneet@su.ac.th, opraneet@hotmail.com (P. Opanasopit).

0378-5173/$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.012

Author's personal copy

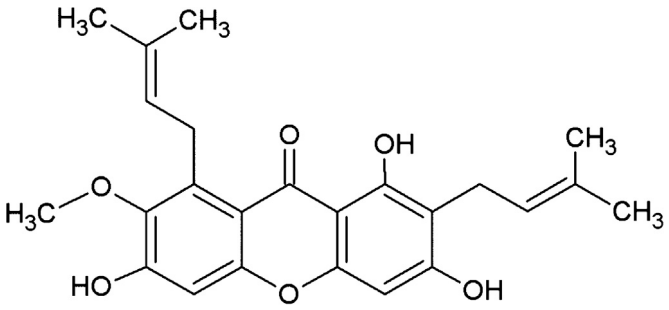


Fig. 1. Chemical structure of α-mangostin.

mineral, nanosilver particles and agent of high potential in a wound dressing material from natural extracts (Zahedi et al., 2010). Mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.; GM) is a tropical fruit found in Southeast Asia. People in Southeast Asia have used the pericarp (peel, rind, hull or ripe) of GM as a traditional medicine for the treatment of abdominal pain, diarrhea, dysentery, infected wound, suppuration, and chronic ulcer. The pericarp of GM was reported to be a good source of xanthone, α-, β-, and γ-mangostins, garcinone E, 8-deoxygartanin, and gartanin (Pedraza-Chaverri et al., 2008). Several studies have revealed that GM extracts exhibit antimicrobial (Chomnawang et al., 2009; Pothitirat et al., 2009a; Sundaram et al., 1983), antiproliferative (Moongkarndi et al., 2004), antioxidant (Palakawong et al., 2010; Weecharangsan et al., 2006; Williams et al., 1995), anti-inflammatory (L.-G. Chen et al., 2008) and analgesic (Cui et al., 2010). Because of these useful activities of GM extracts, it can be used for wound healing application.

In our previous study, the GM extracts were successfully loaded in PVA electrospun nanofiber mats which still remain the antioxidant activity for cosmetic applications (Opanasopit et al., 2008). Chitosan was also successfully prepared in aqueous salt to form nanofibers without the use of organic solvents or toxic acids such as chitosan-hydroxybenzotriazole (CS-HOBt)/PVA (Charernsriwilaiwat et al., 2010), chitosan-thiamine pyrophosphate (CS-TPP)/PVA (Charernsriwilaiwat et al., 2012c) and chitosan-ethylenediaminetetraacetic acid (CS-EDTA)/PVA (Charernsriwilaiwat et al., 2011). Among the obtained fibers, CS-EDTA/PVA nanofiber mats showed the excellent antibacterial, antioxidant activity and performed better than gauze in decreasing acute wound size during the first week after tissue damage (Charernsriwilaiwat et al., 2012b). Moreover, in the commercial product, EDTA was also used for irreversible deactivation of matrix metalloproteases (MMPs) which play an important role in damaging the extracellular matrix and the extracellular growth factors present in a chronic wound (Fitzgerald and Steinberg, 2009). The aim of this study was to prepare chitosan-based nanofiber mats loaded with GM extracts to enhance their efficacy as antibacterial and antioxidant agents for enhancing wound healing. The morphology and structure of the chitosan-based nanofiber mats after the extract was loaded were analyzed using scanning electron microscopy (SEM). The composites and the thermal behaviors of the nanofiber mats were characterized using Fourier transform infrared spectrophotometer (FT-IR) and differential scanning calorimeter (DSC). The mechanical and swelling properties of the mats were investigated. α-Mangostin (see the chemical structure, Fig. 1) was used as a marker of the GM extract. The amount of GM extracts (α-mangostin) remaining in the chitosan-based nanofiber mats was determined using high-performance liquid chromatography (HPLC). The release profile of α-mangostin from the nanofiber mats loaded with GM extracts was analyzed using Franz's diffusion cell. The cytotoxicity tests for the nanofiber mats were evaluated with a MTT assay using human fibroblast cells. The antioxidant and antibacterial activities of the nanofiber mats were analyzed. The in vivo wound healing effects of the nanofiber mats were investigated using an animal model. The stability of the nanofiber mats was studied by storing the mats under normal conditions and comparing them with mats stored under stress conditions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Chitosan (degree of deacetylation 0.85, MW 110 kDa) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were purchased from Sigma–Aldrich Chemical Company, USA. Polyvinyl alcohol (PVA) (degree of polymerization ≈ 1600, degree of hydrolysis ≈ 97.5–99.5 mol%) was purchased from Fluka, Switzerland. *G. mangostana* (GM) was obtained from a farm in Chantaburi Province, Thailand. Normal human foreskin fibroblast (NHF) cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) in Rockville, MD, USA. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was obtained from BDH Laboratories, UK. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Trypsin–EDTA, and penicillin–streptomycin were purchased from Gibco BRL Rockville, MD, USA. All other reagents and solvents were commercially available and were of analytical grade.

2.2. Preparation of GM extracts

The hulls of GM were cut into small pieces and dried in a hot air oven at 50 °C for 24 h. The dried samples were milled into powder by blender. Dried powder was separately macerated with 70% acetone at room temperature until the extraction was exhausted. Acetone extract was combined and filtered through a Whatman no. 1 filter paper under suction. The filtrate was concentrated on water bath and evaporates solvent in rotary evaporator to obtain the dry crude extracts.

2.3. Standardization of GM extracts

2.3.1. α-Mangostin content in GM extracts

The GM extracts were analyzed by the amount of α-mangostin determined by HPLC (Agilent Technology, USA). 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. (2009a) with a slight modification. 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, 70–75% A in 3 min, 75–80% A in 1 min, constant at 80% A for 6 min, and 80–70% A in 1 min. The wavelength of the UV-visible detector was set at 320 nm. The content of α-mangostin was calculated using its calibration curve with respect to the dilution factor and was expressed as gram per 100 g of the extract.

2.3.2. Antioxidant activity of the GM extracts

2.3.2.1. Free radical scavenging activity for 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). A 200 μM aliquot of DPPH in methanol (100 μl) was added to 100 μl of the GM extract. The extracts were dissolved by their solvent and then diluted to the desired concentration with methanol. The mixture was held at room temperature for 30 min. The absorbance was measured at 550 nm (Fusion Universal Microplate Analyser Model: A153601, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Inc., USA). The results of the assay were expressed as IC_{50}, which represents the concentration

Author's personal copy

of the extract (μg/ml) required to inhibit 50% of the free radical scavenging activity. The free radical scavenging activity was assessed using Eq. (1):

$$\%\ \text{Inhibition} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}}\right) \times 100 \quad (1)$$

where A_{sample} is the absorbance in the presence of the extracts and A_{control} 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 GM extracts and the *y*-axis represented the % inhibition.

2.3.2.2. Scavenging activity for 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radicals. The ABTS working solution was prepared by reacting an ABTS solution (7 mM) with potassium persulfate solution (4.95 mM). The mixture solution was reacted in the dark at room temperature for 12–16 h before use. Before the assay, the solution was diluted in a phosphate buffer at a pH of 7 to yield an absorbance of 0.7 ± 0.02 at 734 nm. Then, 3.9 ml of the working solution was mixed with 0.1 ml of the sample. After 10 min at room temperature, the absorbance at 734 nm was measured. The percent inhibition was then calculated using Eq. (1), and the IC_{50} value was calculated following the procedure described for the DPPH assay.

2.3.2.3. Ferric reducing/antioxidant potential (FRAP) assay. The FRAP solution was freshly prepared by mixing an acetate buffer at a pH of 3.6 (a), 20 mM of a ferric chloride solution (b) and 10 mM of a tripyridyl-s-triazine (TPTZ) solution (c) in a 10:1:1 (a:b:c) ratio. The sample solution (50 μl) was added to the FRAP reagent (950 μl). The mixture was incubated for 30 min at room temperature, and the absorbance was measured at 593 nm. The measurement was compared to a standard curve for $FeSO_4{\cdot}H_2O$ solutions and expressed as an EC_1 value, which indicates that the concentration of antioxidant in the reactive system has a ferric-TPTZ reducing ability equivalent to that of 1 mM of $FeSO_4{\cdot}H_2O$.

2.3.2.4. Metal ion chelating assay. The ferrous ion-chelating potential of the GM extract was investigated according to the method of Decker and Welch (1990). The ferrous ion-chelating ability was monitored by the absorbance of the ferrous iron–ferrozine complex at 562 nm. Briefly, the reaction mixture was composed of varying concentrations of the GM extract, $FeCl_2$ (2 mM) and ferrozine (5 mM) and adjusted to a total volume of 0.8 ml with water, shaken well and incubated for 10 min at room temperature. The absorbance was then measured at 562 nm. The percent chelating activity was then calculated following Eq. (1), and the IC_{50} value was calculated following the procedure described for the DPPH assay.

2.3.3. Determination of total phenolic content

To ensure that every batch of the extract has uniformity and consistency for the exhibited biological effects, the total phenolic and tannic acid content and the extraction yield were determined. The amounts of phenolic compounds in the extracts were determined using the Folin–Ciocalteu method, which was adapted from Singleton et al. (1999), and gallic acid was used as the standard phenolic compound. Fifty-microliter aliquots of the extracts (1 mg/ml) were added to a mixture of 2.5 ml of 10% Folin–Ciocalteu reagent and 2 ml of 7.5% Na_2CO_3. After incubation at 45 °C for 30 min, the absorbance was measured at 765 nm. A linear dose–response regression curve was generated using the absorbance reading of gallic acid. The content of total phenolic compounds in the extract was expressed as grams of gallic acid equivalent per 100 gram of dry weight (g GAE/100 g) of extracts.

2.3.4. Determination of total tannins content

The total tannins content in the extracts was determined using the method that was adapted from Silber and Fellman (2006). First, 2 mg of bovine serum albumin was mixed with 1 ml of the sample extract at a concentration of 1 mg/ml and then maintained at room temperature for 20 min. Then, the mixtures were centrifuged, and the sediment was dissolved with 0.1% sodium dodecyl sulfate (2 ml), triethanolamine (2 ml) and 10 mM $FeCl_3$ (1 ml). The absorbances of the suspensions were measured at 510 nm. The calibration curve was established using standard tannic acid. The content of total tannin in the extract was expressed as grams of tannic acid equivalent per gram of dry weight (g TAE/100 g) of extracts.

2.4. Preparations of GM extracts loaded chitosan-based nanofiber mats

The 2% (w/v) chitosan (CS) solution was prepared by dissolving CS and EDTA in distilled water at a weight ratio of 2:1. The 10% (w/v) PVA solution was prepared by dissolving PVA in distilled water at 80 °C, followed by stirring for 4 h. The CS-EDTA solution was mixed with a PVA solution at a weight ratio of 30/70. GM extracts (containing 1, 2 and 3 wt% α-mangostin to polymer) were added into the 30/70 CS-EDTA/PVA solution, and then, the solution was stirred for 24 h. The viscosity, conductivity and surface tension of the solutions were measured. The electrospinning solution was contained in a 5 ml glass syringe connected with a 20-gauge stainless steel needle (diameter = 0.9 mm) at the nozzle. The needle was connected to the positive polarity emitting electrode of a Gamma High Voltage Research device. The electric potential was fixed at 15 kV. The nanofibers were collected as-spun on an aluminum sheet that was wrapped on a rotating collector. The solution feed was driven by a syringe pump, and the rate was fixed at 0.25 ml/h during spinning. The solution was electrospun at room temperature, and the collection distance was fixed at approximately 20 cm. The process duration was fixed at 24 h to provide mats with a 20–30 μm thickness.

2.5. Characterizations of nanofiber mats

The morphology and diameter of the nanofiber mats were determined using scanning electron microscopy (SEM, Camscan Mx2000, England). For this process, a small section of the nanofiber mats was sputtered with a thin layer of gold before the SEM observations. The average diameter and diameter distribution of the nanofiber mats were analyzed by randomly measuring the diameters of the nanofibers at 100 different points from the SEM images using image analysis software (JMicroVision V.1.2.7, Switzerland).

The chemical structure of the nanofiber mats was characterized using a Fourier transform infrared spectrophotometer (FT-IR, Nicolet 4700, Becthai, USA) with a wave number range of 400–4000 cm^{-1}. The thermal behavior of the nanofiber mats was evaluated by differential scanning calorimeter (DSC, Pyris Sapphire DSC, PerkinElmer Instrument, USA) under an atmosphere of nitrogen. DSC traces were recorded from 25 to 250 °C at a heating rate of 5 °C/min.

The mechanical properties of the nanofiber mats were evaluated using a texture analyzer (TA.XT plus, Stable Micro Systems, UK) with a 5 kg load cell equipped with a tensile grips holder. The samples were cut into a rectangular shape (5–25 mm). The thicknesses of these samples ranged from 20 to 30 μm.

Author's personal copy

The swelling degree of the nanofiber mats were investigated in a phosphate buffer solution at a pH of 7.4 at room temperature for 1 h according to Eq. (2):

$$\text{Degree of swelling} \quad (\%) = \frac{M - M_d}{M_d} \times 100 \tag{2}$$

where M is the weight of each sample after immersion in the buffer solution for 1 h and M_d is the initial weight of the sample in its dry state.

The loading efficacy of the GM extracts into the CS-EDTA/PVA nanofiber mats was determined by submerging the mats (5 mg) into 5 ml of an acetate buffer (pH 5.5) and methanol (50:50) for 24 h. Then, 1 ml of the solution was analyzed using HPLC to determine the amount of α-mangostin, which is used as a maker in the nanofiber mats, as mentioned in Section 2.3.1. The amount of α-mangostin was used to calculate the amount of GM extracts in the nanofiber mats. The % loading efficacy was calculated using Eq. (3):

$$\text{Loading efficacy} \quad (\%) = \left(\frac{L_a}{L_t}\right) \times 100 \tag{3}$$

where L_a is the amount of the GM extracts that are embedded in the nanofibers and L_t is the theoretical amount of GM extracts (obtained from the feeding condition) incorporated into the nanofibers.

The antioxidant activity of the CS-EDTA/PVA nanofiber mats loaded with the GM extracts was investigated as described in Section 2.3.

2.6. In vitro release study

The release characteristics of the CS-EDTA/PVA nanofiber mats loaded with GM extracts were investigated using Franz's diffusion cells with a water jacket connected to a water bath at 37 °C; each cell had a volume of 6.5 ml and an effective diffusion area of 2.43 cm^2. The receiver compartments were filled with an acetate buffer (pH 5.5) and methanol (50:50) and stirred with a Teflon magnetic stirrer at 600 rpm. The nanofiber mats were cut with an equal diameter effective diffusion area and were mounted between two half cells of the diffusion cells. At a given time interval, an aliquot (1.0 ml) of the receiver solution was withdrawn and replaced with the same volume of fresh medium to maintain a constant volume. The amount of GM extracts in the sample solutions was analyzed by HPLC. The obtained data were carefully analyzed to determine the cumulative amount of GM extracts released from the specimens at each immersion time point. The experiments were conducted in triplicate.

2.7. Indirect cytotoxicity

The cytotoxicity of the nanofiber mats was evaluated based on a procedure adapted from the ISO10993-5 standard test method (indirect contact). The nanofiber mats were sterilized with UV radiation for 1 h. The mats were then immersed in a serum-free medium (SFM; containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 1% (v/v) L-glutamine, 1% (v/v) lactalbumin and 1% (v/v) antibiotic and antimycotic formulation) in an incubator for 24 h to produce different concentrations of extraction media (1, 2.5, 5, 7.5 and 10 mg/ml). Normal human foreskin fibroblast (NHF) cells were plated in 100 μl of DMEM, which was supplemented with 10% FBS, at a density of 8000 cells/well in 96-well plates. When the cultures reached confluency (typically 48 h after plating), the varying concentrations of the tested extraction media were replaced, and the cells were re-incubated for 24 h. After treatment, the tested extraction solutions were removed. Finally, the cells were incubated with 100 μl of a MTT-containing medium (1 mg/ml) for 4 h. The medium was removed, the cells were rinsed with PBS (pH 7.4), and the formazan crystals that formed in living cells were dissolved in 100 μl of dimethylsulfoxide per well. The relative cell viability (%) was calculated based on the absorbance at 550 nm using a microplate reader (Universal Microplate Analyzer, Model AOPUS01 and AI53601, Packard BioScience, CT, USA). The viability of the non-treated control cells was defined as 100%.

2.8. Antibacterial activity

The antibacterial activity of the nanofiber mats was tested against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 6538P and *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 10536. For the minimum inhibitory concentration (MIC) test, *S. aureus* and *E. coli* were 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 was approximately 1×10^6 cfu/ml, and it was then pipetted into a 24 well plate at a concentration of 1 ml/well. The different weights of the nanofiber mats (0.25–5 mg) were placed into the wells that contained the bacterial suspension and incubated at 37 °C for 24 h. The MIC was defined as the minimum concentration of mats where no growth was observed after 24 h of incubation. The optical density (OD) at 550 nm was measured using a microplate reader. For determining the minimum bactericidal concentration (MBC), the mixtures from the wells with no growth (100 μl) were spread onto agar plates for the MBC determination. The MBC was defined as the minimum concentration of mats where no colony growth was observed on the agar plates after 24 h of incubation at 37 °C. The MIC and MBC determinations were conducted in triplicates, and 1 mg/ml penicillin was used as a positive control.

2.9. Wound healing test

This study was approved by an Investigational Review Board (Animal Studies Ethics Committee, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Approval No. 2-2553). Male Wistar rats (240–280 g) were used in this study. After anesthetization, the neck area of the dorsal of each rat was shaved and wiped with 70% ethanol. Two wounds were created on the neck area of each rat using a skin biopsy punch (wound area of 0.8 cm^2). The wound was treated by placing an equal size of nanofiber mat, gauze and commercial antibacterial gauze dressing (Sofra-tulle®, Sanofi Aventis, UK) ($n = 6$) over it without removing the test material throughout the study period. The area of the wound was measured daily using the planimetry method until the wound completely healed. The percentage of wound closure is defined as Eq. (4).

$$\text{Wound closure} \quad (\%) = \left(1 - \frac{A}{A_i}\right) \times 100 \tag{4}$$

where A_i is the initial wound area and A is the wound area after a fixed time interval.

2.10. Histological examination

The rats were sacrificed at day 11 after operation. The trauma samples were cut and fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin, and serially sectioned at 5 μm. The nuclei of the sections were stained with hematoxylin, rinsed in running tap water, differentiated with 0.3% acid alcohol, rinsed in running tap water, stained with eosin for 2 min, then dehydrated, cleared and mounted. The hematoxylin–eosin stained sections were observed under a light microscope (Nikon Inverted-Eclipse TE2000-U, Japan).

2.11. Stability studies

The stability of the CS-EDTA/PVA nanofiber mats loaded with GM extracts was monitored up to 6 months under stress conditions

Author's personal copy

Table 1
The contents of bioactive compounds, antioxidant activity of GM extracts. Each value represents the mean ± S.D. from three independent experiments.

Test	GM extracts
Total phenolics (g GAE/100 g of extract)	26.46 ± 0.22
Total tannins (g TAE/100 g of extract)	34.05 ± 0.05
α-Mangostin (% (w/w) of extract)	13.20 ± 0.20
Antioxidant activities	
DPPH IC_{50} (μg/ml)	14.66 ± 0.16
ABTS IC_{50} (μg/ml)	1.67 ± 0.03
FRAP EC_1 (ng/ml)	0.33 ± 0.001
Metal ion chelating IC_{50} (μg/ml)	No

(45 °C 75%RH) and compared to normal conditions (25 °C 40%RH). The content of α-mangostin, the antioxidant activity (DPPH assay) and tensile strength of the nanofiber mats were determined every 1 month. The physical appearance and morphology of the nanofiber mats were investigated using SEM every 3 months. The % of GM extracts and the tensile strength remaining in the mats was calculated as Eq. (5).

$$\text{Remaining GM extracts or tensile strength } (\%) = \left(\frac{V}{V_i}\right) \times 100 \quad (5)$$

where V_i is the initial amount of GM extracts or tensile strength and V is the amount of GM extracts or tensile strength after a fixed sampling time.

2.12. Statistical analysis

All experiment data were collected from triplicate samples and are expressed as the mean ± standard deviation (S.D.). Statistically significant differences in cell viability, wound area and stability study were examined using the Student's *t*-test. The significance level was set at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Standardizations of GM extracts

The GM extracts were standardized before being loaded into the CS-EDTA/PVA solution. The total phenolics, total tannins, and α-mangostin content in the GM extracts and the antioxidant activity are shown in Table 1. The total phenolics and total tannins were 26.46 ± 0.22 g GAE/100 g of extract and 34.05 ± 0.05 g GAE/100 g of extract, respectively. The content of α-mangostin in the GM extracts was 13.20 ± 0.2% (w/w). The antioxidant activities of the GM extracts solution were determined with DPPH, ABTS, FRAP and metal ion chelating. The IC_{50} values for the DPPH and ABTS assay were 14.66 ± 0.16 μg/ml and 1.67 ± 0.03 μg/ml, respectively. The EC_1 value for the FRAP assay was 0.33 ± 0.001 ng/ml. For metal ion chelating, the GM extracts did not exhibit the chelating ability. These results were in agreement with Pothitirat et al. (2009a), who reported that the total phenolics and total tannins of a 95% (v/v) ethanol solution containing GM extracts were 28.88 ± 0.73 g GAE/100 g of extract and 36.66 ± 0.43 g GAE/100 g of extract, respectively. The α-mangostin content in a 95% (v/v) ethanol solution containing GM extracts was 13.63 ± 0.06% (w/w) (Pothitirat et al., 2009a). These results confirm that the 70% (v/v) acetone extractions still contained α-mangostin, phenolic compounds, tannins and antioxidant properties.

Table 3
Average fiber diameter and % loading efficacy of the GM extract (0, 1, 2 and 3 wt% α-mangostin to polymer) loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats. Each value represents the mean ± S.D. from three independent experiments.

CS-EDTA/PVA fiber mats	Fiber diameter (nm)	Loading efficacy (%)
0% α-mangostin	205.5 ± 36.06	–
1% α-mangostin	207.8 ± 34.30	40.69 ± 2.30
2% α-mangostin	220.7 ± 36.74	41.97 ± 3.25
3% α-mangostin	251.3 ± 47.95	43.86 ± 0.11

3.2. Electrospinning

The CS-EDTA/PVA (30/70) solution containing various amount of GM extracts (containing 0, 1, 2 and 3 wt% α-mangostin to polymer) was prepared. The viscosity, conductivity and surface tension of the solutions were measured and are shown in Table 2. When the amount of GM extracts was greater than 3 wt% α-mangostin, the properties of the solution were degraded, such as very low viscosity, and the fiber mats could not form. There were many beads in the structure, and it became a droplet on the collector. Fig. 2 shows the SEM image and the diameter distributions of the CS-EDTA/PVA nanofiber mats with and without various amounts of GM extracts. The SEM images revealed that all of the fibers were smooth, and did not contain the crystals of GM extracts in their structure. This result indicated that the GM extracts were well incorporated within the fibers. The diameters of the fiber mats loaded with GM extracts were in the nanometer range. The diameter distributions of these fibers are shown in Fig. 2. The diameter of the nanofiber and the % loading efficacy of the GM extracts in the nanofiber mats slightly increased from 205.56 to 251.35 nm and from 40.69 to 43.86%, respectively, when the amounts of GM extracts were increased (Table 3). This result indicates the limited incorporation of GM extracts into the nanofiber mats. The solution parameters of the CS-EDTA/PVA solution loaded with GM extracts were slightly altered and did not affect the morphology of the fibers (Table 2). This result was in accordance with our previous study, which indicated that the incorporation of GM extracts into the electrospun PVA did not affect their morphology because the surface of the PVA fibers loaded with GM extracts was also smooth, and the average diameters of both the bare and the PVA fibers loaded with GM extracts ranged between 140.7 and 197.3 nm (Opanasopit et al., 2008). In addition, loading the CS-EDTA/PVA fibers with lysozymes did not affect their morphology, and the average diameters were in the range of 143–209 nm (Charernsriwilaiwat et al., 2012a).

3.3. Characterizations

The FT-IR spectra of the CS-EDTA/PVA nanofiber mats with and without different amount of GM extracts and α-mangostin powder are shown in Fig. 3a. The spectrum of the 0 wt% α-mangostin fiber mats exhibited absorption peaks at 3360, 2940, 1650, 1430 and

Table 2
Solution parameters before electrospinning of CS-EDTA/PVA solution with and without GM extracts (0, 1, 2 and 3 wt% α-mangostin to polymer). Each value represents the mean ± S.D. from three independent experiments.

CS-EDTA/PVA solution	Viscosity (mPa s)	Conductivity (μS cm^{-1})	Surface tension (mN m^{-1})
0% α-mangostin	254.7 ± 0.76	1006.0 ± 7.55	55.5 ± 0.28
1% α-mangostin	252.4 ± 2.39	1035.0 ± 2.65	53.9 ± 0.57
2% α-mangostin	245.9 ± 1.37	1075.7 ± 1.53	52.1 ± 0.31
3% α-mangostin	239.9 ± 1.64	1114.7 ± 8.74	49.3 ± 0.15

Author's personal copy

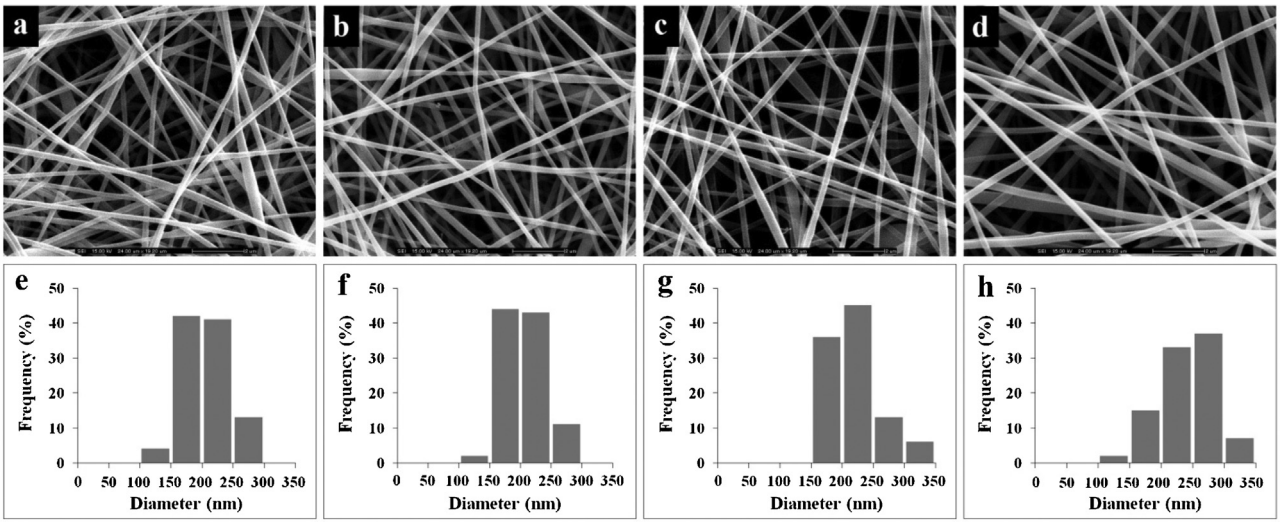


Fig. 2. The SEM image and diameter distribution of the GM extracts (wt% α-mangostin to polymer) loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats with different amount of GM extract: (a and e) 0 wt% α-mangostin, (b and f) 1 wt% α-mangostin, (c and g) 2 wt% α-mangostin and (d and h) 3 wt% α-mangostin.

1095 cm^{-1}, which were attributed to the ν(O—H), ν_s(CH_2), ν(C=O), δ (CH—O—H) and ν (C—O), respectively (Charernsriwilaiwat et al., 2011). In the spectrum for the pure α-mangostin powder, the dominant absorption peaks were observed at 3422, 1642 and 1284 cm^{-1}, which correspond to the phenolic, carbonyl and methoxy groups, respectively (Ghazali et al., 2010). The peak that was observed for the α-mangostin powder was also observed in spectra of the 1–3 wt% α-mangostin loaded nanofiber mats. The results indicated that α-mangostin in the GM extracts was well incorporated into the nanofiber mats.

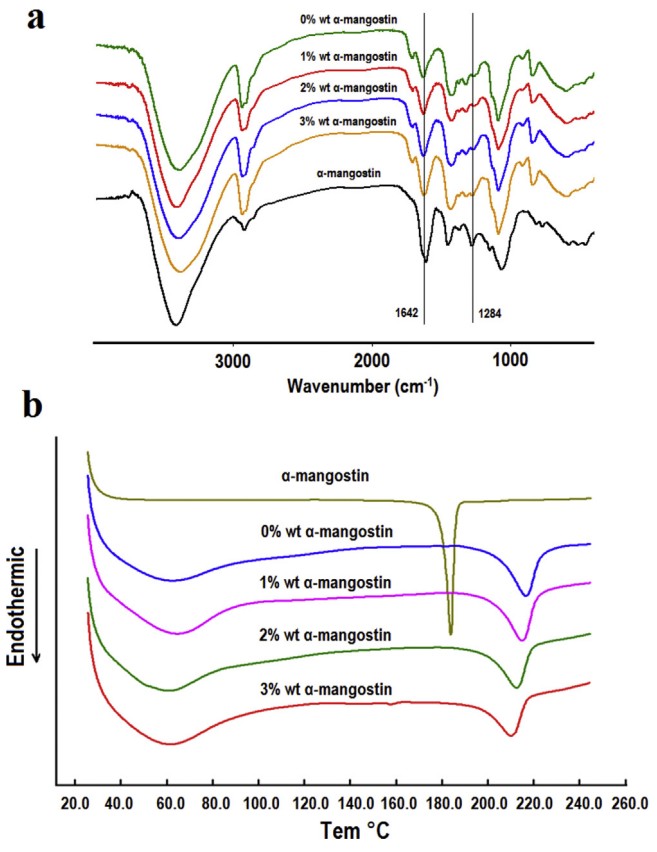


Fig. 3. (a) FT-IR spectra and (b) DSC thermogram of the GM extracts loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats with different amount of GM extract (0, 1, 2 and 3 wt% α-mangostin to polymer) and pure α-mangostin powders. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Fig. 3b shows the DSC thermograms of the CS-EDTA/PVA nanofiber mats with and without different amounts of the GM extracts and the α-mangostin powder. The endothermic curves of the nanofiber mats indicated that the melting point slightly decreased from approximately 216.9 °C to 215.2, 212.4 and 210.2 °C when the amount of GM extracts increased to 1, 2 and 3 wt% α-mangostin, respectively. For the pure α-mangostin powder, the melting point was observed at approximately 183.7 °C, which is lower than that of the nanofiber mats. This result indicates that the amount of GM extracts in the fiber mats does not affect their thermal behavior.

The mechanical properties of the wound dressing are important when interacting with the wound; it must possess properties similar to those of skin to function properly until the wound is healed. The mechanical properties in terms of the tensile strength, strain at the maximum and the Young's modulus of the CS-EDTA/PVA nanofiber mats with and without different amounts of GM extracts were characterized, and the results are presented in Table 4. The tensile strength of all of the tested nanofibers mats was in the range of 4.57–5.11 MPa, and the average value was 4.76 MPa. When the amount of the GM extracts increased, the tensile strength of the fiber mats slightly decreased. The strain at the maximum of all of the tested nanofibers mats was in the range of 7.06–7.61 MPa, and the average value was 7.34 MPa. The Young's modulus of all of the tested nanofibers mats was in the range of 51.9–87.8 MPa, and the average value was 67.7 MPa. The results indicated that the GM extracts in the fiber mats exerted less effects on the mechanical properties of the mats. These findings illustrated that these CS-EDTA/PVA fiber mats loaded with GM extracts have the potential to be developed as a wound dressing.

The swelling of the fiber mats is the most important property that characterizes its use for wound dressing applications. Fig. 4 shows the degree of swelling of the CS-EDTA/PVA nanofiber mats with and without different amounts of GM extracts after immersion in a phosphate buffer solution (pH 7.4) at room temperature for 1 h. The bare nanofiber mats (0 wt% α-mangostin to polymer) demonstrated a swelling degree of 134.53%, which slightly decreased with increasing amounts of the GM extracts. The swelling degree of the GM extracts (1, 2 and 3 wt% α-mangostin to polymer) loaded

Author's personal copy

Table 4
Mechanical properties of the GM extracts (0, 1, 2 and 3 wt% α-mangostin to polymer) loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats. Each value represents the mean ± S.D. from three independent experiments.

CS-EDTA/PVA fiber mats	Tensile strength (MPa)	Strain at maximum (%)	Young's modulus (MPa)
0% α-mangostin	5.11 ± 0.33	7.06 ± 3.06	60.8 ± 16.0
1% α-mangostin	4.77 ± 0.56	7.33 ± 2.97	51.9 ± 0.9
2% α-mangostin	4.59 ± 0.16	7.61 ± 0.45	70.4 ± 36.7
3% α-mangostin	4.57 ± 0.17	7.36 ± 0.55	87.8 ± 34.2

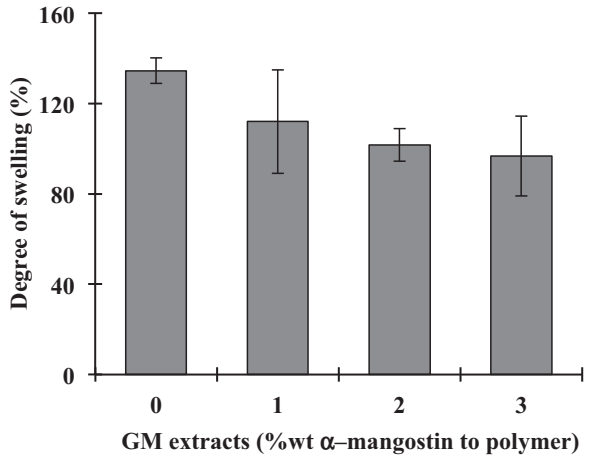


Fig. 4. Degree of swelling (%) of the GM extracts loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats with different amount of GM extract (0, 1, 2 and 3 wt% α-mangostin to polymer). The data are expressed as mean ± S.D. from three independent experiments.

fiber mats were 111.96, 101.7 and 96.67%, respectively. Chitosan is a hydrophilic polymer, and water diffuses very rapidly through this material before its degradation (Baskar and Kumar, 2009). The GM extract is hydrophobic compound; therefore, it might affect the swelling properties of the chitosan-based nanofiber mats by increasing the hydrophobicity of the mats, which caused the decrease in the swelling degree.

3.4. In vitro release study

The release profile of α-mangostin from the CS-EDTA/PVA nanofiber mats loaded with GM extracts was investigated using Franz's diffusion cells. Fig. 5 shows the α-mangostin release characteristics from the nanofiber mats with different amounts of GM extracts (containing 1, 2 and 3 wt% α-mangostin to polymer). The result indicates that the α-mangostin is rapidly released. The percentage of cumulative α-mangostin release reaches approximately 80% within 60 min. This result reveals that the α-mangostin was burst released from the nanofiber mats. The maximum total amount of α-mangostin released from the nanofiber mats within 8 h was approximately 90%. This result indicated that α-mangostin could easily release from the chitosan-based nanofiber mats, and the α-mangostin release patterns could be explained by both the mechanism of polymer swelling and erosion (Kim et al., 2007). The important factor that controls the release of substances from the polymer matrix is the swelling behavior. As the chitosan-based matrix began to swell, molecules of drug were solvated and practically leached out from the matrix very rapidly. Another factor was the erosion of the chitosan-based matrix within the medium (Taepaiboon et al., 2006).

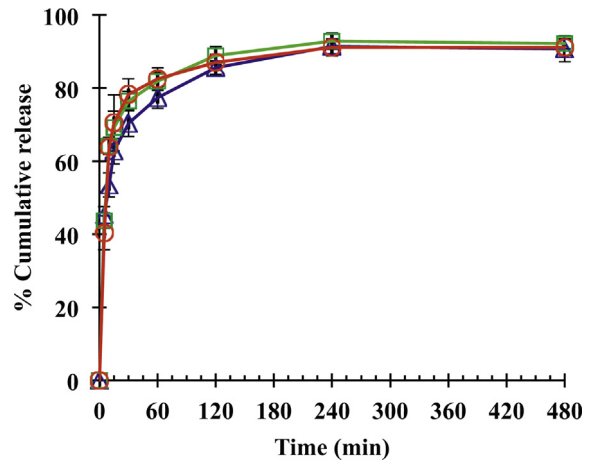


Fig. 5. α-Mangostin release profiles from the GM extracts loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats with different amounts of GM extract: (△) 1 wt% α-mangostin, (□) 2 wt% α-mangostin and (○) 3 wt% α-mangostin. The data are expressed as mean ± standard deviation from three independent experiments.

3.5. Indirect cytotoxicity

The toxicity of the GM extracts (containing 0, 1, 2 and 3 wt% α-mangostin to polymer) loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats were investigated on NHF for 24 h using a MTT assay. Fig. 6 shows the cell viability of various concentrations of the extract medium from the nanofiber mats loaded with GM extracts. There was a significant decrease in the cell viability when the NHF cells were incubated with higher concentrations (7.5–10.0 mg/ml) of the extraction media of the chitosan-based nanofiber mats containing GM extracts 1, 2 and 3 wt% α-mangostin when compared with the control ($p < 0.05$). This result might be because the amount of GM extracts was very high and were toxic to fibroblast cells. However, the cell viability was not statistically different from the control in the concentration range of 1–5 mg/ml of all the GM extracts loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats extract medium. The results

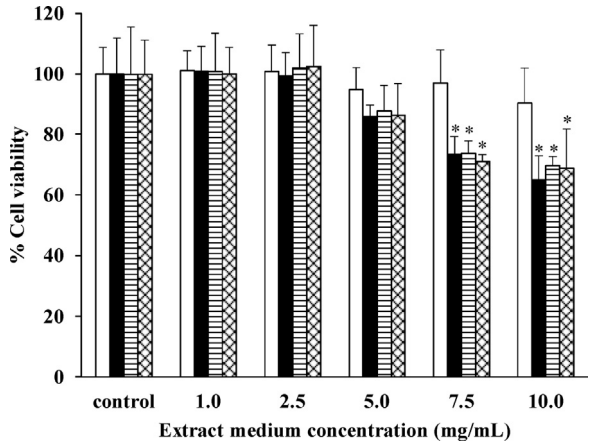


Fig. 6. The percentage cell viability in NHF cells at varying concentration of GM extract loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats: (□) 0 wt% α-mangostin, (■) 1 wt% α-mangostin, (▤) 2 wt% α-mangostin and (▦) 3 wt% α-mangostin in NHF cells. Each value represents the mean ± standard deviation of five wells. *Statistically significant ($p < 0.05$).

Author's personal copy

Table 5
Minimum inhibition concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) of GM extracts (0, 1, 2 and 3 wt% α-mangostin to polymer) loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats against *S. aureus* and *E. coli*. Each value represents the mean ± S.D. from three independent experiments.

CS-EDTA/PVA fiber mats	MIC (mg/ml)		MBC (mg/ml)	
	S. aureus	*E. coli*	*S. aureus*	*E. coli*
0% α-mangostin	5.0	5.0	5.0	5.0
1% α-mangostin	2.0	2.0	2.0	2.0
2% α-mangostin	1.0	1.0	1.0	1.0
3% α-mangostin	0.5	0.5	0.5	0.5

indicated that GM extracts (1, 2 and 3 wt% α-mangostin) loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats were safe at the concentrations of 1–5 mg/ml of the mats.

3.6. Antibacterial activity

The antibacterial activities of the GM extracts have been reported against both gram-positive and gram-negative bacteria (Palakawong et al., 2010; Sundaram et al., 1983). α-Mangostin in GM extracts also has potent inhibitory effect against methicillin-resistant *S. aureus* (Chomnawang et al., 2009). The GM extracts (contain 0, 1, 2 and 3 wt% α-mangostin to polymer) loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats were submerged in the bacteria suspension for 24 h. The fiber mats loaded with GM extracts exhibited concentration dependent antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli*. The 1, 2 and 3 wt% α-mangostin GM extracts loaded fiber mats inhibited *S. aureus* and *E. coli* growth at 2, 1 and 0.5 mg/ml, respectively. The 0 wt% α-mangostin mats also inhibited bacteria growth at 5 mg/ml. The MIC and MBC of the CS-EDTA/PVA nanofiber mats loaded with GM extracts are shown in Table 5. The results indicated that the strength of the antibacterial activities of the fiber mats loaded with GM extracts were dependent on the amount of the GM extract. The antibacterial activity concentration of these nanofiber mats was less than 5 mg/ml, which is non-toxic to fibroblast cells. This result indicated that the GM extract still retained its antibacterial activity when it was processed during electrospinning. When the mats containing the GM extracts were submerged in the bacteria suspension, the extracts were released from the mats and exhibited an antibacterial effect. Furthermore, the mats were corroded, and chitosan and EDTA were released into the media (El-Sharif and Hussain, 2011). Finally, the antibacterial activity was enhanced by the GM extract, chitosan and EDTA. The antibacterial mechanism of chitosan is generally attributed to the positive charge of the chitosan molecule, which interferes with the negative charge on the surface of the bacteria. Chitosan could interact with the membrane of the bacteria to alter cell permeability (Sudarshan et al., 1992). Chitosan may also have intracellular targets. Chitosan molecules that dissociated in the solution could bind with DNA and inhibit the synthesis of mRNA and proteins (Rabea et al., 2003).

3.7. Wound healing test

In the wound healing study, two wounds with areas of 0.8 cm^2 were produced on the neck area of the dorsal of each rat. Fig. 7 shows the % wound closure at 1, 4, 7 and 10 days after treatment with gauze (negative control), commercial antibacterial gauze dressing (Sofra-tulle®) (positive control), and the GM extracts (0 and 3 wt% α-mangostin to polymer) loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats. The wound closures gradually increased and fully recovered within 11 days for all treatments. At days 1 and 4 after the treatment, the wound healing with the 3 wt% α-mangostin fiber mats

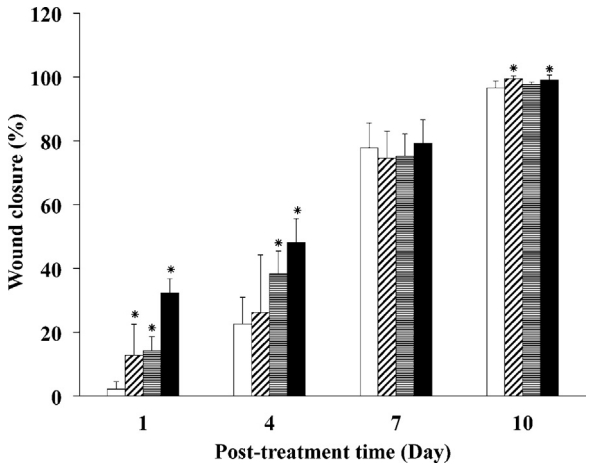


Fig. 7. Wound closure (%) at 1, 4, 7 and 10 days after treatment with (□) gauze (negative control), (▩) commercial antibacterial gauze dressing (Sofra-tulle®) (positive control), (▥) 0 wt% α-mangostin and (■) 3 wt% α-mangostin GM extracts loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats. The data are expressed as mean ± standard deviation from six independent experiments. *Statistically significant ($p < 0.05$).

dressing was the fastest ($p < 0.05$); this mats exhibited the highest % wound closure. At the first week after the operation, the treatment with the 3 wt% α-mangostin fiber mats resulted in faster wound healing than that of gauze and the commercial antibacterial gauze dressing treatment. This result might be due to the potential activities, such as antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial of the GM extract, especially α-mangostin, in fiber mats, which rapidly released from the fibers to assist in the acceleration of the healing process (Pedraza-Chaverri et al., 2008). The N-acetyl-D-glucosamine and EDTA produced from the degradation of the CS-EDTA/PVA nanofiber mats also enhanced the wound healing rate by promoting fibroblast proliferation (Jayakumar et al., 2011; Paul and Sharma, 2004) and its antibacterial properties (El-Sharif and Hussain, 2011). The % wound closure of all of the treatments until recovery was similar, which suggests that wound healing was progressed by mechanism of the body that is independent from the effects of the treatment. This result is related to a previous study, the lysozyme loaded chitosan-based nanofiber mats, which exhibited better wound healing activity than gauze at 1–4 days after treatment (Charernsriwilaiwat et al., 2012a).

The histological examination images of the skin wounds treated with different dressings at 11 days after initial operation by hematoxylin and eosin are shown in Fig. 8. In normal skin, the bundles of collagenous fibers are loose and wavy with few fibroblasts. During wound repair, fibroblasts play an important role through karyokinesis and proliferation, and synthesizing and secreting substantive collagenous fibers over the first 4 to 6 days, creating acestoma tissue with new capillary vessels. This process fills the wound with granulation tissue and provides the covering conditions for new epidermis (Liu et al., 2010). The wound treated with gauze, commercial antibacterial gauze dressing and the 0 wt% α-mangostin nanofiber mats were completely reepithelialized. However, the wound treated 3 wt% α-mangostin nanofiber mats were completely reepithelialized and almost healed, and the granulation tissues were nearly replaced by hair follicles. This result indicated that the CS-EDTA/PVA nanofiber mats loaded with GM extracts accelerated the healing rate.

3.8. Stability studies

The 3 wt% α-mangostin nanofiber mat was stored under normal conditions (25 °C 40%RH) and with a sample stored under stress conditions (45 °C 75%RH) for 6 months. Fig. 9 shows the

Author's personal copy

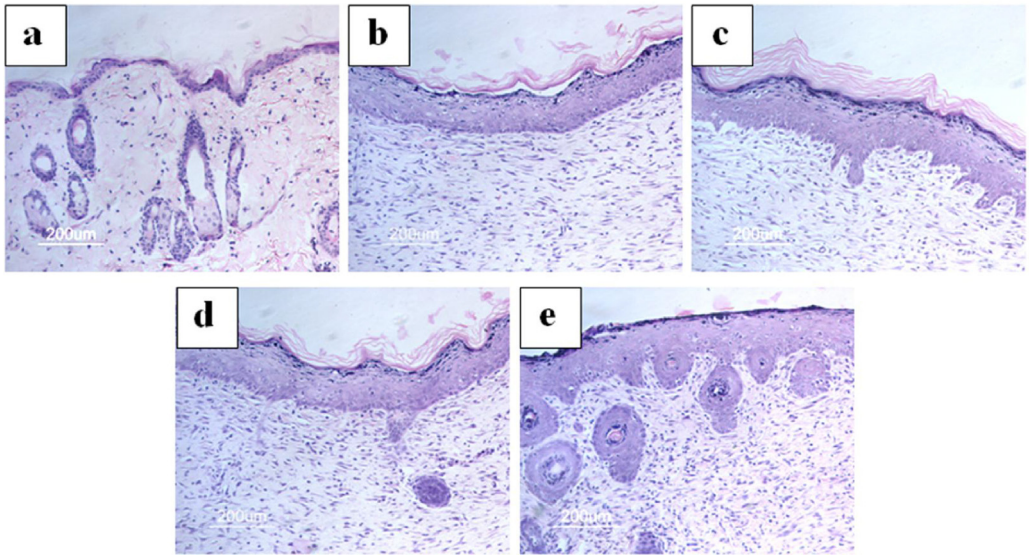


Fig. 8. Histological images of the wound skins at 11 days after treated with different wound dressing: (a) control (untreated skins), (b) gauze (negative control), (c) commercial antibacterial gauze dressing (Sofra-tulle®) (positive control), (d) 0 wt% α-mangostin and (e) 3 wt% α-mangostin GM extracts loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats.

appearance and the SEM images of the mats at initial, 3 and 6 months after storage in different conditions. The appearance of the mats maintained under the stress condition exhibited more color change (dark yellow) than those stored under normal conditions (pale yellow). However, the morphology observed using SEM images of the mats maintained under both conditions was similar. The fibers were smooth and did not contain crystals of the GM extracts in their structure after storage in either condition for 6 months. The physical and chemical stability of the mats are shown in Fig. 10. The average diameter and remaining α-mangostin (%) in the mats during storage under normal and stress conditions were not statistically different. The diameters of the mats after storing for 3 and 6 months were in the range of 250–260 nm. The amount of α-mangostin remaining in the fiber mats was decreased from 90% in the first month to 65% after 6 months. The α-mangostin was stable under light, heat and basic hydrolysis (Yodhnu et al., 2009). Pothitirat et al. (2009b) reported that the *G. mangostana* fruit rind extract maintained the content of α-mangostin, antiradical and anti-acne when kept at different temperature (4–8, 25–28 and 45 °C) for 120 days (Pothitirat et al., 2009b). This result corresponds to current result, where the content of α-mangostin in the nanofiber mats remained at approximately 90% for 3 months. However, the antioxidant activity and the remaining tensile strength (%) of the mats stored under stress conditions exhibited worse properties than the mats stored under normal conditions. The results obtained from this stability study led us to assume that the better stability of the GM loaded fiber mats is the consequence of the lower temperature storage.

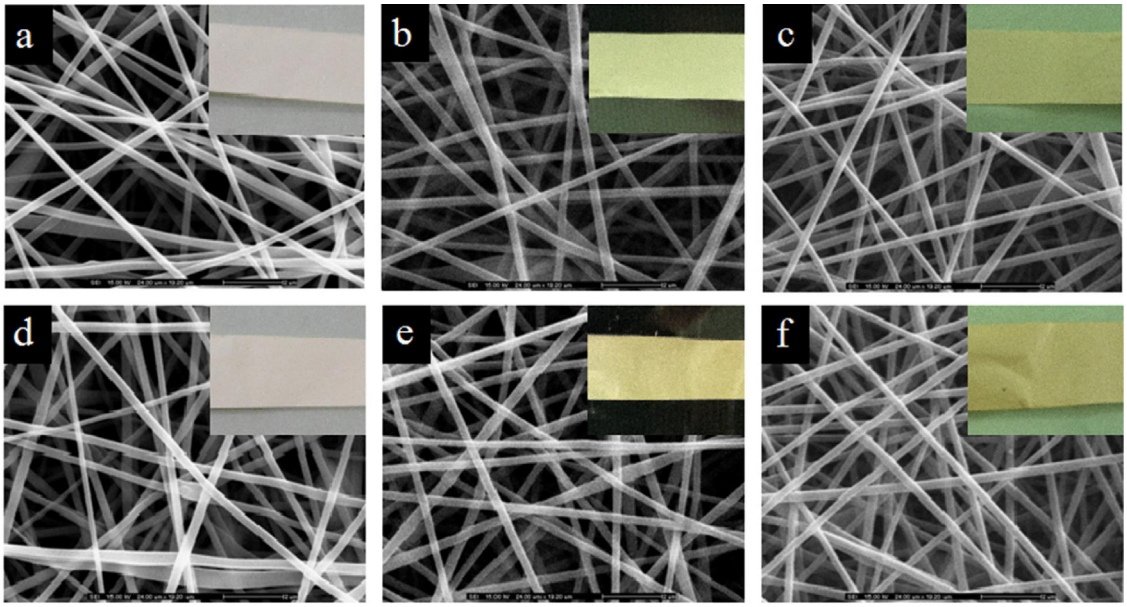


Fig. 9. The SEM image and the appearance of the 3 wt% α-mangostin GM extracts loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats when stored under normal conditions (a, b and c) (25 °C 40%RH) compared with stress conditions (d, e and f) (45 °C 75%RH) for 0, 3 and 6 months, respectively.

Author's personal copy

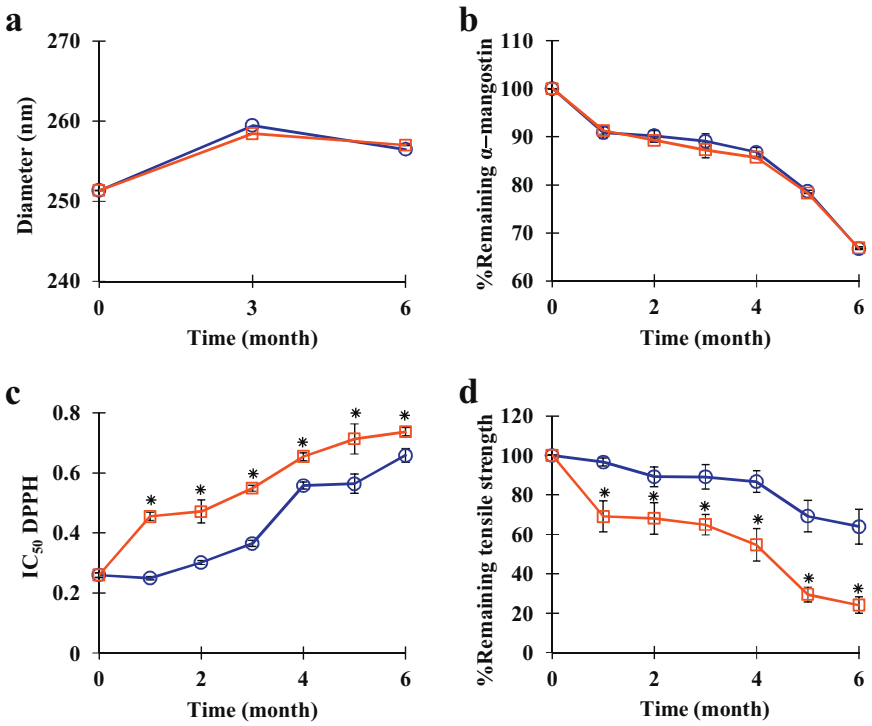


Fig. 10. The properties of 3 wt% α-mangostin GM extracts loaded CS-EDTA/PVA nanofiber mats: (a) average diameter, (b) remaining α-mangostin (%), (c) IC_{50} on DPPH assay and (d) remaining tensile strength (%) when stored under normal conditions (○) (25 °C 40%RH) compared with stress conditions (□) (45 °C 75%RH) for 6 months.

4. Conclusion

In the present study, GM extracts were incorporated into CS-EDTA/PVA nanofiber mats using the electrospinning process. The fiber mats provided suitable tensile strength and swelling properties. These mats are non-toxic and α-mangostin is rapidly released, which retains the antioxidant and antibacterial activity, and accelerates the wound healing process. These biodegradable, biocompatible and antibacterial electrospun nanofiber mats have promising potential for use as effective wound dressings.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Commission of Higher Education (Thailand), the Thailand Research Funds through the Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0183/2550)and Project No. DBG5480004 for financial support.

References

Baskar, D., Kumar, T.S.S., 2009. Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films. Carbohydr. Polym. 78, 767–772.
Cai, Z.-x., Mo, X.-m., Zhang, K.-h., Fan, L.-p., Yin, A.-l., He, C.-l., Wang, H.-s., 2010. Fabrication of chitosan/silk fibroin composite nanofibers for wound-dressing applications. Int. J. Mol. Sci. 11, 3529–3539.
Charernsriwilaiwat, N., Opanasopit, P., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., 2011. Fabrication and characterization of chitosan-ethylenediaminetetraacetic acid/polyvinyl alcohol blend electrospun nanofibers. Adv. Mater. Res. 195–196, 648–651.
Charernsriwilaiwat, N., Opanasopit, P., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., 2012a. Lysozyme-loaded, electrospun chitosan-based nanofiber mats for wound healing. Int. J. Pharm. 427, 379–384.
Charernsriwilaiwat, N., Opanasopit, P., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., Supaphol, P., 2010. Preparation and characterization of chitosan-hydroxybenzotriazole/polyvinyl alcohol blend nanofibers by the electrospinning technique. Carbohydr. Polym. 81, 675–680.
Charernsriwilaiwat, N., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., Opanasopit, P., 2012b. Electrospun chitosan/polyvinyl alcohol nanofibre mats for wound healing. Int. Wound J. (in press).
Charernsriwilaiwat, N., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., Opanasopit, P., 2012c. Preparation of chitosan-thiamine pyrophosphate/polyvinyl alcohol blend electrospun nanofibers. Adv. Mater. Res. 506, 118–121.
Chen, J.-P., Chang, G.-Y., Chen, J.-K., 2008. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects 313–314, 183–188.
Chen, L.-G., Yang, L.-L., Wang, C.-C., 2008. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. Food Chem. Toxicol. 46, 688–693.
Chomnawang, M.T., Surassmo, S., Wongsariya, K., Bunyapraphatsara, N., 2009. Antibacterial activity of Thai medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Fitoterapia 80, 102–104.
Cui, J., Hu, W., Cai, Z., Liu, Y., Li, S., Tao, W., Xiang, H., 2010. New medicinal properties of mangostins: analgesic activity and pharmacological characterization of active ingredients from the fruit hull of *Garcinia mangostana* L. Pharmacol. Biochem. Behav. 95, 166–172.
Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R.M., Chiellini, E., 2011. Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Prog. Polym. Sci. 36, 981–1014.
Decker, E.A., Welch, B., 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. J. Agric. Food Chem. 38, 674–677.
El-Sharif, A.A., Hussain, M.H.M., 2011. Chitosan–EDTA new combination is a promising candidate for treatment of bacterial and fungal infections. Curr. Microbiol. 62, 739–745.
Fitzgerald, R.H., Steinberg, J.S., 2009. Collagen in wound healing: are we onto something new or just repeating the past? Foot Ankle Online J. 2, 3.
Ghazali, S.A.I.S.M., Lian, G.E.C., Ghani, K.D.A., 2010. Chemical constituent from roots of *Garcinia mangostana* (Linn.). Int. J. Chem. 2, 134–142.
Heunis, T.D.J., Dicks, L.M.T., 2010. Nanofibers offer alternative ways to the treatment of skin infections. J. Biomed. Biotechnol. 2010, 1–10.
Ignatova, M., Manolova, N., Rashkov, I., 2007. Novel antibacterial fibers of quaternized chitosan and poly(vinyl pyrrolidone) prepared by electrospinning. Eur. Polym. J. 43, 1112–1122.
Jayakumar, R., Prabaharan, M., Kumar, P.T.S., Nair, S.V., Tamura, H., 2011. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. Biotechnol. Adv. 29, 322–337.
Kim, T.G., Lee, D.S., Park, T.G., 2007. Controlled protein release from electrospun biodegradable fiber mesh composed of poly(ε-caprolactone) and poly(ethylene oxide). Int. J. Pharm. 338, 276–283.
Liu, X., Lin, T., Fang, J., Yao, G., Zhao, H., Dodson, M., Wang, X., 2010. In vivo wound healing and antibacterial performances of electrospun nanofibre membranes. J. Biomed. Mater. Res. A 94A, 499–508.
Moongkarndi, P., Kosem, N., Kaslungka, S., Luanratana, O., Pongpan, N., Neungton, N., 2004. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangsotana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. J. Ethnopharmacol. 90, 161–166.
Muzzarelli, R.A.A., 2009. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. Carbohydr. Polym. 76, 167–182.

Author's personal copy

Opanasopit, P., Ruktanonchaiuracha, R., Suwantong, O., Panomsuk, S., Ngawhirunpat, T., Sittisombut, C., 2008. Electrospun poly(vinyl alcohol) fiber mats as carriers for extracts from the fruit hull of mangosteen. J. Cosmet. Sci. 59, 233–242.

Palakawong, C., Sophanodora, P., Pisuchpen, S., Phongpaichit, S., 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) parts and some essential oils. Int. Food Res. J. 17, 538–589.

Paul, W., Sharma, C.P., 2004. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. Trends Biomater. Artif. Organs 18, 18–23.

Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Orozco-Ibarra, M., Pérez-Rojas, J.M., 2008. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). Food Chem. Toxicol. 46, 3227–3239.

Pothitirat, W., Chomnawang, M.T., Supabphol, R., Gritsanapan, W., 2009a. 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, 442–447.

Pothitirat, W., Pithayanukul, P., Chomnawang, M.T., Supabphol, R., Gritsanapan, W., 2009b. Biological and chemical stability of mangosteen fruit rind extract. Funct. Plant Sci. Biotechnol. 3, 16–18.

Rabea, E.I., Badawy, M.E.-T., Stevens, C.V., Smagghe, G., Steurbaut, W., 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules 4, 1457–1465.

Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. Prog. Polym. Sci. 31, 603–632.

Silber, M.L., Fellman, J.K., 2006. A new tannin bioassay protocol uses a highly stable, hydrophobically associated protein-dye marker that allows rapid, accurate and low-cost tannin monitoring. Wine Business Monthly.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299, 152–178.

Sudarshan, N.R., Hoover, D.G., Knorr, D., 1992. Antibacterial action of chitosan. Food Biotechnol. 6, 257–272.

Sundaram, B.M., Gopalakrishnan, C., Subramanian, S., Shankaranarayanan, D., Kameswaran, L., 1983. Antimicrobial activities of *Garcinia mangostana*. Planta Med. 48, 59–60.

Taepaiboon, P., Rungsardthong, U., Supaphol, P., 2006. Drug-loaded electrospun mats of poly(vinyl alcohol) fibres and their release characteristics of four model drugs. Nanotechnology 17, 2317–2329.

Venugopal, J., Ramakrishna, S., 2005. Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology. Appl. Biochem. Biotechnol. 125, 147–157.

Wang, C.-C., Su, C.-H., Chen, C.-C., 2008. Water absorbing and antibacterial properties of N-isopropyl acrylamide grafted and collagen/chitosan immobilized polypropylene nonwoven fabric and its application on wound healing enhancement. J. Biomed. Mater. Res. A 84A, 1006–1017.

Weecharangsan, W., Opanasopit, P., Sukma, M., Ngawhirunpat, T., Sotanaphun, U., Siripong, P., 2006. Antioxidative and neuroprotective activities of extracts from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.). Med. Princ. Pract. 15, 281–287.

Williams, P., Ongsakul, M., Proudfoot, K., Croft, K., Beilin, L., 1995. Mangostin inhibits the oxidative modification of human low density lipoprotein. Free Radic. Res. 23, 175–184.

Yodhnu, S., Sirikatitham, A., Wattanapiromsakul, C., 2009. Validation of LC for the determination of α-mangostin in mangosteen peel extract: a tool for quality assessment of *Garcinia mangostana* L. J. Chromatogr. Sci. 47, 185–189.

Zahedi, P., Rezaeian, I., Ranaei-Siadat, S.-O., Jafari, S.-H., Supaphol, P., 2010. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. Polym. Adv. Technol. 21, 77–95.

Zhou, Y., Yang, D., Chen, X., Xu, Q., Lu, F., Nie, J., 2008. Electrospun water-soluble carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibrous membrane as potential wound dressing for skin regeneration. Biomacromolecules 9, 349–354.

international wound journal

International Wound Journal ISSN 1742-4801

ORIGINAL ARTICLE

Electrospun chitosan/polyvinyl alcohol nanofibre mats for wound healing

Natthan Charernsriwilaiwat, Theerasak Rojanarata, Tanasait Ngawhirunpat & Praneet Opanasopit

Pharmaceutical Development of Green Innovations Group (PDGIG), Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom, Thailand

Key words
Chitosan; Electrospinning; Nanofibre; Polyvinyl alcohol; Wound healing

Correspondence to
P Opanasopit, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand
E-mail: praneet@su.ac.th

doi: 10.1111/j.1742-481X.2012.01077.x

Charernsriwilaiwat N, Rojanarata T, Ngawhirunpat T, Opanasopit P. Electrospun chitosan/polyvinyl alcohol nanofibre mats for wound healing. Int Wound J 2014; 11:215–222

Abstract

Chitosan (CS) aqueous salt blended with polyvinyl alcohol (PVA) nanofibre mats was prepared by electrospinning. CS was dissolved with hydroxybenzotriazole (HOBt), thiamine pyrophosphate (TPP) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in distilled water without the use of toxic or hazardous solvents. The CS aqueous salts were blended with PVA at different weight ratios, and the effect of the solution ratios was investigated. The morphologies and mechanical and swelling properties of the generated fibres were analysed. Indirect cytotoxicity studies indicated that the CS/PVA nanofibre mats were non-toxic to normal human fibroblast cells. The CS-HOBt/PVA and CS-EDTA/PVA nanofibre mats demonstrated satisfactory antibacterial activity against both gram-positive and gram-negative bacteria, and an in vivo wound healing test showed that the CS-EDTA/PVA nanofibre mats performed better than gauze in decreasing acute wound size during the first week after tissue damage. In conclusion, the biodegradable, biocompatible and antibacterial CS-EDTA/PVA nanofibre mats have potential for use as wound dressing materials.

Introduction

Chitosan (CS) is a natural polysaccharide with biodegradable, biocompatible properties and non toxic effects; therefore, it has been proposed as a safer material for use in biomedical applications such as tissue engineering, delivery of pharmaceutical agent and wound dressing (1,2). CS has been widely investigated as wound dressing material because it can function as proliferation promoters, antibacterial agents and macrophage activator. CS gradually depolymerises to *N*-acetyl-D-glucosamine, which initiates fibroblast proliferation, aids in the ordered deposition of collagen and stimulates increased synthesis of natural hyaluronic acid at the wound site. CS is a haemostatic agent, which helps to promote natural blood clotting and blocks nerve endings to reduce pain. Recently, CS-based materials have been prepared as fibres, hydrogels, membranes, sponges and scaffolds for wound dressing applications (3,4).

Electrospun nanofibres are appropriate for use as a wound dressing material because of their useful properties, which include oxygen permeability, high porosity, variable pore size distribution and a high surface-to-volume ratio that can promote haemostasis and absorb wound exudates. Furthermore, the morphology of electrospun nanofibres is similar to that of the natural extracellular matrix (ECM) in the skin that promotes cell adhesion, migration and proliferation (3,5). The fabrication of CS nanofibres via electrospinning techniques has recently been actively investigated for the development of wound dressings. CS nanofibres have been created from the electrospinning of pure CS, CS derivatives and CS blended with other polymers. However, some organic solvents or toxic acids, such as trifluoroacetic acid (TFA) (6),

Key Messages

- CS-HOBt/PVA, CS-TPP/PVA and CS-EDTA/PVA electrospun nanofiber mats were prepared without use of toxic or harmful solvents
- these mats exhibited non toxic to normal human fibroblast cells and antibacterial activity against S.aureus and E. coli
- the wound healing activity of CS-EDTA/PVA electrospun nanofiber mats was better than gauze in reducing acute wound size during the 1st week after treatment

© 2012 The Authors
International Wound Journal © 2012 Medicalhelplines.com Inc and John Wiley & Sons Ltd

chloroform (7) and acetic acid (8–10) may be leftover from the CS nanofibre fabrication process, and these trace residues may have undesirable effects on wound healing. The types of solvents used are often classified as toxic and hazardous and have potential long-term impacts on the environment and the health of the user. To eliminate toxicity from residual solvent exposure, water-soluble CS has been used to prepare nanofibres using quaternary CS (11) and carboxyethyl chitosan/polyvinyal alcohol (CS/PVA) (12) for wound dressing applications.

We recently prepared CS as aqueous salts to allow the formation of nanofibres without the use of organic solvents or toxic acids. Nanofibres were generated using CS-hydroxybenzotriazole (HOBt)/PVA (13) and CS-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)/ PVA (14) by blending the CS salts with PVA. Another salt was generated by dissolving CS with thiamine pyrophosphate (TPP) in distilled water. Owing to the phosphate groups of TPP, the molecule can form a salt with the amine groups of CS, improving the polymer's aqueous solubility. The amine groups of TPP, and especially that of thiazolium can be deprotonated, and are always positive, even at physiological pH. Chitosan thiamine pyrophosphate (CS-TPP) was successfully prepared as a novel carrier for siRNA delivery (15).

In this study, CS-HOBt, CS-TPP and CS-EDTA blended in PVA solution were prepared as nanofibre mats via the electrospinning technique with different CS/PVA weight ratios. The morphology, structure, mechanical properties and swellability of the nanofibre mats were characterised, and the effect of the viscosity, conductivity and surface tension of the electrospinning solution on the morphology of these nanofibre mats was evaluated. (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) MTT assays using normal human fibroblast cells were performed to study the cytotoxicity of the CS/PVA nanofibre mats. The antibacterial activities of the mats against gram-positive and gram-negative bacteria were investigated, and the in vivo healing activity of these nanofibre mats was evaluated using an animal model.

Experimental

Materials

CS (degree of deacethylation = 0·85, molecular weight = 110 kDa), hydroxybenzotriazole monohydrate (HOBt·H_2O), TPP and EDTA were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company, Saint Louis, MO. PVA (degree of polymerisation ≈ 1600, degree of hydrolysis ≈97·5–99·5 mol%) was purchased from Fluka, Buchs, Switzerland. Normal human foreskin fibroblast (NHF) cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). All other reagents and solvents were commercially available and were of analytical grade.

Preparation of spinning solutions

CS solutions (2% w/v) were prepared by dissolving CS with HOBt, TPP and EDTA at weight ratios of 1:1, 1:1 and 2:1, respectively. Briefly, HOBt (2 g), TPP (2 g) or EDTA (1 g) was dissolved with CS (2 g) in 100 ml of distilled water, and the solutions were continuously stirred with a magnetic stirrer at ambient temperature until the solutions became clear. The PVA solution (10% w/v) was prepared by dissolving PVA in distilled water at 80°C and then allowing the solution to stir for 4 h. The 2% CS-HOBt, CS-TPP and CS-EDTA solutions were mixed with a 10% PVA solution at weight ratios of 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 60/40, 70/30, 80/20 and 90/10. The viscosity, conductivity and surface tension of the solutions were measured using a Brookfield viscometer (Model DV–III ultra, Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleboro, MA), a EUTECH ECtestr11$^+$ conductivity meter (Eutech Instruments Pte Ltd., Ayer Rajah Crescent, Singapore) and a Drop Shape Analyzer (FTA 100, First Ten Angstroms Inc, Portsmouth, VA), respectively.

Electrospinning process

The solutions were taken up in a 5 ml glass syringe equipped with a 20-gauge, stainless steel needle (diameter = 0·9 mm) at the nozzle. The needle was connected to the emitting electrode of positive polarity of a Gamma High Voltage Research device. The electric potential was fixed at 15 kV and was electrospun at room temperature. The nanofibres were collected as-spun on an aluminium sheet that was wrapped on a rotating collector. The solution feed was driven by a syringe pump with a controlled flow rate of approximately 0·25 ml/ h. The collection distance was fixed at approximately 20 cm. The process duration was fixed at 24 h for each CS/PVA weight ratio to provide mats with a 20–30 μm thickness.

Characterisations of nanofibre mats

The morphology of the nanofibre mats was observed under scanning electron microscopy (SEM; Camscan Mx2000, Obducat Camscan Ltd, Cambridge, UK). Randomly selected areas of the fibres were cut into squares and coated with a thin layer of gold. The average diameter of the nanofibre mats was analysed by randomly measuring the diameters of the nanofibres at 100 different points from SEM images using the image analysis software (JMicroVision V.1.2.7, University of Geneva, Geneva, Switzerland).

The tensile strength of the nanofibre mats was evaluated using a texture analyser (TA.XT plus, Stable Micro Systems, Godalming, UK) with a 5-kg load cell equipped with a tensile grip holder. The samples were cut into a rectangular shape (5 mm × 25 mm^2). The thicknesses of these samples ranged from 20 to 30 μm.

The degree of swelling of the nanofibre mats was investigated in phosphate buffer saline (PBS, pH 7·4) at room temperature for 1 h according to Equation (1):

$$\textit{Degree of swelling}\ (\%) = (M - M_d)/M_d \times 100 \qquad (1)$$

where M is the weight of each sample after submersion in the buffer solution for 1 h, and M_d is the initial weight of the sample in its dry state.

Indirect cytotoxicity of nanofibre mats

The cytotoxicity of the nanofibre mats was evaluated on the basis of a procedure adapted from the ISO10993-5 standard

© 2012 The Authors

test method (indirect contact) (16). The nanofibre mats were sterilised by ultraviolet radiation for 1 h. The mats were then immersed in a serum-free medium [SFM; containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 1% v/v L-glutamine, 1% v/v lactalbumin and 1% v/v antibiotic and antimycotic formulation] in an incubator for 24 h to produce extraction media of different concentrations (10, 7·5, 5, 2·5 and 1 mg/ml). NHF cells were plated in 100 µl of DMEM, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), at a density of 8000 cells/well in 96-well plates. When the cultures reached confluence (typically 48 h after plating), the cells were incubated with extraction media of varying concentrations for 24 h. After treatment, the tested extraction solutions were removed, and the cells were incubated with 100 µl of an MTT-containing medium (1 mg/ml) for 4 h. Then, the MTT medium was removed, the cells were rinsed with PBS (pH 7·4) and the formazan crystals formed in living cells were dissolved in 100 µl dimethylsulfoxide per well. The relative cell viability (%) was calculated on the basis of the absorbance at 550 nm using a microplate reader (Universal Microplate Analyzer, Model AOPUS01 and AI53601, Packard BioScience, Meriden, CT). The viability of non-treated control cells was defined as 100%.

Determination of antibacterial activity

The antibacterial activity of nanofibre mats was tested against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P and *Escherichia coli* ATCC 10536. For the minimum inhibitory concentration (MIC) test, *S. aureus* and *E. coli* were cultivated in tryptone soy broth (TSB) in a shaking incubator at 37°C and 0.14 g for 24 h. The bacterial suspension was diluted until the bacterial concentration reached 1×10^6 colony-forming unit (CFU)/ml and was pipetted into a 24-well plate at 1 ml/well. Different amounts of the nanofibre mats (1–10 mg) were placed into wells containing bacterial suspension and were incubated at 37°C for 24 h. The MIC was defined as the minimum concentration of mats for which no growth was observed after a 24-h incubation. The optical density (OD) at 550 nm was measured using a microplate reader. For the determination of the minimum bactericidal concentration (MBC), the media mixtures from wells with no growth (100 µl) were spread onto agar plates. The MBC was defined as the minimum concentration of mats for which no colony growth was observed on agar plates after a 24-h incubation at 37°C. The MIC and MBC determinations were carried out in triplicate. Penicillin (1 mg/ml) was used as a positive control.

Wound-healing activity of nanofibre mats

Male Wistar rats (240–280 g) were used in this study. This study was approved by an Investigational Review Board (Animal Studies Ethics Committee, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Approval No. 2-2553). After anesthetisation, the neck area of the dorsal of each rat was shaved and wiped with 70% ethanol. Two wounds were created on the neck area of each rat using a skin biopsy punch (wound area of 0·8 cm^2). The wound was treated by placing an equal size of nanofibre mat, gauze and commercial antibacterial gauze dressing (Sofra-tulle®, Sanofi Aventis, Guildford, UK) ($n = 6$) over it without removing the test material throughout the study period. The area of each wound was measured every day by the planimetry method until the wound completely healed. The percentage of wound healing is defined in Equation (2).

$$\textit{Wound area}\ (\%) = (A/A_i) \times 100 \quad (2)$$

where A_i is the initial wound area and A is the wound area after a fixed time interval.

Statistical analysis

All data for the experiment were collected from triplicate samples and are expressed as the mean ± standard deviation (SD). Statistically significant differences in cell viability and wound area were analysed using the Student's t-test. The significance level was set at $P < 0{\cdot}05$.

Results and discussion

Morphology of nanofibres

The SEM images of CS-HOBt/PVA, CS-TPP/PVA and CS-EDTA/PVA with different weight ratios are shown in Figure 1. When the CS/PVA weight ratio was increased to 30/70, the SEM micrographs demonstrated no beading. However, at CS/PVA 40/60, fibres with beads were observed. The maximum content of CS aqueous salt was 50/50 in the electrospinning mixture. When the CS content exceeded 50/50, nanofibres were unable to be formed; this may have been because of unsuitable solution parameters. Table 1 shows the solution parameters and average diameter of CS-HOBt/PVA, CS-TPP/PVA and CS-EDTA/PVA fibres generated at different CS/PVA weight ratios. When the content of CS salt was increased from 10/90 to 50/50, the average diameter of the CS-HOBt/PVA, CS-TPP/PVA and CS-EDTA/PVA nanofibres decreased from 228 ± 37 to 146 ± 33 nm, from 216 ± 34 to 100 ± 19 nm and from 221 ± 34 to 94 ± 20 nm. This decrease in the average fibre diameter was mainly ruled by solution viscosity and conductivity. The viscosity of the CS-HOBt/PVA, CS-TPP/PVA and CS-EDTA/PVA solutions decreased with increasing CS salt content (Table 1). The changes in the viscosity of the CS-TPP/PVA and CS-EDTA/PVA solutions were greater than those of the CS-HOBt/PVA solution, so the average diameters of the CS-TPP/PVA and CS-EDTA/PVA fibres were smaller than those of the CS-HOBt/PVA nanofibres. The reduced viscosity of solutions affected bead formation when the CS salt content was higher than 30/70. Increases in solution conductivity also contributed to decreases in nanofibre diameter. This result was in good accordance with our previous work (13). The surface tension increased slightly when the CS salt content was increased from 10/90 to 50/50. These differences could have led to bead and droplet formation during the electrospinning process (8). Nanofibres with CS/PVA weight ratios of 30/70 that did not contain beads were selected for further investigation of antibacterial and wound healing activity.

© 2012 The Authors

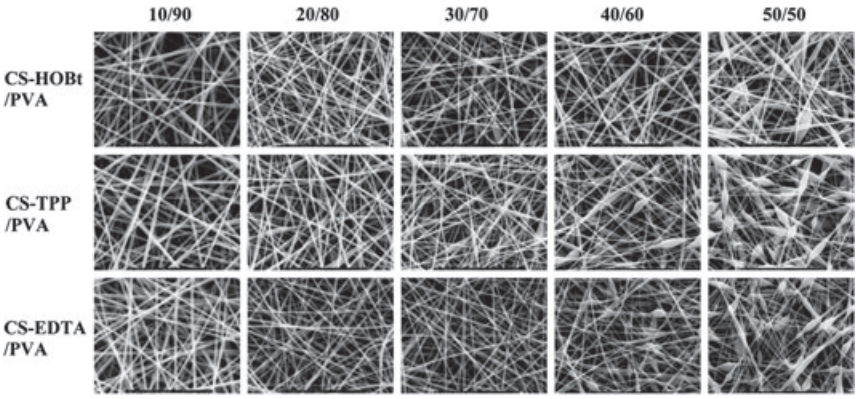


Figure 1 The SEM image of CS/PVA nanofibre mats with different salt and weight ratios.

Table 1 Electrospun solution parameters of CS/PVA solution and average fibre diameter at each weight ratio

Samples	Weight ratio	Viscosity (MPa s)	Conductivity (μS/cm)	Surface tension (mN/m)	Average diameter (nm)
CS-HOBt/PVA	10/90	531·57 ± 2·08	1036·7 ± 0·58	43·77 ± 1·04	228·06 ± 37·20
	20/80	550·23 ± 3·92	1078·0 ± 2·65	43·63 ± 0·44	186·72 ± 32·93
	30/70	529·97 ± 1·99	1185·0 ± 3·61	44·57 ± 0·23	179·34 ± 39·36
	40/60	510·57 ± 2·96	1268·3 ± 2·52	45·45 ± 0·26	176·46 ± 28·86
	50/50	487·20 ± 1·30	1500·3 ± 1·53	46·48 ± 0·41	146·34 ± 33·23
CS-TPP/PVA	10/90	568·04 ± 0·38	1160·7 ± 9·71	46·62 ± 0·37	216·42 ± 34·45
	20/80	459·54 ± 2·48	1268·7 ± 6·51	48·62 ± 0·24	188·66 ± 33·69
	30/70	346·98 ± 5·29	1573·7 ± 9·02	49·95 ± 0·58	141·51 ± 29·39
	40/60	260·45 ± 0·38	1771·3 ± 2·08	51·55 ± 0·22	126·77 ± 32·46
	50/50	123·54 ± 0·12	2110·0 ± 10·0	52·61 ± 0·23	99·91 ± 18·67
CS-EDTA/PVA	10/90	511·43 ± 3·46	1011·7 ± 2·52	46·46 ± 0·36	220·94 ± 34·19
	20/80	387·17 ± 1·31	1014·3 ± 3·06	48·47 ± 0·31	184·63 ± 29·13
	30/70	254·74 ± 0·76	1022·3 ± 3·79	50·00 ± 0·38	160·96 ± 32·93
	40/60	223·67 ± 1·31	1032·0 ± 3·61	51·42 ± 0·83	125·87 ± 37·96
	50/50	181·27 ± 0·68	1036·7 ± 1·53	52·07 ± 1·77	94·09 ± 20·27

CS/PVA, chitosan aqueous salt blended with polyvinyl alcohol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HOBt, hydroxybenzotriazole; TPP, thiamine pyrophosphate.
The data are expressed as mean ± standard deviation ($n = 3$).

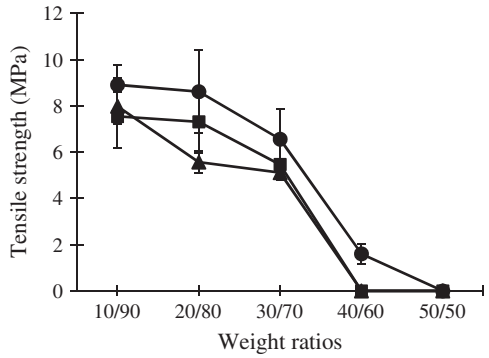


Figure 2 Tensile strength (MPa) of CS/PVA nanofibre mats with different weight ratios; (●) CS-HOBt/PVA, (■) CS-TPP/PVA and (▲) CS-EDTA/PVA. The data are expressed as mean ± standard deviation ($n = 3$).

Mechanical properties of nanofibre mats

When wound dressings interact with the wound, they must possess mechanical properties sufficiently similar to those of skin in order to function properly until the wound is healed. The maximum CS/PVA weight ratio that provided nanofibre mats from the electrospinning process was 50/50. However, the tensile strength was only measured for the nanofibre mats that could be peeled off of the aluminium foil collector. The 10/90-30/70 CS/PVA nanofibre mats were easily peeled off. As the content of CS salt increased to 40/60, the mats became difficult to peel. Owing to the fibre structure of the 40/60 and 50/50 CS/PVA nanofibre mats, they contained many beads with very fragile fibres. Figure 2 shows the tensile strength of the CS/PVA nanofibre mats generated using different weight ratios. The tensile strength of all of the tested CS/PVA nanofibres mats ranged from 8·9 to 1·5 MPa, whereas the tensile strength of neat PVA nanofibre mats was 12·8 MPa. The results indicated that as the content of CS salt increased, the tensile strength decreased, the diameter of the nanofibres decreased and bead formation occurred in the mats. These findings demonstrated that these CS/PVA nanofibre mats possess tensile strength that is nearly equal to that of commercial microfibrous dressings, which have tensile strengths on the order of 10 MPa (17).

Swelling of nanofibre mats

The swelling of CS is the most important property that characterises its use for wound dressing applications. Figure 3 shows

© 2012 The Authors
International Wound Journal © 2012 Medicalhelplines.com Inc and John Wiley & Sons Ltd

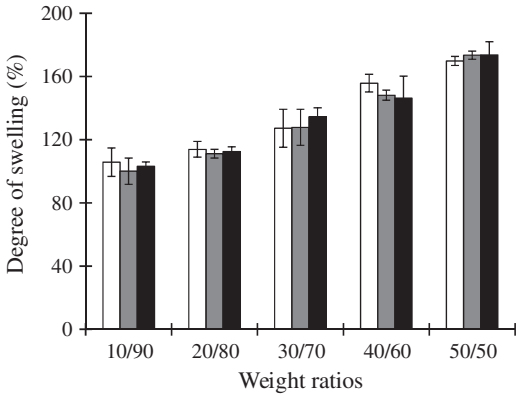


Figure 3 Degree of swelling (%) of CS/PVA nanofibre mats with different weight ratios; (□) CS-HOBt/PVA, (▒) CS-TPP/PVA and (■) CS-EDTA/PVA. The data are expressed as mean ± standard deviation ($n = 3$).

the degree of swelling of CS/PVA nanofibre mats with various weight ratios after immersion in a PBS (pH 7·4) at room temperature for 1 h. All the CS/PVA nanofibre mats demonstrated swelling over 100%, and this effect was slightly increased with increases in the CS content. The swelling of the 10/90 CS/PVA was approximately 100%, which increased to approximately 170% when the content of CS salt reached 50/50 in the blend. CS is a hydrophilic polymer, and water diffuses very rapidly through the material before CS degradation (18). The results indicated that increases in the degree of nanofibre mat swelling depended on the CS salt content. This observation is in agreement with Meng *et al*., who found that the swelling ratio of polylactic-co-glycolic acid (PLGA)/CS nanofibres was higher than that of neat PLGA nanofibres and increased with CS content (19).

Indirect cytotoxicity of nanofibre mats

The indirect cytotoxicity of various concentrations of medium extracts from CS/PVA nanofibre mats composed of 10/90, 30/70 and 50/50 weight ratios is shown in Figure 4. There was no significant decrease in cell viability when the NHF cells were incubated with various concentrations of the extraction media of CS-HOBt/PVA, CS-TPP/PVA and CS-EDTA/PVA nanofibre mats when compared with the control ($P < 0{\cdot}05$). The average cell viability decreased slightly when the concentration of the extract increased, but these changes were not statistically significant. From these data, the CS-HOBt/PVA, CS-TPP/PVA and CS-EDTA/PVA nanofibre mats appear to be non-toxic to NHF cells and have the potential to be developed as wound dressings.

Determination of antibacterial activity

The antibacterial mechanism of CS is generally attributed to the amino group at C-2 position of the glucosamine residue that is responsible for the cationic nature of CS in acidic conditions (20). When the CS/PVA nanofibre mats were immersed in a TSB solution containing a bacteria suspension, the CS was dissolved and showed a cationic charge in solution. Figure 5 shows the inhibition of bacterial growth by CS/PVA nanofibre mats, compared with neat PVA nanofibre mats, after a 24-h incubation with *S. aureus* and *E. coli*. The CS/PVA nanofibre mats exhibited concentration-dependent antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli*. The 30/70 CS-EDTA/PVA and 30/70 CS-HOBt/PVA nanofibre mats inhibited *S. aureus* growth at 5 and 7·5 mg/ml, respectively, and the 30/70 CS-TPP/PVA almost inhibited *S. aureus* growth at 10 mg/ml (Figure 5A). The 30/70 CS-EDTA/PVA and 30/70 CS-HOBt/PVA nanofibre mats also inhibited *E. coli* growth at 5 and 10 mg/ml, respectively, but 30/70 CS-TPP/PVA did not do so (Figure 5B). The neat PVA nanofibre mats did not show any effect on bacteria growth. The MIC and MBC of the 30/70 CS salt/PVA nanofibre mats are shown in Table 2. The results showed that the different antibacterial activities of the CS/PVA nanofibre mats were dependent on the type of CS salt used. The 30/70 CS-EDTA/PVA nanofibre mats showed the highest antibacterial activity at 5 mg/ml, likely because of the intrinsic antibacterial activity of EDTA. Several recent publications have indicated that EDTA (alone and in combination with antibiotics) was an effective antimicrobial agent, with a spectrum covering both gram-positive and gram-negative bacteria. The antimicrobial activity of an EDTA–CS acetic acid combination has been tested, and the study showed that while EDTA possessed a weaker bacteriostatic effect than CS acetic acid, the combination of CS acetic acid and EDTA elicited synergistic activity against *S. aureus* (21). All the CS/PVA nanofibre mats tested at 1–10 mg in this study showed higher antibacterial activity against gram-positive bacteria (*S. aureus*) than against gram-negative bacteria (*E. coli*). The mode of action of antimicrobial agents depends on the nature of the target microorganisms, and differences between the response of gram-positive and gram-negative bacteria to various antibiotics are mainly related to their cell wall structure and the arrangement of their outer membrane (20,22). Different theories have been proposed to explain CS's antimicrobial mode of action. In one mechanism (23,24), positively charged CS molecules interfere with negatively charged residues on the bacterial surface. CS could interact with the membrane of the bacteria to alter cell permeability. Other studies (25) demonstrated that lower molecular weight CS may have intracellular targets. Dissociated CS molecules in solution could bind with DNA and inhibit the synthesis of mRNA and proteins. Xing *et al*. investigated the antimicrobial mode of oleoyl-CS nanoparticles against *E. coli* and *S. aureus* and showed that the particles achieve their antibacterial activity by damaging the structures of the cell membrane and by putative binding to extracellular targets such as phosphate groups or to intracellular targets such as DNA and RNA (26,27).

Wound-healing testing of nanofibre mats

In the wound-healing test, two full-thickness round wounds with surface areas of 0·8 cm^2 were created on the ventral neck of each rat. Figure 6 shows the images of wound appearances and the percentage wound areas at 1, 4, 7 and 10 days after treatment with 30/70 CS-HOBt/PVA, 30/70 CS-TPP/PVA,

© 2012 The Authors

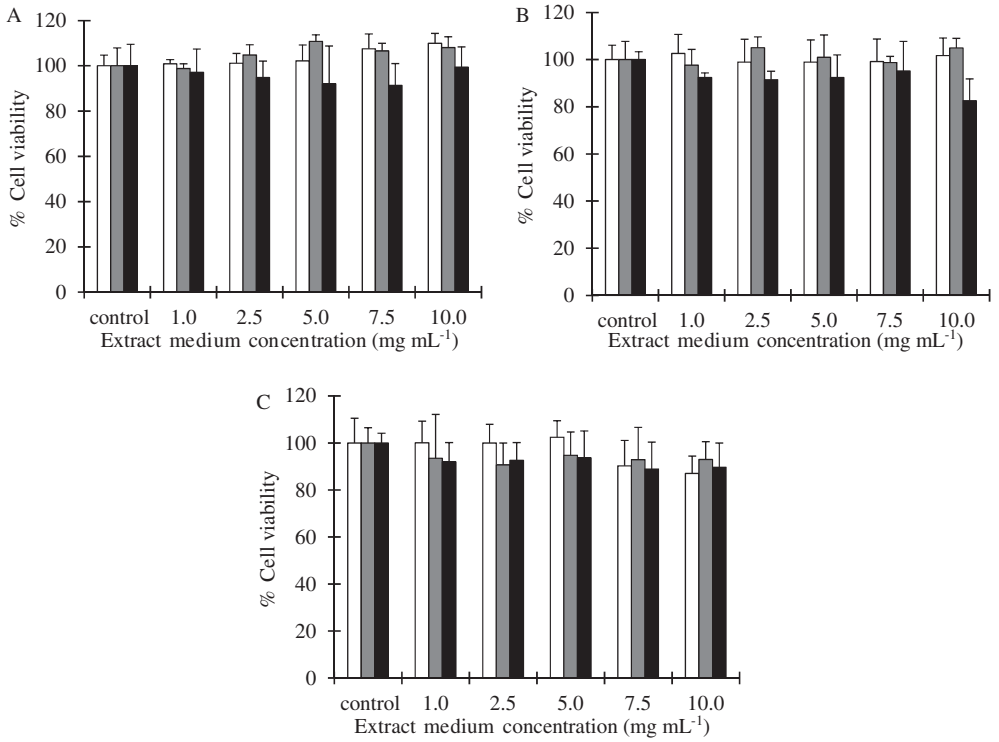


Figure 4 Cell viability in NHF cells at various concentrations of the extract of CS/PVA nanofibre mats (A) CS-HOBt/PVA, (B) CS-TPP/PVA and (C) CS-EDTA/PVA with different weight ratios; (□) 10/90, (▒) 30/70 and (■) 50/50. The data are expressed as mean ± standard deviation ($n = 5$).

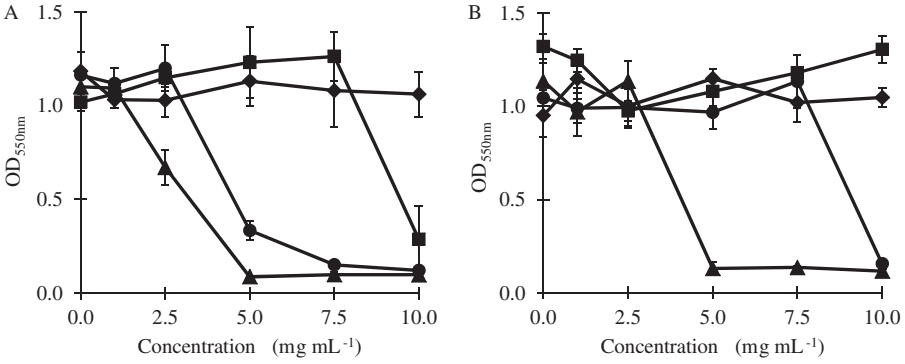


Figure 5 The growth of (a) *S. aureus* and (b) *E. coli* in the presence of (●) 30/70 CS-HOBt/PVA, (■) 30/70 CS-TPP/PVA, (▲) 30/70 CS-EDTA/PVA and (◆) PVA nanofibre mats, after 24-h incubation. The data are expressed as mean ± standard deviation ($n = 3$).

Table 2 Minimum inhibition concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) of 30/70 CS-HOBt/PVA, CS-TPP/PVA and CS-EDTA/PVA nanofibre mats against *S. aureus* and *E. coli* compared with PVA nanofibre mats

	MIC (mg/ml)		MBC (mg/ml)	
Nanofibre mats	*S. aureus*	*E. coli*	*S. aureus*	*E. coli*
PVA	>10·0	>10·0	>10·0	>10·0
30/70 CS-HOBt/PVA	7·5	10·0	7·5	10·0
30/70 CS-TPP/PVA	>10·0	>10·0	>10·0	>10·0
30/70 CS-EDTA/PVA	5·0	5·0	5·0	5·0

CS, chitosan; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HOBt, hydroxybenzotriazole; PVA, polyvinyl alcohol; TPP, thiamine pyrophosphate.

30/70 CS-EDTA/PVA nanofibre mats, gauze (negative control) or commercial antibacterial gauze dressing (positive control). The wound areas decreased gradually and reached 2% of the original wound size after 10 days when treated with the five different wound dressings. Wound closure was achieved within 10 days of all treatments. However, at day 1 after the operation, the percentage wound area of wounds treated with CS-HOBt/PVA, CS-EDTA/PVA nanofibre mats and commercial antibacterial gauze dressing was smaller than those of the gauze treatment group ($P < 0{\cdot}05$). This might be involved with the high surface area of the nanofibre mats provided high wound exudates absorption. The wounds treated with nanofibre mats were dry and smaller in wound size than the gauze treatment. At 4 days after the operation, wound healing with the CS-EDTA/PVA nanofibre mat dressing was the greatest ($P < 0{\cdot}05$), and in the first week, the 30/70 CS-EDTA/PVA nanofibre mats exhibited excellent wound healing activity. This result was in accordance with the high antibacterial activity of the CS-EDTA/PVA nanofibre mats. *N*-acetyl-D-glucosamine from CS depolymerisation is reported to enhance

© 2012 The Authors

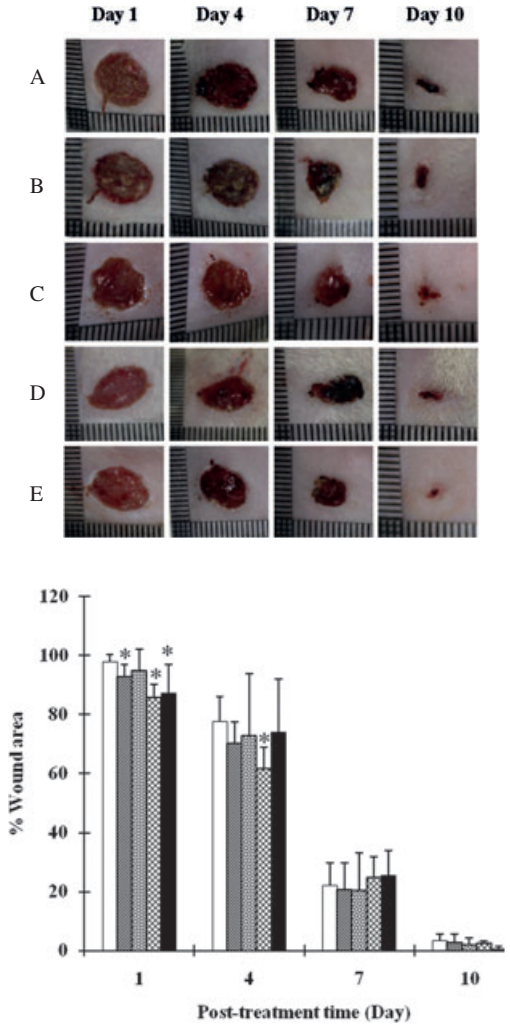


Figure 6 Appearance of would healings and wound area (%) at 1, 4, 7 and 10 day after the treatment with (A, □) gauze (negative control), (B, ▨) 30/70 CS-HOBt/PVA nanofibre mats, (C, ▨) 30/70 CS-TPP/PVA nanofibre mats, (D, ▨) 30/70 CS-EDTA/PVA nanofibre mats and (E, ■) commercial antibacterial gauze dressing (Sofra-tulle*register*) (positive control). Difference values * were statistically significant ($P < 0{\cdot}05$) compared with gauze. The data are expressed as mean ± standard deviation ($n = 6$).

wound healing by promoting fibroblast proliferation (21,28). The percentage wound area of all the treatments until recovery was similar, which suggests that wound healing was progressed by some mechanism of the body that is independent of the effects of the treatment. This result is in agreement with a study by Chen *et al*. on electrospun collagen/CS nanofibrous membranes. The wound areas decreased gradually, and the membranes were found to be better than gauze and collagen sponge in promoting wound healing (16).

Conclusions

In this study, we successfully produced composite nanofibrous membranes composed of CS salt and PVA using water as a solvent, avoiding the use of toxic and hazardous solvents. These fibre mats were in the nanometre range and provided suitable tensile strength and swelling properties. The CS-EDTA/PVA nanofibre mats showed the greatest antibacterial and wound-healing activity during the first 4 days after wounds. The biodegradable, biocompatible and antibacterial CS-EDTA/PVA nanofibre mats have immense potential for use as wound dressing materials.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Commission of Higher Education (Thailand), the Thailand Research Funds through the Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0183/2550 and Project No. DBG5480004) for financial support.

References

1. Jayakumar R, Menona D, Manzoora K, Naira SV, Tamurab H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials - a short review. *Carbohydr Polym* 2010;**82**:227–32.
2. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci* 2011;**36**:981–1014.
3. Jayakumar R, Prabaharan M, Kumar PTS, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv* 2011;**29**:322–37.
4. Paul W, Sharma CP. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends Biomater Artif Organs* 2004;**18**:18–23.
5. Zahedi P, Rezaeian I, Ranaei-Siadat S-O, Jafari S-H, Supaphol P. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polym Adv Technol* 2010;**21**:77–95.
6. Sangsanoh P, Supaphol P. Stability improvement of electrospun chitosan nanofibrous membranes in neutral or weak basic aqueous solutions. *Biomacromolecules* 2006;**7**:2710–4.
7. Neamnark A, Rujiravanit R, Supaphol P. Electrospinning of hexanoyl chitosan. *Carbohydr polym* 2006;**66**:298–305.
8. Geng X, Kwon O-H, Jang J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials* 2005;**26**:5427–32.
9. Bhattarai N, Edmondson D, Veiseh O, Matsen FA, Zhang M. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials* 2005;**26**:6176–84.
10. Jia Y-T, Gong J, Gu X-H, Kim H-Y, Dong J, Shen X-Y. Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan blend nanofibers produced by electrospinning method. *Carbohydr Polym* 2007;**67**:403–9.
11. Ignatova M, Manolova N, Rashkov I. Novel antibacterial fibers of quaternized chitosan and poly(vinyl pyrrolidone) prepared by electrospinning. *Eur Polym J* 2007;**43**:1112–22.
12. Zhou Y, Yang D, Chen X, Xu Q, Lu F, Nie J. Electrospun water-soluble carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol) nanofibrous membrane as potential wound dressing for skin regeneration. *Biomacromolecules* 2008;**9**:349–54.
13. Charernsriwilaiwat N, Opanasopit P, Rojanarata T, Ngawhirunpat T, Supaphol P. Preparation and characterization of chitosan-hydroxybenzotriazole/polyvinyl alcohol blend nanofibers by the electrospinning technique. *Carbohydr Polym* 2010;**81**:675–80.
14. Charernsriwilaiwat N, Opanasopit P, Rojanarata T, Ngawhirunpat T. Fabrication and characterization of chitosan-ethylenediaminetetraacetic acid/polyvinyl alcohol blend electrospunnanofibers. *Adv Mater Res* 2011;**195–196**:648–51.
15. Rojanarata T, Opanasopit P, Techaarpornkul S, Ngawhirunpat T, Ruktanonchai U. Chitosan-thiamine pyrophosphate as a novel carrier for siRNA delivery. *Pharma Res* 2008;**25**:2807–14.
16. Chen J-P, Chang G-Y, Chen J-K. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. *Colloids Surf A* 2008; **313–314**:183–8.

© 2012 The Authors
International Wound Journal © 2012 Medicalhelplines.com Inc and John Wiley & Sons Ltd

17. Leung V, Hartwell R, Yang H, Ghahary A, Ko F. Bioactive nanofibres for wound healing applications. *Journal Fiber Bioeng Inform* 2011;**4**:1–14.
18. Baskar D, Kumar TSS. Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films. *Carbohydr Polym* 2009;**78**:767–72.
19. Meng ZX, Zheng W, Li L, Zheng YF. Fabrication, characterization and in vitro drug release behavior of electrospun PLGA/chitosan nanofibrous scaffold. *Mater Chem Phys* 2011;**125**:606–11.
20. Xie W, Xu P, Wang W, Liu Q. Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative. *Carbohydr Polym* 2002;**50**:35–40.
21. El-Sharif AA, Hussain MHM. Chitosan–EDTA new combination is a promising candidate for treatment of bacterial and fungal infections. *Curr Microbiol* 2011;**62**:739–45.
22. Li Y, Chen XG, Liu N, Liu CS, Liu CG, Meng XH, Yu LJ, Kenendy JF. Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. *Carbohydr Polym* 2007;**67**:227–32.
23. Helander IM, Nurmiaho-Lassila E-L, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol* 2001;**71**:235–44.
24. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol* 1992;**6**:257–72.
25. Rabea EI, Badawy ME-T, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* 2003;**4**:1457–65.
26. Xing K, Chen XG, Kong M, Liu CS, Cha DS, Park HJ. Effect of oleoyl-chitosan nanoparticles as a novel antibacterial dispersion system on viability, membrane permeability and cell morphology of Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Carbohydr Polym* 2009;**76**:17–22.
27. Xing K, Chen XG, Liu CS, Cha DS, Park HJ. Oleoyl-chitosan nanoparticles inhibits Escherichia coli and Staphylococcus aureus by damaging the cell membrane and putative binding to extracellular or intracellular targets. *Int J Food Microbiol* 2009;**132**:127–33.
28. Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydr Polym* 2009;**76**:167–82.

© 2012 The Authors
International Wound Journal © 2012 Medicalhelplines.com Inc and John Wiley & Sons Ltd