

การพัฒนาวัสดุเคลือบหม้อรองพื้นชนิดเรซินที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ

นายเอกมน มหาโกศา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาทันตชีววัสดุศาสตร์ (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF ANTIMICROBIAL RESIN PIT AND FISSURE SEALANT

Mr. Ekamon Mahapoka

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Dental Biomaterials Science

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Academic Year 2009

Chulalongkorn University

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ
โดย	นายเอกมน มหาโกคา
สาขาวิชา	ทันตชีววัสดุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. สุชาติ พูลทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. รัตนา รุจิรวนิช อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. ประทานพร อารีราชการัตน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาตรีบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร. พรพจน์ เปี่ยมสมบุญ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. พสุธา ธีระกิจไพศาล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร. สุชาติ พูลทอง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร. รัตนา รุจิรวนิช)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(อาจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร. ประทานพร อารีราชการัตน์)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง สุภาภรณ์ จงวิศาล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(อาจารย์ ทันตแพทย์ ดร. วรณธนะ สัตตบรรณสุข)

# # 4889688420 : MAJOR DENTAL BIOMATERIALS SCIENCE

KEYWORDS : whiskers / resin pit and fissure sealant / chitosan / antimicrobial / physical property / cytotoxicity

EKAMON MAHAPOKA : DEVELOPMENT OF ANTIMICROBIAL RESIN PIT AND FISSURE SEALANT. THESIS ADVISOR: ASST.PROF. SUCHIT POOLTHONG, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC.PROF. RATANA RUJIRAVANIT Ph.D., PRATARNPORN ARIRACHAKARAN Ph.D., 181 pp.

**Objective:** The aim of this study was to synthesize and characterize the as-prepared chitosan nano-whiskers including whiskers-incorporate resin sealant. Novel resin sealant was investigated the antimicrobial property, physical property and cytotoxicity. **Materials&Methods:** A novel nano-whiskers chitosan was developed from the shrimp shells which were decalcified and deproteinized to obtain chitin flakes. The flakes were hydrolyzed to form whiskers which were latterly deacetylated using alkali reagent for chitosan. Infrared Spectrometry (IR) and Electron microscope were used for determining chemical and physical property, respectively. After lyophilization, dry whiskers were incorporated into light-activated resin sealant at 2.5, 2, 1.5, 1 and 0%(control) by weight. The disc specimens were prepared for each experimental sealant (Seal&Protect™, DENTSPLY, USA, Delton®, DENTSPLY, USA and Teethmate™ F-1; KURARAY, JAPAN) for comparison. The Agar diffusion and Bacteria reduction rate (BRR) technique for antimicrobial activity were used on *Streptococcus mutans* (UA159) and *Lactobacillus casei* (IFO3533) The specimens were tested for physical properties (depth of cure, water sorption and solubility, Vickers hardness, double bond conversion, viscosity and marginal leakage). Moreover, the whiskers-sealants were tested for cytotoxicity with L929. **Result:** The IR spectrum had 73.58% in deacetylated degree and exhibited chitosan chemical structure. TEM images depicted distributed fibrous structure so as incorporated in resin sealant. For antimicrobial test, 2% chitosan in sealant has clearly demonstrated zone of inhibition and greater in BRR in both microbes. It passed the standard test with 5.80 mm. in cure depth, 48.25 and 7.59  $\mu\text{g}/\text{mm}^3$  in water sorption and solubility. The conversion degree and marginal leakage had no different compare with control group although its hardness and viscosity were 14.95 VHN and 1228 cP had statistically difference. The whiskers-sealant was not toxic to fibroblast cell culture. **Conclusion:** The novel chitosan nano-whiskers were developed. Incorporation of at least 2% whiskers in resin sealant had an antibacterial effect and achieved physical properties requirement. Besides, chitosan incorporated in resin sealant is presumedly good material and safe to be used.

Field of Study : Dental Biomaterials Science Student's Signature .....

Academic Year : 2009 Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

เอกมน มหาโกคา : การพัฒนาวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินที่มีฤทธิ์ด้านจุลชีพ .

(DEVELOPMENT OF ANTIMICROBIAL RESIN PIT AND FISSURE SEALANT)

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ทพ.ดร.สุจิต พูลทอง, รศ.ดร.รัตนา รุจิรวนิช, อ.ทญ.ดร.

ประทานพร อารีราชกาณ์ณย์. 181 หน้า.

**วัตถุประสงค์** เพื่อพัฒนาวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินผสมสารต้านจุลชีพในปริมาณเหมาะสมที่ทำให้วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินมีประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุและทดสอบคุณสมบัติของวัสดุทางกายภาพและทางชีวภาพตามมาตรฐานสากล **วิธีการทดลอง** โคโตซานวิสเกอร์ถูกสังเคราะห์จากเปลือกกุ้งด้วยกระบวนการกำจัดแร่ธาตุและโปรตีนเพื่อให้ได้สารโคติน จากนั้นผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสเพื่อสร้างวิสเกอร์และทำปฏิกิริยาเพื่อตั้งหมู่อะเซทิลออกจากโครงสร้างโคตินเพื่อเปลี่ยนให้เป็นสารโคโตซานตามลำดับ วิสเกอร์ที่ได้จะถูกนำไปตรวจสอบค่าดีกรีอะพัตืออะเซทิลเลชันและโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธีฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรเมตรี ตรวจสอบขนาด รูปร่างและการกระจายตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน วิสเกอร์ถูกนำไปทำให้แห้งด้วยกระบวนการพรีชดรายเพื่อผสมลงในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินในปริมาณร้อยละ 2.5, 2, 1.5 และ 1 โดยน้ำหนัก ทำการทดสอบเปรียบเทียบกับวัสดุควบคุมไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์วัสดุกลุ่มเปรียบเทียบ (ซีลแอนดีโพเทท™; DENTSPLY, USA, เดลตัน® DENTSPLY, USA และทีซีเทเม™ เอฟ-วัน; KURARAY, JAPAN) การทดสอบฤทธิ์ด้านจุลชีพกระทำโดยการสัมผัสและการวัดอัตราการลดลงของเชื้อ 2 สายพันธุ์คือ สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (UA159) และแลคโตบาซิลลัส คาเชอ (IFO3533) วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจะนำมาทดสอบทางกายภาพเรื่องความลึกของการแข็งตัว การดูดซับน้ำและละลายตัวตามมาตรฐานสากล ความแข็งผิววิกเกอร์ส อัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ ความหนืดและระดับการรั่วซึมตามขอบ ตามลำดับ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์จะถูกทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ชนิด L929 ด้วยการวัดอัตราการรอดอยู่รอดภายหลังการสัมผัสวัสดุทั้งทางตรงและทางอ้อม **ผลการทดลอง** โคโตซานวิสเกอร์มีค่าดีกรีอะพัตืออะเซทิลเลชันเท่ากับ 73.58 และแสดงหมู่ฟังก์ชันของโคโตซาน ทั้งนี้วิสเกอร์มีความยาวและกว้างโดยเฉลี่ยระดับนาโนเมตรและมีการกระจายตัวที่ดี โคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักในเรซินเป็นปริมาณน้อยที่สุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ทั้งจากการสัมผัสและการวัดอัตราการลดลงของเชื้อ วัสดุมีค่าความลึกของการแข็งตัว การดูดซับน้ำและละลายตัวเท่ากับ 5.80 มิลลิเมตร, 48.25 และ 7.59 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรตามลำดับผ่านเกณฑ์มาตรฐานสากล การทดสอบความแข็งผิวและความหนืดพบว่ามีความ 14.95 VHN และ 1228 เซนติพอยส์มากกว่าวัสดุกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ อัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่มีค่าร้อยละ 57.5 และระดับการรั่วซึมตามขอบไม่แตกต่างของจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จากการสัมผัสวัสดุทั้งทางตรงและทางอ้อมไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทั้งสอง **สรุป** วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ได้ถูกพัฒนาโดยพบว่า ปริมาณร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นปริมาณน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดฤทธิ์ด้านจุลชีพโดยไม่ทำให้สมบัติทางกายภาพตามมาตรฐานสากล อัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่และระดับการรั่วซึมตามขอบแตกต่างจากวัสดุควบคุมรวมทั้งไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์เป็นวัสดุที่มีฤทธิ์ด้านจุลชีพ มีสมบัติทางกายภาพที่ดีและมีความปลอดภัย

สาขาวิชา.....ทันตชีวะวัสดุศาสตร์.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา.....2552.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ทันตแพทย์ ดร. สุจิต พูลทอง เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาให้คำแนะนำทางด้านวิชาการและความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. รัตนา รุจิรวนิชและอาจารย์ทันตแพทย์หญิง ดร. ประทานพร อารีราชการ์ณย์ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการดำเนินงานวิจัยและแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณนางมารศรี อุชชิน ภาควิชาชีวเคมี คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการเตรียมวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินและวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมสารโคโตซานวิสเกอร์

ขอขอบคุณดร. อัญญารัตน์ วัฒนนะพานิชที่ช่วยเหลือและให้คำแนะนำที่มีประโยชน์ในการสังเคราะห์โคโตซานวิสเกอร์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปากโดยเฉพาะอย่างยิ่งนางสาวผกาวัลย์ มุสิกพงศ์ และนางสาวสุจิน ชุมประเสริฐที่ได้ให้คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์และดำเนินงานวิจัยภายในศูนย์รวมทั้งเจ้าหน้าที่ศูนย์ทันตวัสดุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ช่วยอำนวยความสะดวกและให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือวิจัย

การศึกษาคั้งนี้ผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนโดยทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาฯ 72 พรรษา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณบุพการีทั้งสองท่านของข้าพเจ้า นางสาวและนายรัฐเขต ณ เรืองฤทธิ์ที่เป็นกำลังใจและให้คำปรึกษาที่ดีตลอดช่วงเวลาในการทำงานวิจัยและขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนร่วมอีกหลายท่านที่ไม่สามารถกล่าวนามได้ทั้งหมดที่ให้ความช่วยเหลือจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
สมมติฐานของการวิจัย.....	4
ขอบเขตการวิจัย.....	7
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	8
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	8
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	8
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	9
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	10
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซิน.....	10
องค์ประกอบ.....	10
สมบัติทางด้านกายภาพ.....	16
สมบัติทางชีวภาพ.....	25
โคโตซานวีสเกอร์.....	28
สมบัติทั่วไปของสารโคตินและโคโตซาน.....	28
ดีกรีออฟดีอะเซทิลเลชัน.....	32
การใช้ประโยชน์ของสารโคโตซานในทางการแพทย์และทันตกรรม.....	37
สมบัติด้านจุลชีพของสารโคโตซาน.....	38
กระบวนการสกัดและเตรียมเส้นใยโคโตซานวีสเกอร์.....	40

บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	
	วัตถุประสงค์.....	42
	สารเคมี.....	42
	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	43
	วิธีการวิจัย.....	44
	1. การสังเคราะห์วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวีสเกอร์และการพิสูจน์เอกลักษณ์.....	46
	1.1 การสังเคราะห์โคตินและโคโตซานวีสเกอร์.....	46
	1.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์โคตินและโคโตซานวีสเกอร์.....	46
	1.3 การเตรียมวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวีสเกอร์.....	49
	1.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวีสเกอร์ปริมาณโดยน้ำหนักน้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน.....	50
	2. การทดสอบสมบัติด้านจุลชีพ.....	51
	2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของเชื้อแบคทีเรีย.....	53
	2.2 การทดสอบสมบัติด้านจุลชีพของสารคอลลอยด์โคโตซานวีสเกอร์จากการสัมผัสด้วยวิธีการวัดความกว้างของแถบการยับยั้ง.....	53
	2.3 การตรวจหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) และ MBC (Minimum Bactericidal Concentration) ของสารคอลลอยด์โคโตซานวีสเกอร์.....	53
	2.4 การทดสอบสมบัติด้านจุลชีพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์จากการสัมผัสด้วยวิธีการวัดความกว้างของแถบการยับยั้ง.....	55
	2.5 การทดสอบสมบัติด้านจุลชีพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ด้วยวิธีการนับโคโลนีและการคำนวณอัตราการลดลงของเชื้อ.....	56
	3. การทดสอบสมบัติทางกายภาพ.....	57
	3.1 การศึกษาตามมาตรฐานสากลเรื่องความลึกของการแข็งตัว.....	59
	3.2 การศึกษาตามมาตรฐานสากลเรื่องการดูดซับน้ำและการละลายตัว.....	59
	3.3 การศึกษาความแข็งผิววีเกอร์ส.....	60
	3.4 การศึกษาอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่.....	63
	3.5 การศึกษาความหนืด.....	64
	3.6 การศึกษาระดับการรั่วซึมตามขอบ.....	66



4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์.....	67
4.1 การเตรียมเซลล์เพื่อทดสอบ.....	69
4.2 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพและอัตราการอยู่รอดของเซลล์จาก การสัมผัสวัสดุโดยตรง.....	69
4.3 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพและอัตราการอยู่รอดของเซลล์จาก การสัมผัสวัสดุโดยอ้อม.....	70
	73
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	
1.1 ผลการสังเคราะห์โคตินและโคโตซานวีสเกอร์.....	75
1.2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์โคตินและโคโตซานวีสเกอร์.....	75
1.2.1 ผลค่าดีกรีออฟดีอะเซทิเลชันและโครงสร้างทางเคมีของโคตินและโค โตซานวีสเกอร์.....	76
1.2.2 ผลการศึกษาขนาด รูปร่างและการกระจายตัวของโคโตซานวีสเกอร์	76
2.1 ผลการสร้างกราฟมาตรฐาน.....	78
2.2 ผลการทดสอบสมบัติต้านจุลชีพของสารคอลลอยด์โคโตซานวีสเกอร์จาก การสัมผัสด้วยวิธีการวัดความกว้างของแถบการยับยั้ง.....	80
2.3 ผลการตรวจหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) และ MBC (Minimum Bactericidal Concentration) ของสารคอลลอยด์โคโตซานวีสเกอร์.....	81
2.4 ผลการทดสอบสมบัติต้านจุลชีพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซาน วีสเกอร์จากการสัมผัสด้วยวิธีการวัดความกว้างของแถบการยับยั้ง.....	85
2.5 ผลการทดสอบสมบัติต้านจุลชีพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซาน วีสเกอร์ด้วยวิธีการนับโคโลนีและการคำนวณอัตราการลดลงของเชื้อ.....	87
ผลการศึกษาการกระจายตัวของโคโตซานวีสเกอร์ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดย น้ำหนักในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซิน.....	91
3.1 ผลการศึกษาตามมาตรฐานสากลเรื่องความถี่ของการแข็งตัว.....	93
3.2 ผลการศึกษาตามมาตรฐานสากลเรื่องการดูดซับน้ำและการละลายตัว....	94
3.3 ผลการศึกษาความแข็งผิววิกเกอร์ส.....	95
3.4 ผลการศึกษาอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่.....	96
3.5 ผลการศึกษาความหนืด.....	97
3.6 ผลการศึกษาระดับการรั่วซึมตามขอบ.....	98

4.2 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพและอัตราการอยู่รอดของเซลล์จากการ สัมผัสไวรัสโดยตรง.....	99
4.3 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพและอัตราการอยู่รอดของเซลล์จากการ สัมผัสไวรัสโดยอ้อม.....	100
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	103
สรุปผลการวิจัย.....	106
อภิปรายผลการวิจัย.....	106
ข้อเสนอแนะ .....	108
รายการอ้างอิง.....	124
ภาคผนวก.....	125
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	144
	180

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	แสดงปริมาณร้อยละของสารโคตินและสารประกอบอินทรีย์ในแหล่งธรรมชาติ 29
ตารางที่ 2	แสดงค่า MIC ของสารโคโตซานต่อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์..... 39
ตารางที่ 3	รุ่นผลิต วันหมดอายุและบริษัทผู้ผลิตสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย..... 43
ตารางที่ 4	แสดงค่าเฉลี่ยและความแตกต่างทางสถิติของอัตราการลดลงของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ภายหลังการสัมผัสวัสดุ..... 91
ตารางที่ 5	แสดงค่าเฉลี่ยและความแตกต่างทางสถิติอัตราการลดลงของเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิกายภายหลังการสัมผัสวัสดุ..... 92
ตารางที่ 6	แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความลึกของการแข็งตัว..... 94
ตารางที่ 7	แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดซับน้ำและละลายตัว.... 95
ตารางที่ 8	แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความแข็งผิววิกเกอร์ส..... 96
ตารางที่ 9	แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่.... 97
ตารางที่ 10	แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความหนืด..... 98
ตารางที่ 11	แสดงคลอสแทป (crosstab) ระหว่างระดับการรั่วซึมตามขอบและชนิดของวัสดุ 99
ตารางที่ 12	แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับการรั่วซึมตามขอบ..... 99
ตารางที่ 13	แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยร้อยละอัตราการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงภายหลังการสัมผัสโดยตรง..... 100
ตารางที่ 14	แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยร้อยละอัตราการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงภายหลังการสัมผัสอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการแช่วัสดุ..... 103

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1	แสดงสูตรโครงสร้างของสารบิส-จีเอ็มเอ ยูดีเอ็มเอและทีอีจีดีเอ็มเอ..... 11
ภาพที่ 2	แสดงลักษณะการเกิดกระบวนการไซโคลเซชันของมอนอเมอร์..... 12
ภาพที่ 3	แสดงสูตรโครงสร้างของสารบีเอ็มเอและปฏิกิริยาการแตกตัวเกิดอนุมูลอิสระ 13
ภาพที่ 4	แสดงสูตรโครงสร้างของแคมโฟรควิโนนและปฏิกิริยาการแตกตัวเกิดอนุมูลอิสระ 13
ภาพที่ 5	แสดงสูตรโครงสร้างของสารดีเอ็มเออีเอ็มเอ..... 14
ภาพที่ 6	แสดงกลไกการแข็งตัวด้วยแสงของพอลิเมอร์จากการกระตุ้นผ่านอนุมูลอิสระ..... 15
ภาพที่ 7	แสดงไดอะแกรมหัวกด รูปว่างรอยกดและรอยกดจริงบนวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน 19
ภาพที่ 8	แสดงไดอะแกรมก่อนของไหลขณะหยุดนิ่งและเมื่อได้รับแรง..... 22
ภาพที่ 9	แสดงแผนภูมिरูปแบบการเรียงตัวของโมเลกุลและการเกิดพันธะไฮโดรเจนแบบ สวนทางกันของไคตินชนิดอัลฟาและแบบทางเดียวกันของไคตินชนิดเบตา..... 30
ภาพที่ 10	(บน) แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารไคตินและสารไคโตซาน..... (ล่าง) แสดงกระบวนการสังเคราะห์ไคโตซานด้วยการกำจัดหมู่อะเซทาไมด์ใน โครงสร้างของสารไคตินโดยกระบวนการดีอะเซทิเลชันในสภาวะต่าง..... 32
ภาพที่ 11	แสดงแถบสเปกตรัมอินฟราเรดและตัวอย่างการวาดเส้นฐานเพื่อการคำนวณค่า ดีกรีออฟดีอะเซทิเลชัน..... 35
ภาพที่ 12	แสดงลักษณะเส้นใยไคโตซานวิสเกอร์ที่สกัดได้จากเปลือกกุ้งสายพันธุ์ <i>Penaeus merquiensis</i> ผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน..... 41
ภาพที่ 13	แสดงลักษณะเกล็ดไคติน เกล็ดไคตินภายหลังการบดด้วยเครื่องบดชนิดบด มิลล์และการเปรียบเทียบขนาดเกล็ดก่อนและหลังการบด..... 47
ภาพที่ 14	แสดงแผนภูมิสรุบบนขั้นตอนการสังเคราะห์ไคโตซานวิสเกอร์จากเปลือกกุ้ง..... 48
ภาพที่ 15	แสดงกระบวนการทำไคโตซานวิสเกอร์ให้แห้งด้วยวิธีไลโอไฟล์เซชันและลักษณะ วิสเกอร์ภายหลังกระบวนการทำให้แห้ง..... 50
ภาพที่ 16	แสดงแผนภูมิสรุบบนขั้นตอนการสังเคราะห์วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมไคโตซาน วิสเกอร์และการพิสูจน์เอกลักษณ์..... 52
ภาพที่ 17	แสดงการวัดความกว้างของแถบการยับยั้ง..... 54
ภาพที่ 18	แสดงแม่แบบโลหะที่ใช้ในการขึ้นรูปขึ้นทดสอบและมิติของขึ้นทดสอบ..... 59

ภาพที่ 19	แสดงวิธีการใช้เครื่องวัดความหนาแบบดิจิตอลเพื่อวัดความลึกของการแข็งตัว	60
ภาพที่ 20	แสดงแม่แบบโลหะสำหรับขึ้นรูปขึ้นทดสอบและขั้นตอนการฉายแสงเพื่อให้งานเกิดการแข็งตัว.....	61
ภาพที่ 21	แสดงลักษณะเครื่องวัดความดันขึ้นรูปขึ้นทดสอบและลักษณะขึ้นทดสอบหลังการอัดขึ้นรูป.....	64
ภาพที่ 22	แสดงลักษณะของแท่นโพแทสเซียมโบรไมด์.....	65
ภาพที่ 23	แสดงลักษณะของเครื่องตรวจวัดความหนืดและขั้นตอนการวัดด้วยแท่งทดสอบ	66
ภาพที่ 24	แสดงความหนาของขึ้นทดสอบที่ผ่านการตัด.....	67
ภาพที่ 25	แสดงการจำแนกระดับการรั่วซึมตามขอบ.....	68
ภาพที่ 26	แสดงลักษณะช่องสี่เหลี่ยมของฮีโมไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และตัวอย่างในการเลือกนับเซลล์.....	70
ภาพที่ 27	แสดงการวางขึ้นทดสอบในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยการสัมผัสตรง (ภาพแสดงด้านข้างและภาพแสดงด้านบน).....	71
ภาพที่ 28	แสดงสารคอลลอยด์ไคตินวีลเกอร์และสารคอลลอยด์ไคโตซานวีลเกอร์ภายในถุงเยื่อแผ่นกรอง.....	75
ภาพที่ 29	แสดงแถบสเปกตรัมอินฟราเรดของสารไคตินวีลเกอร์.....	76
ภาพที่ 30	แสดงแถบสเปกตรัมอินฟราเรดของสารไคโตซานวีลเกอร์.....	77
ภาพที่ 31	แสดงแผนภูมิความยาวโดยเฉลี่ยระดับนาโนเมตรของไคโตซานวีลเกอร์.....	78
ภาพที่ 32	แสดงแผนภูมิความกว้างโดยเฉลี่ยระดับนาโนเมตรของไคโตซานวีลเกอร์.....	78
ภาพที่ 33	แสดงลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของเส้นใยไคโตซานวีลเกอร์ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า.....	79
ภาพที่ 34	แสดงลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของเส้นใยไคโตซานวีลเกอร์ที่กำลังขยาย 25,000 เท่า.....	79
ภาพที่ 35	แสดงเส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณเชื้อเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์.....	80
ภาพที่ 36	แสดงเส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอี.....	80
ภาพที่ 37	แสดงภาพรวมแถบการยับยั้งของไคโตซานวีลเกอร์ความเข้มข้นโดยน้ำหนักต่างกันและวัสดุควบคุมต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์.....	81
ภาพที่ 38	แสดงแถบการยับยั้งของไคโตซานวีลเกอร์แต่ละความเข้มข้นโดยน้ำหนักและ	

	วัสดุควบคุมต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์.....	82
ภาพที่ 39	แสดงภาพรวมแถบการยับยั้งของโคโตซานวีสเกอร์ความเข้มข้นโดยน้ำหนักต่างกันและวัสดุควบคุมต่อเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอีย.....	83
ภาพที่ 40	แสดงแถบการยับยั้งของโคโตซานวีสเกอร์แต่ละความเข้มข้นโดยน้ำหนักและวัสดุควบคุมต่อเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอีย.....	84
ภาพที่ 41	แสดงความขุ่นของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นต่างๆกันของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์.....	85
ภาพที่ 42	แสดงความขุ่นของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นต่างๆกันเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอีย.....	86
ภาพที่ 43	แสดงภาพรวมแถบการยับยั้งของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันกลุ่มทดสอบ กลุ่มควบคุมและกลุ่มเปรียบเทียบของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์.....	87
ภาพที่ 44	แสดงแถบการยับยั้งของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันแต่ละกลุ่มทดสอบ กลุ่มควบคุมและกลุ่มเปรียบเทียบของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์.....	88
ภาพที่ 45	แสดงภาพรวมแถบการยับยั้งของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันกลุ่มทดสอบ กลุ่มควบคุมและกลุ่มเปรียบเทียบของเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอีย.....	89
ภาพที่ 46	แสดงแถบการยับยั้งของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันแต่ละกลุ่มทดสอบ กลุ่มควบคุมและกลุ่มเปรียบเทียบของเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอีย.....	90
ภาพที่ 47	แสดงลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของเส้นใยโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินที่กำลังขยาย 2,000 เท่า.....	93
ภาพที่ 48	แสดงลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของเส้นใยโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินที่กำลังขยาย 8,000 เท่า.....	93
ภาพที่ 49	แสดงลักษณะทางกายภาพของเซลล์โดยรอบภายหลังการสัมผัสวัสดุทดสอบโดยตรง และแถบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยรอบวัสดุควบคุมทางบวก.....	101
ภาพที่ 50	แสดงลักษณะทางกายภาพของเซลล์ภายหลังการสัมผัสอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการแช่วัสดุทดสอบและวัสดุควบคุมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	104

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคฟันผุเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขระดับประเทศ ในประเทศไทยจากรายงานของกระทรวงสาธารณสุขพบอัตราฟันผุของเด็กไทยอายุ 6 และ 12 ปีสูงถึงร้อยละ 81 และ 57 ตามลำดับ (กระทรวงสาธารณสุข, 2550) โดยตำแหน่งที่พบการผุมากที่สุดคือ บริเวณหลุมและร่องฟัน (pit&fissure) ซึ่งคราบจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุในการทำให้เกิดการผุเกิดการเกาะติดได้ง่ายและยากต่อการกำจัด ในอดีตมีผู้คิดค้นวิธีการป้องกันฟันผุมากมายทั้งด้านกายภาพและการใช้สารเคมีเพื่อเพิ่มความต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยในการเกิดการผุบนผิวเคลือบฟัน วิธีการดังกล่าวรวมถึงการใช้วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันซึ่งเป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับจากสมาคมทันตแพทย์สหรัฐอเมริกา ตั้งแต่ในปี 1976 และถูกนำมาใช้ในทางคลินิกอย่างแพร่หลาย การใช้สารสังเคราะห์เคลือบปิดหลุมร่องฟันจะเป็นสร้างสิ่งกีดขวางทางกายภาพซึ่งเป็นวิธีการป้องกันที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการผุที่เกิดขึ้นด้านบดเคี้ยวได้ดี มีความปลอดภัยและเป็นที่ยอมรับกันในปัจจุบัน (Beirut และคณะ, 2006)

วัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน (pit&fissure sealant) คือ วัสดุที่ใช้ในการทาลงบนหลุมและร่องลึกบนด้านบดเคี้ยวของฟันกรามซึ่งมีความเสี่ยงสูงในการเกิดโรคฟันผุ วัสดุเหล่านี้มีการยึดติดกับผิวฟันด้วยวิธีการต่างๆ เช่น ความแข็งแรงด้วยพันธะทางเคมี (chemical bond) ของวัสดุประเภทกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (Glass ionomer cement) หรือความแข็งแรงยึดเชิงกลระดับจุลภาค (micromechanical bond) ของวัสดุในกลุ่มเรซิน อาทิเช่น วัสดุเคลือบชนิดเรซิน (resin sealant) วัสดุเคลือบชนิดเรซินคอมโพสิตแบบไหลแผ่ (flowable resin composite sealant) และวัสดุเคลือบชนิดสารเดนตินบอนด์ (dentine bonding agent sealant) เป็นต้น พัฒนาการของการนำวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินมาใช้เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดกว่า 50 ปีที่ผ่านมา นับตั้งแต่มีการเสนอเป็นครั้งแรกโดย Cueto และคณะในปี 1965 โดยแนะนำการใช้กรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 50 ร่วมกับเมทิลเมทาคริเลตมอนอเมอร์ (methylmethacrylate monomer) และผงซิลิกา (Silica powder) ที่มีองค์ประกอบคล้ายกับซิลิเกตซีเมนต์ในยุคแรกเป็นวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันโดยพบอัตราการยึดติดอยู่ของวัสดุภายหลังการใช้งานปีแรกมากถึงร้อยละ 71 และสามารถลดอัตราการเกิดฟันผุได้ร้อยละ 87 (Cueto, 1965, , 1967) ทำให้แนวคิดนี้เริ่มได้รับการยอมรับและเกิดการพัฒนาอย่างต่อเนื่องทั้งในการปรับปรุงการใช้งานทางคลินิกของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันและการพัฒนาของตัววัสดุเอง ในปัจจุบัน

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยสามารถผลิตวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินและจัดจำหน่ายในท้องตลาดภายใต้ชื่อทางการค้าว่า 프리โวแคร์ (Prevo™ care) เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของทันตแพทย์ในการใช้งานวัสดุชนิดนี้ อีกทั้งยังเป็นการช่วยลดการนำเข้าวัสดุจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันดังกล่าวมีองค์ประกอบหลักเป็นสารมอนอเมอร์ประเภทไดเมทาคริเลท เช่น สารบิส-จีเอ็มเอ (bis-GMA) สารทีอีจีดีเอ็มเอ (TEGDMA) และสารดีเอ็มเออีเอ็มเอ (DMAEMA) เป็นต้น จากการศึกษาสมบัติทางกายภาพตามมาตรฐานสากลไอเอสโอในเรื่องความลึกของการแข็งตัว (depth of cure) ความหนาของชั้นผิวที่ไม่แข็งตัว (uncured film thickness) การดูดซับน้ำ (water sorption) และการละลายตัว (solubility) รวมถึงสมบัติทางกายภาพอื่นที่จำเป็นในการประเมินคุณสมบัติการใช้งานวัสดุ เช่น อัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ในโครงสร้างมอนอเมอร์หรือดีกรีของฟคอนเวอร์ชัน (degree of conversion) และความแข็งผิวระดับจุลภาคแบบวิกเกอร์ส (Vickers microhardness) โดยเปรียบเทียบกับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินจากต่างประเทศที่มีจำหน่ายในประเทศไทยชื่อคอนไซส์ (Concise™; 3M ESPE, USA) พบว่า วัสดุชื่อฟรีโวแคร์มีคุณสมบัติผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานสากลกำหนดและมีประสิทธิภาพใกล้เคียงวัสดุชื่อคอนไซส์ (สุทธิต พูลทอง และคณะ, 2547) นอกจากนี้การศึกษาคือความเป็นพิษต่อเซลล์ของวัสดุฟรีโวแคร์พบอัตราการมีชีวิตของเซลล์ทดสอบโดยการสัมผัสมากถึงร้อยละ 96 และ 99 โดยทางตรงและโดยอ้อมตามลำดับ (อนุชาติ ศรีจันบาล และคณะ, 2547) ผลการศึกษาดังกล่าวทำให้วัสดุฟรีโวแคร์เป็นวัสดุที่มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ในทางคลินิกระดับหนึ่ง

เนื่องจากโรคฟันผุเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างกรดและเกาะติดบริเวณผิวฟัน ทำให้เกิดการละลายของแร่ธาตุจนทำให้เกิดการผุแบคทีเรียที่มีความสำคัญโดยเฉพาะสายพันธุ์สเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus* sp.) และแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus* sp.) และแอคติโนมัยซิส (*Actinomyces* sp.) (Beirut และคณะ, 2006) การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงมีแนวคิดในการนำสารต้านจุลชีพ (antimicrobial agent) ใส่ลงในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินโดยเลือกใช้สารไคโตซาน (chitosan) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านจุลชีพที่ได้จากธรรมชาติที่มีข้อดีหลายประการ อาทิเช่น สามารถทำการสกัดได้จากวัตถุดิบที่มีอยู่มากมายในธรรมชาติทำให้หาได้ง่ายและมีราคาไม่สูงนัก สารธรรมชาติดังกล่าวเป็นอนุพันธ์หนึ่งของสารไคตินซึ่งเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีมากที่สุดในโลกรองจากเซลลูโลส มักจะพบในโครงสร้างหลักของสัตว์ที่มีเปลือกแข็งห่อหุ้มร่างกาย (exoskeleton) เช่น กุ้ง ปู แคนพลาลมิก เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากไคโตซานเกิดขึ้นอย่างมากมายเนื่องจากคุณสมบัติในหลายๆด้าน อาทิเช่น การประยุกต์ใช้ในด้านการแพทย์ เช่น ไหมเย็บแผล ผิวหนังเทียม วัสดุซ่อมแซมกระดูกหรือเลนส์แก้วตาเทียมเนื่องจากสมบัติความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพ (biocompatibility) สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradability) รวมทั้ง



การย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ในร่างกายและสนับสนุนการหายของแผล เป็นต้น หรือการนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของยาประเภทปลดปล่อยต่อเนื่อง (controlled release drug) เนื่องจากมีความทนทานทางชีวภาพสูงและไม่มีความเป็นพิษ (biological tolerance and nontoxic) ความสามารถในการยับยั้งและ/หรือฆ่าเชื้อโรค (antimicrobial activity) ทำให้เกิดการนำไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมบำบัดน้ำเสีย การเกษตร อุตสาหกรรมด้านแปรรูปและถนอมอาหาร เป็นต้น (Kurita, 2006; Rinaudo, 2006)

การศึกษาค้นคว้าวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อการพัฒนาปรับปรุงวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินที่มีมอนอเมอร์พื้นฐานประเภทไดเมทาคริเลทโดยผสมสารต้านจุลชีพโคโตซานในรูปแบบวิสเกอร์ระดับนาโนเมตร (nanoscaled-whiskers) ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคฟันผุบริเวณหลุมร่องฟัน (cariogenic bacteria) ศึกษาสมบัติทางกายภาพตามเกณฑ์มาตรฐานสากลไอเอสโอและสมบัติทางชีวภาพที่มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการใช้งานทางคลินิก ทั้งนี้เพื่อมุ่งหวังในการปรับปรุงวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินไดเมทาคริเลทให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นและสามารถผลิตใช้งานได้เองภายในประเทศอย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. พัฒนาวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินชนิดต้านจุลชีพ (antimicrobial resin pit and fissure sealant)
2. ทดสอบคุณสมบัติของวัสดุ ดังต่อไปนี้
  - 2.1 ทางกายภาพตามมาตรฐานสากลไอเอสโอ 6874:2005 และ 4049:2000 ความแข็งผิว อัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ ความหนืดและการรั่วซึมตามขอบ
  - 2.2 ทางชีวภาพโดยศึกษาอัตราการอยู่รอดของเซลล์ในห้องปฏิบัติการ

## สมมติฐานของการวิจัย

### 1. สมบัติต้านจุลชีพ

สมมติฐานว่าง: อัตราลดลงของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์และแลคโตบาซิลลัส คาเซอิกายหลังการสัมผัสวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2.5, 2, 1.5, 1 และ 0 โดยน้ำหนักและวัสดุเปรียบเทียบไม่แตกต่างกัน

สมมติฐานแย้ง: อัตราลดลงของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์และแลคโตบาซิลลัส คาเซอิกายหลังการสัมผัสวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2.5, 2, 1.5, 1 และ 0 โดยน้ำหนักและวัสดุเปรียบเทียบต่างกันอย่างน้อย 1 คู่

### 2. สมบัติกายภาพ

#### 2.1 ความลึกของการแข็งตัว

สมมติฐานว่าง: ค่าความลึกการแข็งตัวของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์น้อยที่สุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดและวัสดุเปรียบเทียบไม่แตกต่างกัน

สมมติฐานแย้ง: ค่าความลึกการแข็งตัวของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์น้อยที่สุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดและวัสดุเปรียบเทียบต่างกันอย่างน้อย 1 คู่

#### 2.2 การดูดซึมน้ำ



## 2.7 ระดับการวิจัยตามขอบ

2.7.1 สมมติฐานว่าง: ระดับการวิจัยตามขอบไม่ขึ้นกับชนิดของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน

สมมติฐานแย้ง: ระดับการวิจัยตามขอบขึ้นกับชนิดของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน

2.7.2 สมมติฐานว่าง: ค่าเฉลี่ยระดับการวิจัยตามขอบของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์น้อยที่สุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดและวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์ไม่แตกต่างกัน

สมมติฐานแย้ง: ค่าเฉลี่ยระดับการวิจัยตามขอบของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์น้อยที่สุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดและวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์แตกต่างกัน

## 3. สมบัติทางชีวภาพ

สมมติฐานว่าง: อัตราการอยู่รอดของเซลล์ภายหลังการสัมผัสโดยตรงและโดยอ้อมของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์น้อยที่สุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดและวัสดุเปรียบเทียบไม่แตกต่างกัน

สมมติฐานแย้ง: อัตราการอยู่รอดของเซลล์ภายหลังการสัมผัสโดยตรงและโดยอ้อมของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์น้อยที่สุดที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดและวัสดุเปรียบเทียบแตกต่างกันอย่างน้อย 1 คู่

### ขอบเขตของการวิจัย

1. วัตถุประสงค์สำหรับการสกัดและเตรียมโคโตซานวิสเกอร์ในการศึกษาคั้งนี้คือ เปลือกกุ้งสายพันธุ์ *Litopaneous vannamei*

2. การศึกษาสมบัติด้านจุลชีพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินที่มีฤทธิ์ด้านจุลชีพจะกระทำในแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก 2 สายพันธุ์คือสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ (UA 159) และแลคโตบาซิลลัส คาเซอี (IFO 3533)

3. การวิจัยนี้เป็นการสังเคราะห์วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินชนิดต้านจุลชีพโดยเปรียบเทียบสมบัติด้านจุลชีพ สมบัติทางกายภาพและความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงกับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน 5 ชนิด ได้แก่

3.1 วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินไม่เสริมโคโคซานวีสเกอร์ ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์บิส-จีเอมเอ ทีอีจีดีเอมเอและดีเอมเออีเอมเอเป็นวัสดุกลุ่มควบคุม

3.2 วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินเสริมเส้นใยโคโคซานวีสเกอร์ในปริมาณร้อยละ 2.5, 2, 1.5 และ 1 โดยน้ำหนัก โดยภายหลังการทดสอบสมบัติด้านจุลชีพจะเลือกเฉพาะกลุ่มที่มีโคโคซานวีสเกอร์ปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดการยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดที่ใช้ในการทดสอบในงานวิจัยครั้งนี้

3.3 วัสดุกลุ่มเปรียบเทียบในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ สารบอนด์ซีลหือซีล แอนดีโพรเทกท์ (Seal&Protect®; DENTSPLY, USA) ที่มีส่วนประกอบสารไตรโคซาน วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินยี่ห้อทีทเมท-เอฟวัน (Teethmate™F-1; KURARAY, JAPAN) ที่มีส่วนประกอบฟลูออไรด์และวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินยี่ห้อเดลตัน (Delton®; DENTSPLY, USA) ที่ไม่มีส่วนผสมของสารต้านจุลชีพ

4. การศึกษาสมบัติทางชีวภาพโดยการวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธีการเอ็มทีที (MTT assay) เลือกใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์สายพันธุ์จากหนูชนิด L929 (ATCC, CCL-1) ตามมาตรฐานสากล 10993-5:2009

### ข้อตกลงเบื้องต้น

1. การสกัดและเตรียมสารโคโคซานวีสเกอร์รวมทั้งการผสมลงในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซิน การเตรียมขึ้นทดสอบและกระทำการทดสอบทุกส่วนทำโดยผู้วิจัยเพียงคนเดียว

2. การเตรียมขึ้นทดสอบและดำเนินการทดสอบกระทำภายใต้สภาวะอุณหภูมิ  $25 \pm 1$  องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ  $50 \pm 10$

### ข้อจำกัดของการวิจัย

1. การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาวิจัยทางห้องปฏิบัติการซึ่งการจำลองปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องไม่สามารถทำให้เหมือนสภาพในช่องปากจริงได้ทุกประการ
2. สมบัติด้านจุลชีพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ไม่สามารถนำไปใช้เปรียบเทียบในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้
3. ผลการวิจัยไม่สามารถอ้างอิงวัสดุที่ใช้ในการเคลือบหลุมร่องฟันชนิดอื่นๆที่ต่างออกไปจากวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

### คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Resin pit and fissure sealant : วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซิน

Chitosan whiskers : เส้นใยโคโตซานวีสเกอร์

Degree of Deacetylation : ดีกรีออฟดีอะเซทิลเลชัน

Antimicrobial property : สมบัติด้านจุลชีพ

Bacterial reduction rate : อัตราลดลงของเชื้อแบคทีเรีย

Depth of cure : ความลึกของการแข็งตัว

Water sorption and solubility : การดูดซับน้ำและการละลายตัว

Vickers hardness : ความแข็งผิววิกเกอร์ส

Degree of double bond conversion : อัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่

Viscosity : ความหนืด

Marginal leakage : การรั่วซึมตามขอบ

Cytotoxicity test : การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นการปรับปรุงวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่ผลิตได้เองและจำหน่ายแล้วในท้องตลาด (Prevo™ care) ที่มีอนุโมเมอร์องค์ประกอบประเภทไดเมทาคริเลทให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อโดยเฉพาะแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคฟันผุโดยคงสมบัติทางกายภาพใกล้เคียงกับวัสดุตั้งต้นและไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์
2. การแปรรูปโดยใช้วัตถุดิบที่เหลือใช้ในอุตสาหกรรมอาหารทะเลให้เกิดคุณค่าเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าวัตถุดิบที่นำมาใช้รวมทั้งเป็นการลดปริมาณขยะที่เกิดขึ้น
3. การจดสิทธิบัตรผลิตภัณฑ์ทางการค้าในอนาคต
4. การจัดจำหน่ายเพื่อลดการขาดดุลการค้าจากการนำเข้าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินจากต่างประเทศและสร้างความสามารถในการแข่งขันกับผลิตภัณฑ์ประเภทเดียวกันจากต่างประเทศ

## วิธีดำเนินการวิจัย

วิจัยเชิงสังเคราะห์และทดลอง

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

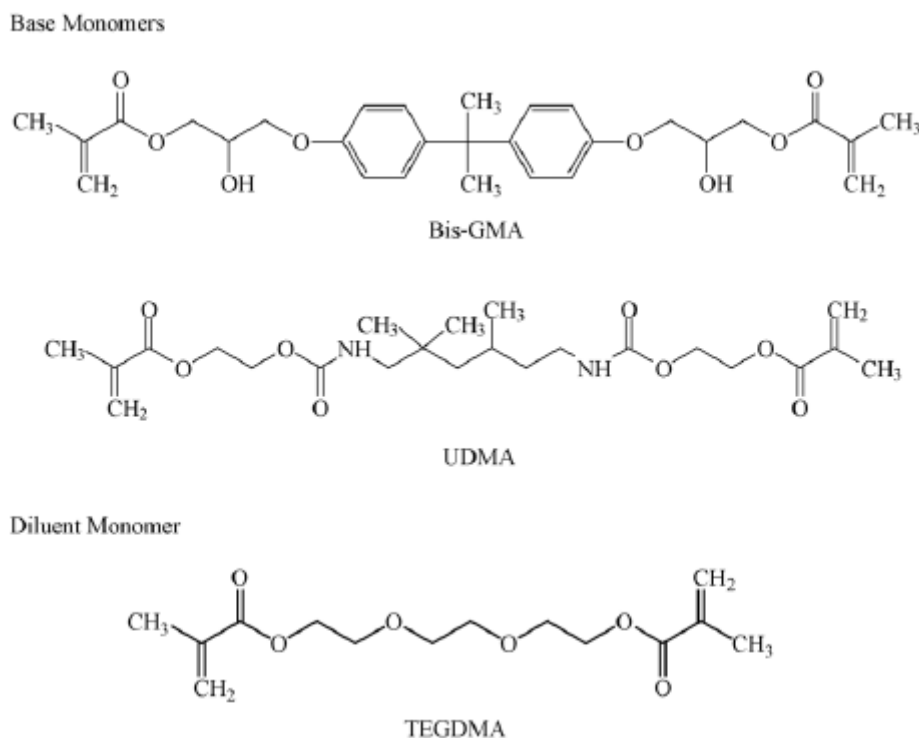
#### 1. วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซิน (resin pit and fissure sealant)

##### 1.1 องค์ประกอบ

##### 1.1.1 มอนอเมอร์พื้นฐาน (base monomer)

ในปี 1955 Buonocore แนะนำการใช้สารประเภทเรซินมอนอเมอร์กับผิวเคลือบฟันที่ถูกกรดกัด (etched enamel surface) เพื่อส่งเสริมการยึดติดระหว่างวัสดุบูรณะประเภทเรซินกับผิวฟัน (Buonocore, 1955) นับตั้งแต่นั้นแนวคิดของการใช้สารจำพวกมอนอเมอร์บนผิวฟันที่ผ่านการปรับสภาพจึงเริ่มขึ้นและเข้าสู่การพัฒนาทางด้านทันตวัสดุศาสตร์เป็นลำดับ ต่อมาในปี 1963 Bowen ได้ทำการสังเคราะห์สารเรซินมอนอเมอร์ประเภทไดเมทาคริเลทซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารบิสฟีนอลเอ (dimethacrylate derivative of bisphenol A) คือ สารบิส-จีเอ็มเอ (2,2-bis[4-(2-hydroxy-3-methacryloxy-propoxy-phenyl)]-propane; Bis-GMA) (Bowen, 1963) มอนอเมอร์ ชนิดนี้มีความคงตัวมากและพบการระเหยตัวน้อยเนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (ภาพที่ 1) ทำให้มักถูกใช้เป็นมอนอเมอร์พื้นฐาน (base monomer) ในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันประเภทเรซินเนื่องจากภายหลังการเกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวจะทำให้ได้พอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างแข็งแรง หนาแน่นและเกิดการหดตัว (polymerization shrinkage) น้อยกว่า การศึกษาอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ของสารบิส-จีเอ็มเอ พบว่ามีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 54 ถึง 85 ใกล้เคียงกับสารยูรีเทนเอ (urethane dimethacrylate; UDMA) ซึ่งเป็นมอนอเมอร์พื้นฐานอีกชนิดหนึ่งที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกัน โดยมีอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่อยู่ระหว่างร้อยละ 76 ถึง 87 เป็นต้น (Floyd และ Dickens, 2006)



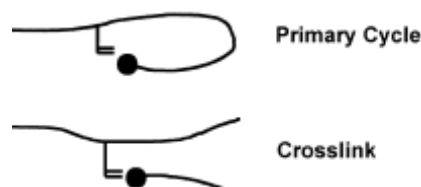


ภาพที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของสารบิส-จีเอ็มเอ ยูดีเอ็มเอและทีอีจีดีเอ็มเอ (Floyd และ Dickens, 2006)

### 1.1.2 มอนอเมอร์ตัวทำละลาย (diluent monomer)

นอกจากส่วนประกอบหลักดังกล่าวแล้ววัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินจำเป็นต้องเติมองค์ประกอบอื่นร่วมด้วยเช่น การผสมมอนอเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลและความหนืดต่ำ คุณณภูมิห้องเพื่อให้วัสดุมีการไหลแผ่ (flow) ดีขึ้น การศึกษาพบว่า การใส่มอนอเมอร์กลุ่มนี้นอกจากจะช่วยลดความหนืดแล้วยังช่วยเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเนื้อพอลิเมอร์ให้สมบูรณ์มากขึ้นซึ่งจะช่วยลดการปลดปล่อยมอนอเมอร์หลงเหลือจากปฏิกิริยาให้น้อยลง (Dickens และคณะ, 2003; Floyd และ Dickens, 2006) อย่างไรก็ตามพบว่า การใส่มอนอเมอร์ ประเภทนี้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม (มากกว่าร้อยละ 42 โดยปริมาตร) อาจส่งผลเสียต่อสมบัติโดยรวมของพอลิเมอร์เนื่องจากโมเลกุลของมอนอเมอร์เหล่านี้มีขนาดเล็ก มีความยืดหยุ่นสูงและมักเกิดกระบวนการไซโคลเซชัน (cyclization) ซึ่งเป็นกระบวนการเกิดพอลิเมอร์ไซคลิกภายในสายมอนอเมอร์เอง (ภาพที่ 2) ทำให้หมู่ฟังก์ชันพันธะคู่ปลายสายมอนอเมอร์เหลือน้อยลง เกิดการเชื่อมต้อ (crosslink) ระหว่างสายพอลิเมอร์ได้น้อย ผลลัพธ์ที่ได้คือการเกิดพอลิเมอร์ที่มีคุณภาพต่ำและมีลักษณะไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (heterogeneous polymer formation) มีการหดตัวเชิงปริมาตร (volumetric shrinkage) สูงภายใต้ปฏิกิริยาการแข็งตัวและมีความแข็งแรงดัดขวางแบบเฟล็กเซอร์ล (flexural strength) ลดลง เป็นต้น

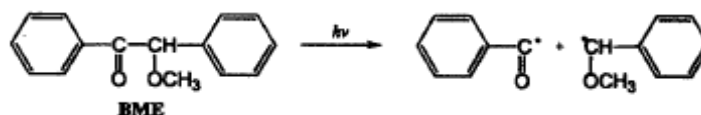
(Elliott และคณะ, 2001; Barszczewska-Rybarek, 2009) มอนอเมอร์กลุ่มนี้ที่นิยมใช้มากในทางทันตกรรมได้แก่ สารที่ชื่อดีอีเอ็มเอ (triethylene glycol dimethacrylate ; TEGDMA) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะการเกิดกระบวนการไซโคลเซชันของมอนอเมอร์ (Elliott และคณะ, 2001)

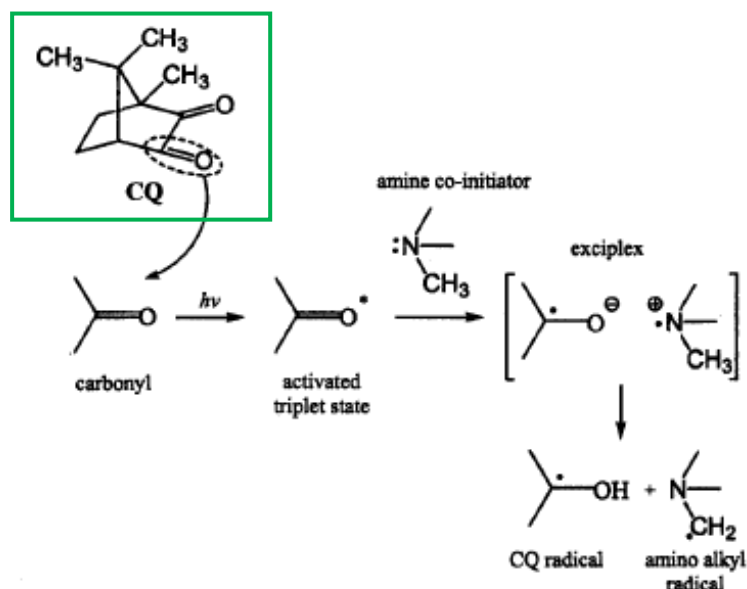
### 1.1.3 สารเริ่มต้นปฏิกิริยา (initiator) และสารเริ่มต้นร่วมปฏิกิริยา (co-initiator)

การแข็งตัวของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันประเภทเรซินอาจเกิดได้ทั้งจากปฏิกิริยาทางเคมี (chemical-curing polymerization) และจากปฏิกิริยากระตุ้นด้วยแสง (photo-curing polymerization) ปฏิกิริยาทั้งสองประเภทเริ่มต้นจากอนุมูลอิสระ (free radical) จากสารเริ่มต้นปฏิกิริยาที่ต่างกันไปในแต่ละระบบ สำหรับการแข็งตัวด้วยปฏิกิริยาทางเคมีจะใช้สารกลุ่มเพอร์ออกไซด์ร่วมกับสารเอมีนเป็นสารเริ่มต้นร่วมในการเกิดปฏิกิริยา แต่ความนิยมในกลุ่มนี้มีไม่มากนัก เนื่องจากความยุ่งยากในการใช้งานทางคลินิกและใช้เวลานานกว่าในการเกิดปฏิกิริยาจนแข็งตัวเต็มที่ ปฏิกิริยาการแข็งตัวจากการกระตุ้นด้วยแสงจึงได้รับความนิยมมากกว่าเนื่องจากช่วยลดขั้นตอนและใช้เวลาการทำงานน้อยกว่า สารเริ่มต้นปฏิกิริยาด้วยแสง (photoinitiator) คือโมเลกุลสารที่มีความสามารถในดูดซับพลังงานจากแสง ทำให้เกิดอนุพันธ์ชนิดที่มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (reactive species) โดยทั่วไปมักเกิดบนหมู่ฟังก์ชันที่มีพันธะคู่เช่น หมู่คาร์บอนิล(carbonyl group) เป็นต้นพร้อมกับการเกิดอิเล็กตรอนอิสระเดี่ยวที่ไม่เกิดพันธะ (nonbonding electron) ที่เป็นอนุมูลอิสระและไม่เสถียร โดยแสงที่ใช้ในยุคแรกคือ แสงอัลตราไวโอเล็ต ร่วมกับสารเริ่มต้นปฏิกิริยาตัวอย่างเช่น สารบีเอ็มอี (benzoin methyl ether : BME) โดยมีสูตรโครงสร้างและขั้นตอนการแตกตัวเพื่อให้เกิดอนุมูลอิสระดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงสูตรโครงสร้างของสารบีเอมอีและปฏิกิริยาการแตกตัวเกิดอนุมูลอิสระ (Stansbury, 2000)

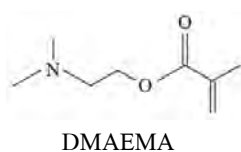
ในปัจจุบันสารเริ่มต้นปฏิกิริยาที่ได้รับความนิยมในระบบแข็งตัวด้วยแสงคือ สารแคมโฟควิโนน (Camphorquinone: bornanedione, 1,7,7-trimethylbicyclo [2.2.1] heptanes-2,3-dione) (ภาพที่ 4) ซึ่งมีความสามารถในการดูดซับคลื่นแสงกว้างทั้งในช่วงความยาวคลื่นแสงยูวี (UV light; 200-300 นาโนเมตร) และช่วงความยาวคลื่นที่ตามองเห็น (visible light; 400-500 นาโนเมตร) ซึ่งอยู่ในช่วงแสงสีฟ้าประมาณ 468 นาโนเมตร (Corrales และคณะ, 2003; Jakubiak และคณะ, 2003; Teshima และคณะ, 2003) โดยแสงกระตุ้นในช่วงความยาวคลื่นที่ตามองเห็นจะได้รับความนิยมมากกว่าเนื่องจากลดอันตรายที่เกิดจากการใช้แสงยูวี



ภาพที่ 4 แสดงสูตรโครงสร้างของแคมโฟควิโนนและปฏิกิริยาการแตกตัวเกิดอนุมูลอิสระ (Stansbury, 2000)

แม้ว่าสารแคมโฟควิโนนจะเป็นสารเริ่มต้นปฏิกิริยาเองได้แต่ปฏิกิริยาก็เกิดขึ้นได้ช้าหากใช้เพียงลำพัง จึงจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบอีกชนิดหนึ่งที่ช่วยเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวให้เร็วขึ้นเรียกว่า สารเริ่มต้นร่วมปฏิกิริยา (co-initiator) การศึกษาโดยการวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาด้วยอินฟราเรดสเปคโทรสโคปี (Ruyter และ Gyrosi, 1976) และแคลอริเมตริก (Ruyter และ Svendsen, 1978) พบว่า การใส่สารเริ่มต้นร่วมปฏิกิริยาจะช่วยเพิ่มทั้งความไวและอัตราการเกิดปฏิกิริยา โดยทั่วไปสารในกลุ่มนี้มักเป็นสารประกอบในกลุ่มเอมีน (amine compound) ที่ทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนที่เกิดจากสารเริ่มต้นปฏิกิริยาให้กับสารตั้งต้นปฏิกิริยา

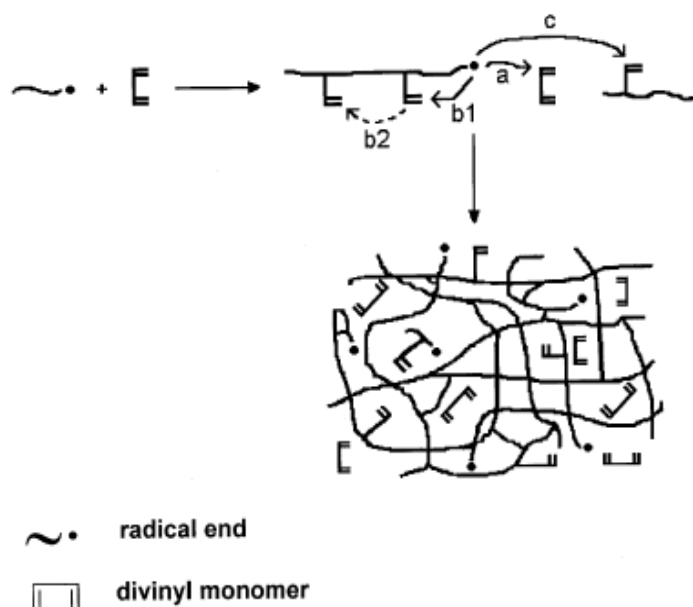
ผ่านทางหมู่ฟังก์ชันคาร์บอนิล ตัวอย่างสารเริ่มต้นร่วมปฏิกิริยาที่มักใช้ควบคู่กับสารแคมโฟควิโนนคือ สารเอมีนดีเอมเออีเอ็มเอ (N,N-Dimethylamino ethyl methacrylate; DMAEMA) ดังแสดงสูตรโครงสร้างในภาพที่ 5 การศึกษาเรื่องปริมาณของสารแคมโฟควิโนนต่อสารเอมีนสัดส่วนต่าง ๆ กันที่มีผลต่อความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาพบว่า ควรมีสัดส่วนอยู่ระหว่าง 1 ต่อ 2 ถึง 1 ต่อ 3 โดยพบว่าการใช้สารเอมีนมากกว่าสัดส่วนดังกล่าวไม่ได้ช่วยเร่งปฏิกิริยาให้เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด (Yoshida และ Greener, 1993) และสารแคมโฟควิโนนควรมีปริมาณอยู่ระหว่างร้อยละ 0.5 ถึง 1 (Yoshida และ Greener, 1994; Venhoven และคณะ, 1996)



ภาพที่ 5 แสดงสูตรโครงสร้างของสารดีเอมเออีเอ็มเอ (Craig และ Powers, 2002)

#### 1.1.4 ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซิน

เมื่อวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินได้รับพลังงานจากแสงที่มีความเหมาะสม สารเริ่มต้นปฏิกิริยาจะเริ่มเกิดการแตกตัวจนกระทั่งอนุมูลอิสระภายในวัสดุมีความเข้มข้นสูงมากขึ้นอย่างรวดเร็วและเริ่มเข้าสู่สมดุลเมื่อถึงระดับที่อัตราการเกิดเท่ากับอัตราการหยุดสร้างอนุมูลอิสระ (radical termination rate) เพื่อที่จะถึงระดับนี้พลังงานแสงต้องมีปริมาณมากพอและนานพอที่จะทำให้ปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์ (Watts, 2005) แต่อย่างไรก็ดีปฏิกิริยาดังกล่าวมักไม่ได้เกิดอย่างสมบูรณ์ภายใต้สภาพบรรยากาศปกติเนื่องจากหลายปัจจัย เช่น การสัมผัสของออกซิเจนบริเวณผิววัสดุและเข้าจับกับหมู่ฟังก์ชันคาร์บอนิล เวลาการฉายแสงที่ไม่มากพอหรือการไม่มีฟิลเลอร์เป็นองค์ประกอบในวัสดุซึ่งมีผลต่อการกระจายพลังงานจากแสงที่ได้รับภายในวัสดุไม่เพียงพอ เป็นต้น หลังจากนั้นอิเล็กตรอนอิสระที่เกิดขึ้นในระบบจะถูกเร่งถ่ายโอนโดยสารเริ่มต้นร่วมปฏิกิริยาให้กับมอนอเมอร์พื้นฐานและมอนอเมอร์ตัวทำละลาย เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อเนื่องและเริ่มเกิดการแข็งตัวต่อกันเป็นสายยาว (linear polymerization) และเป็นโครงข่ายพอลิเมอร์ (networking polymerization) ดังแสดงในแผนภูมิภาพที่ 6 (Stansbury, 2000; Corrales และคณะ, 2003)



ภาพที่ 6 แสดงกลไกการแข็งตัวของพอลิเมอร์จากการกระตุ้นผ่านอนุมูลอิสระ (Stansbury, 2000)

#### 1.1.5 วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินพรีโวกแคร์ (Prevo™ care)

ปัจจุบันคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้ผลิตวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินออกจำหน่ายในท้องตลาดในชื่อการค้าว่า พรีโวกแคร์ (Prevo™ care) โดยผลิตออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดใสและขุ่น โดยทั้งสองชนิดมีสารบิส-จีเอ็มเอและทีอีจีดีเอ็มเอเป็นมอนอเมอร์หลักในอัตราส่วน 1.4 ต่อ 1 โดยน้ำหนักร่วมกับสารดีเอ็มเออีเอ็มเอและแคมโฟโรควิโนนเป็นสารเริ่มต้นร่วมปฏิกิริยาและสารเริ่มต้นปฏิกิริยาในสัดส่วนร้อยละ 1 และ 0.8 ตามลำดับ จากการศึกษาสมบัติทางกายภาพของวัสดุพรีโวกแคร์พบว่า วัสดุมีค่าความลึกของการแข็งตัว การดูดซับน้ำและการละลายตัวผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานไอเอสไอเช่นเดียวกับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อคอนไซส์ (Concise®, 3M ESPE, USA) ซึ่งเป็นวัสดุที่มีการศึกษาอย่างยาวนานและได้รับความนิยมในการใช้งานทางคลินิก การทดสอบความแข็งผิวระดับไมโครแบบวิกเกอร์ส (Vickers micro-hardness) พบว่า วัสดุพรีโวกแคร์มีค่าความแข็งผิว ( $18.51 \pm 0.38$ ) สูงกว่าวัสดุคอนไซส์ ( $16.76 \pm 0.43$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากสมบัติดังกล่าวแล้วยังทำการศึกษาค่าดีกรีออฟคอนเวอร์ชันหรืออัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงร้อยละของพันธะคู่ในโครงสร้างของมอนอเมอร์ที่เปลี่ยนแปลงไปภายหลังการเกิดปฏิกิริยาการแข็งตัว โดยทั่วไปดีกรีออฟคอนเวอร์ชันของมอนอเมอร์ประเภทไดเมทาคริเลทมีค่าประมาณร้อยละ 60 จากการศึกษาทดสอบวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันทั้งยี่ห้อพรีโวกแคร์และคอนไซส์พบว่ามีค่าร้อยละ 56.99 และ 51.48 ตามลำดับซึ่งใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยของมอนอเมอร์ชนิดนี้ (สุชิต พูลทอง และคณะ, 2547) ค่าดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับค่าความแข็งผิวและสมบัติทางชีวภาพ เนื่องจากอัตราการเปลี่ยนแปลงสูง

หมายถึงความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาที่มากขึ้นทำให้วัสดุมีพื้นผิวแข็งขึ้นและอัตราการปลดปล่อยมอนอเมอร์ที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกมาในระดับต่ำกว่า (Craig และ Powers, 2002) การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของวัสดุพรีโวลูเออร์ต่อเซลล์เยื่อบุผิวฮาแคตเคราติโนไซต์ (HaCaT keratinocyte) ซึ่งมีความใกล้เคียงกับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันในสภาพการใช้งานในช่องปากและมีการศึกษาพบการตอบสนองของเซลล์ชนิดนี้ต่อสารมอนอเมอร์โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารบิส-จีเอ็มเอ (Theilig และคณะ, 2000; Moharamzadeh และคณะ, 2007) พบว่ามีอัตราการอยู่รอดของเซลล์เยื่อบุผิวภายหลังการสัมผัสวัสดุชนิดโดยตรงและโดยอ้อมมากถึงร้อยละ 96.74 และ 99.25 ตามลำดับโดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (อนุชาติ ศรีจันบาล และคณะ, 2547) นอกจากการศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของวัสดุพรีโวลูเออร์ดังกล่าวแล้วการศึกษาต่อมาในด้านการใช้งานทางคลินิกของวัสดุพรีโวลูเออร์ชนิดใสในเด็กนักเรียนอายุ 6-9 ปีภายหลังการใช้งานเป็นเวลา 6 เดือนพบอัตราการยึดติดอย่างสมบูรณ์ในหลุมร่องฟันมากถึงร้อยละ 98.6 ใกล้เคียงกับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อคอนไซส์ที่พบอัตราการยึดติดอย่างสมบูรณ์ร้อยละ 97.8 โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (สุภาภรณ์ จงวิศาล และคณะ, 2547) ทั้งนี้จากผลการศึกษาทั้งทางด้านกายภาพ ชีวภาพและการใช้งานทางคลินิกอาจกล่าวได้ว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันพรีโวลูเออร์เป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติดีระดับหนึ่งต่อการนำไปใช้ทางคลินิก ทดเทียมวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันนำเข้าจากต่างประเทศที่ได้มาตรฐานและได้รับการยอมรับแล้ว

## 1.2 สมบัติทางด้านกายภาพ

### 1.2.1 ความลึกของการแข็งตัว

การทดสอบตามมาตรฐานสากลไอเอสโอ 6874:2005 กำหนดไว้สำหรับการทดสอบวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินสำหรับทางทันตกรรม (Dental resin-based pit and fissure sealant) ในเรื่อง ความลึกของการแข็งตัวต้องมีค่าไม่ต่ำกว่า 1.5 มิลลิเมตร ค่าความลึกของการแข็งตัวเป็นค่าที่แสดงถึงผลของแสงที่ใช้ในการกระตุ้นปฏิกิริยาต่อการแข็งตัวเป็นพอลิเมอร์ของเรซินมอนอเมอร์และเป็นค่าหนึ่งที่บ่งบอกถึงความสมบูรณ์ของปฏิกิริยา ทั้งนี้แสงที่ใช้ในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาจะต้องเป็นแสงที่มีความยาวคลื่นเฉพาะและครอบคลุมช่วงความยาวคลื่นของสารเริ่มต้นปฏิกิริยาที่ใช้ในวัสดุ มีความเข้มพอเหมาะที่จะให้พลังงานสูงพอที่จะทำให้เกิดการแตกตัวเป็นอนุมูลอิสระเพื่อเริ่มต้นกระบวนการแข็งตัวของมอนอเมอร์ รวมทั้งต้องมีระยะเวลาในการฉายลงบนวัสดุานพอที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ที่สุด (Tanoue และคณะ, 1998) นอกจากนี้ปัจจัยในเรื่องแสงที่

ส่งผลต่อความลึกของการแข็งตัวแล้ว ปัจจัยภายในตัววัสดุเองก็มีความสำคัญเช่น สีของวัสดุ ขนาด และปริมาณของสารอัดแทรกที่ใส่ในวัสดุโดยพบว่า วัสดุที่มีสีอ่อนกว่าหรือผสมสารอัดแทรกที่มีขนาดอนุภาคเล็กจะสามารถทำการกระจายแสงได้ดีกว่า เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวได้มากกว่าและสมบูรณ์กว่า (Mills และคณะ, 1999) การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการฉายแสงลงบนวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดใสและชนิดทึบที่มีต่อค่าความลึกของการแข็งตัวพบว่า วัสดุชนิดทึบมีค่าความลึกของการแข็งตัวน้อยกว่าชนิดใสซึ่งเกิดจากความทึบและต้องใช้เวลาในการฉายแสงนานกว่าเพื่อปฏิกิริยาที่สมบูรณ์มากขึ้น (Yue และคณะ, 2009)

### 1.2.2 การดูดซับน้ำและการละลายตัว

แม้ว่าวัสดุบูรณะประเภทเรซินคอมโพสิตรวมถึงวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินจะเป็นวัสดุจำพวกพอลิเมอร์ประเภทหนึ่งซึ่งน่าจะเป็นวัสดุที่มีการละลายตัวต่ำ มีความคงทนต่อสภาวะทางเคมีหรืออุณหภูมิดีในระดับหนึ่งแต่ในความเป็นจริงพอลิเมอร์ประเภทโพลีเมทาคริเลตเหล่านี้กลับพบการดูดซับน้ำและสารเคมีจากสิ่งแวดล้อม ทำให้พอลิเมอร์เกิดการละลายตัวออกมาอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณขอบวัสดุที่ทำให้เกิดการฟูซ้ำจากแบคทีเรียที่เกาะติดบริเวณนี้ นอกจากนี้ผลจากการละลายตัวของพอลิเมอร์ยังทำให้เกิดการปลดปล่อยมอนอเมอร์ที่ไม่ทำปฏิกิริยา (unreacted monomer) ออกสู่สิ่งแวดล้อมในช่องปาก ในส่วนของตัววัสดุเองการแทรกซึมของน้ำจะทำให้เกิดการทำลายพันธะภายในโครงสร้างพอลิเมอร์และมีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดกระบวนการพลาสติไซเซชัน (plasticization) ส่งผลให้ลักษณะทางกายภาพและสมบัติเชิงกลโดยรวมของวัสดุด้อยลงเช่น เกิดการบวมตัว การเปลี่ยนสีหรือลดความแข็งแรงลง เป็นต้น (Ferracane, 2006) การศึกษามากมายบ่งชี้ว่าการดูดซับน้ำเกิดขึ้นอย่างเด่นชัดในบริเวณเมทริกซ์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวัสดุที่ไม่มีสารอัดแทรก (Toledano และคณะ, 2003; Malacarne และคณะ, 2006) การศึกษาในเรื่องชนิดของมอนอเมอร์ที่มีผลต่อการดูดซับน้ำและการละลายตัวของวัสดุพบว่า การใช้เรซินมอนอเมอร์บิส-จีเอ็มเอในสัดส่วนสูงจะทำให้พอลิเมอร์ที่ได้มีความแข็งเกร็ง (rigid) มากกว่าและการดูดซับน้ำน้อยกว่ามอนอเมอร์ ชนิดยูดีเอ็มเอหรือบิส-อีเอ็มเอ (bis-EMA) โดยพอลิเมอร์ที่ได้จะมีเสถียรภาพที่ดีกว่า (Sideridou และคณะ, 2003) ทั้งนี้การทดสอบตามมาตรฐานสากลไอเอสโอ 4049:2000 กำหนดไว้สำหรับวัสดุบูรณะฟันชนิดเรซิน (Dental resin-based filling materials) ซึ่งแม้จะไม่เกี่ยวข้องโดยตรงกับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินแต่สามารถนำมาใช้ประเมินสมบัติทางกายภาพเบื้องต้นได้เนื่องจากมอนอเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบพื้นฐานใกล้เคียงกับวัสดุบูรณะเรซินคอมโพสิต โดยกำหนดไว้ว่าวัสดุประเภทนี้ต้องมีค่าการดูดซับน้ำน้อยกว่า 50 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรและค่าการละลายตัวน้อยกว่า 7.5 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร โดยทั่วไปวัสดุประเภทเรซินจะเกิดการดูดซับน้ำอย่างรวดเร็วและ

ละลายตัวต่อเนื้ออย่างช้าๆภายหลังกการแช่ในน้ำโดยอัตราการดูดซับและละลายตัวขึ้นอยู่กับองค์ประกอบภายใน เรซินเช่น มอนอเมอร์บิส-จีโอมเอมมักจะมีการดูดซับน้ำต่ำกว่ามอนอเมอร์ชนิดอื่น เนื่องจากมีหมู่ฟังก์ชันที่มีออกซิเจนน้อยกว่าชนิดอื่น (Floyd และ Dickens, 2006) หรือการมีสารอัดแทรกปริมาณสูงมักพบการดูดซับน้ำและการละลายตัวต่ำกว่า เป็นต้น (Janda และคณะ, 2007)

### 1.2.3 ความแข็งผิววิกเกอร์ส

การทดสอบความแข็งผิวเป็นอีกวิธีการตรวจสอบหนึ่งนอกจากการวัดความลึกของการแข็งตัวในด้านปัจจัยของแสงที่มีต่อความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาการแข็งตัวด้วยแสงซึ่งหมายถึงความสมบูรณ์ของโครงข่ายพอลิเมอร์ของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน (Moore และคณะ, 2008) การทดสอบความแข็งผิวเป็นวิธีการที่ง่ายและรวดเร็วจึงมักถูกใช้อย่างแพร่หลายในการทดสอบวัสดุเบื้องต้น การทดสอบที่นิยมใช้มากในทางทันตกรรมคือ การทดสอบความแข็งผิวโดยใช้แรงกดลงบนพื้นผิว (surface indentation) เพราะเป็นวิธีการที่มีความสะดวกในแง่ของชิ้นทดสอบที่มีขนาดเล็ก การเตรียมตัวอย่างและขั้นตอนการทดสอบไม่ยุ่งยาก มีค่าใช้จ่ายไม่สูงนักและสามารถทำการทดสอบซ้ำๆ ได้ การทดสอบความแข็งผิวระดับไมโคร (microhardness test) จะใช้แรงกดเพียงเล็กน้อยลงบนพื้นผิวทดสอบโดยหัวกดที่มีรูปร่างแตกต่างกันไปตามลักษณะวัสดุทดสอบเช่น การทดสอบแบบวิกเกอร์ส แบบนูป แบบบริเนล แบบร็อคเวลหรือแบบเบอร์โควิช เป็นต้น สำหรับการทดสอบความแข็งผิวแบบวิกเกอร์ส (Vickers hardness test) เป็นการกดด้วยหัวกดเพชรรูปร่างปิรามิดสี่ด้านที่มีมุมแต่ละมุม 136 องศา รอยกดที่ได้จะเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสที่มีเส้นทแยงมุมตัดกัน 2 เส้นดังแสดงในภาพที่ 7 การคำนวณค่าความแข็งผิวแบบวิกเกอร์สจะได้อาจจากการวัดความยาวของเส้นทแยงมุมและคำนวณจากสมการ (1) (Boyer, 1987)

$$VHN = \frac{2P \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{d^2} \dots\dots\dots \text{สมการ (1)}$$

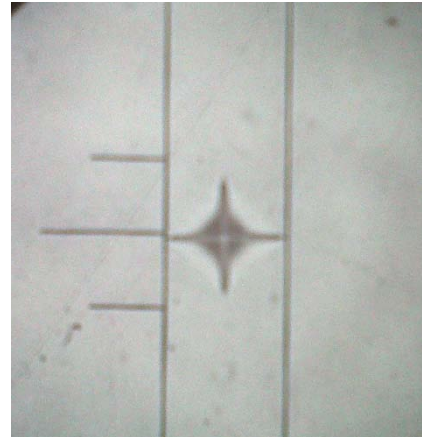
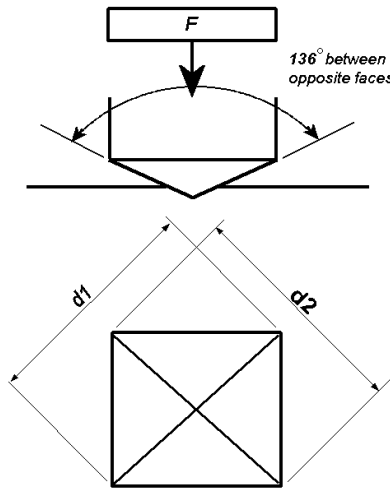
เมื่อ P คือ แรงที่ใช้กดและ  $\theta$  คือ 136 องศา

d คือ ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นทแยงมุมทั้ง 2 เส้น

รอยกดที่เกิดขึ้นภายหลังกการกดเป็นการเปลี่ยนแปลงบนพื้นผิวของวัสดุอย่างถาวร (plastic deformation) ซึ่งการวัดค่าความแข็งผิว ณ ช่วงเวลาที่วัสดุเกิดการคืนสภาพยืดหยุ่น (elastic recovery) สมบูรณ์แล้วมักทำให้ค่าความแข็งที่ได้สูงกว่าความเป็นจริงเนื่องจากการวัดความลึกของรอยกดหลังจากวัสดุมีการคืนสภาพสมบูรณ์แล้ว (Willems และคณะ, 1993) นอกจากนี้ยังอาจ



เกิดความผิดพลาดจากตัวผู้วัดขณะทำการวัดความยาวเส้นทแยงมุมรอยกดด้วยสายตาซึ่งอาจทำให้ค่าความแข็งผิวที่ได้เกิดความผิดพลาด



ภาพที่ 7 แสดงไดอะแกรมหัวกดและรูปร่างรอยกด (ซ้าย) และรอยกดจริงบนวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน (ขวา)

#### 1.2.4 อัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่

ระดับการเกิดพอลิเมอร์ (degree of polymerization) มีบทบาทสำคัญในการกำหนดสมบัติทางกายภาพและทางกลของวัสดุเนื่องจากปฏิกิริยาที่ไม่สมบูรณ์จะทำให้หลงเหลือมอนอเมอร์จากปฏิกิริยาอยู่มากโดยส่งผลเสียต่อวัสดุโดยรวม อาทิเช่น ความแข็งผิวลดลง ลดความต้านทานต่อการสึก (wear resistance) และความไม่คงทนของสี เป็นต้น การศึกษาระดับการเกิดพอลิเมอร์มีหลักในการตรวจวัดจากอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคาร์บอนคู่ของมอนอเมอร์ที่เปลี่ยนเป็นพันธะเดี่ยวหลังการเกิดปฏิกิริยา หนึ่งในวิธีการที่ได้รับความนิยมและมีการศึกษาอ้างอิงอย่างยาวนานคือ การศึกษาด้วยสเปกโทรสโกปีช่วงความยาวคลื่นอินฟราเรด (Infrared Spectroscopy) (Rueggeberg และคณะ, 1990) ซึ่งทำการตรวจวัดสเปกตรัมของวัสดุเรซิน มอนอเมอร์ขณะยังไม่แข็งตัว (ของเหลว) เทียบกับวัสดุที่แข็งตัวแล้ว (ของแข็ง) โดยทำการวัดและบันทึกความสูงของยอดกราฟจากเส้นฐาน (baseline) ของแถบการดูดกลืน (absorbance band) คาร์บอนพันธะคู่สายตรง (aliphatic C=C band) ที่บริเวณ 1636 ส่วนต่อเซนติเมตรซึ่งเป็นตำแหน่งที่แสดงถึงปริมาณการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่คาร์บอนของมอนอเมอร์โดยตรง ทั้งนี้ความสูงของแถบการดูดกลืนดังกล่าวจะลดลงภายหลังวัสดุเกิด

การแข็งตัวนั้นคือเกิดการเปลี่ยนจากพันธะคู่กลายเป็นพันธะเดี่ยวคาร์บอน (stretching C-C) การคำนวณอัตราการดูดซับต้องคำนวณเป็นอัตราส่วนระหว่างความสูงของแถบการดูดกลืนคาร์บอนพันธะคู่สายตรงกับแถบการดูดกลืนอ้างอิงซึ่งใช้ตำแหน่งคาร์บอนพันธะคู่วงแหวน (aromatic C=C band) ที่บริเวณ 1582 ส่วนต่อเซนติเมตรเนื่องจากคาร์บอนพันธะคู่วงแหวนไม่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของมอนอเมอร์จึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงความสูงของแถบการดูดกลืนภายหลังการแข็งตัว อัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่จะคำนวณโดยใช้สมการ (2) และ (3) (Heigl และคณะ, 1947; Ferracane และ Greener, 1984; Rueggeberg และคณะ, 1990)

$$\text{อัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่} = 100 - \frac{\text{อัตราส่วนการดูดซับ (absorbance ratio) ของวัสดุที่แข็งตัว}}{\text{อัตราส่วนการดูดซับ (absorbance ratio) ของวัสดุที่ไม่แข็งตัว}} \dots\dots\dots\text{สมการ (2)}$$

$$\text{อัตราส่วนการดูดซับ} = \frac{\text{ความสูงของยอดคาร์บอนพันธะคู่สายตรง (aliphatic C = C peak)}}{\text{ความสูงของยอดคาร์บอนพันธะคู่วงแหวน (aromatic C = C peak)}} \dots\dots\dots\text{สมการ (3)}$$

นอกจากวิธีการอินฟราเรดสเปคโทรสโคปีแล้ว ยังมีการศึกษาวิธีการวัดอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ด้วยวิธีการอื่นเช่น การวิเคราะห์แบบดิฟเฟอเรนเชียลเทอร์มัล (Differential thermal analysis) วิธีการดังกล่าวใช้หลักการของการปลดปล่อยความร้อนของปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงจากคาร์บอนพันธะคู่เป็นพันธะเดี่ยว (McCabe, 1985) การศึกษาในปี 2001 เพื่อเปรียบเทียบวิธีการนี้กับวิธีอินฟราเรดสเปคโทรสโคปีในวัสดุบูรณะเรซินคอมโพสิตที่มีมอนอเมอร์บิส-จีเอมเอและทีอีจีดีเอมเอเป็นพื้นฐานพบว่าให้ผลใกล้เคียงกัน จึงทำให้วิธีการวิเคราะห์แบบดิฟเฟอเรนเชียลเทอร์มัลอาจเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการตรวจวัดอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ที่มีความเหมาะสมและเป็นไปได้ในอนาคต (Imazato และคณะ, 2001)

### 1.2.5 ความหนืดและลักษณะการไหล (flow characteristic)

ความหนืดเป็นความสามารถในการต้านทานการไหลของของไหลเมื่อมีแรงกระทำ โดยของไหลดังกล่าวหมายถึง สสารที่ไหลได้เช่น ของเหลวหรือก๊าซ การต้านทานดังกล่าวเกิดจากแรงเสียดทานภายในของวัสดุ (internal friction) ซึ่งก็คือแรงเฉือน (shear force) ที่จะเกิดขึ้นเมื่อมีการเคลื่อนที่ของของไหลระหว่างชั้น สสารที่มีความหนืดสูง จะมีความต้านทานการไหลสูงจึงต้องการแรงเฉือนในปริมาณมากกว่าวัสดุที่มีความหนืดต่ำเพื่อให้เกิดการเคลื่อนที่ การวัดความหนืดสามารถทำได้โดยการวัดแรงเฉือนดังกล่าว หลักการคือเมื่อมีแรง (F) มากระทำในแนวราบบนก้อนของไหลที่

ประกอบด้วยระนาบที่ขนานกัน ชั้นที่อยู่ล่างสุดจะถูกยึดไว้ถ้าชั้นบนได้รับแรงกระทำให้เคลื่อนที่ด้วยความเร็วคงที่ การเคลื่อนที่ของระนาบของไหลด้านบนเมื่อได้รับแรงด้วยความเร็วคงที่จะทำให้ชั้นถัดลงมาจะเคลื่อนที่ตามไปด้วยความเร็วที่เป็นสัดส่วนกับระยะทางจากชั้นล่างสุดที่ไม่เคลื่อนที่ (ภาพที่ 8) ความแตกต่างของความเร็ว (dv) ระหว่างชั้นของไหลสองแผ่นกับระยะทางที่เคลื่อนที่ไป (dx) คือ อัตราเฉือน (shear rate; S) โดยค่าแรง F ที่มากระทำต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ (A) เรียกว่า แรงเฉือนต่อหน่วยพื้นที่ (shear stress; F') ตามสมการ (4) (Macosko, 1994)

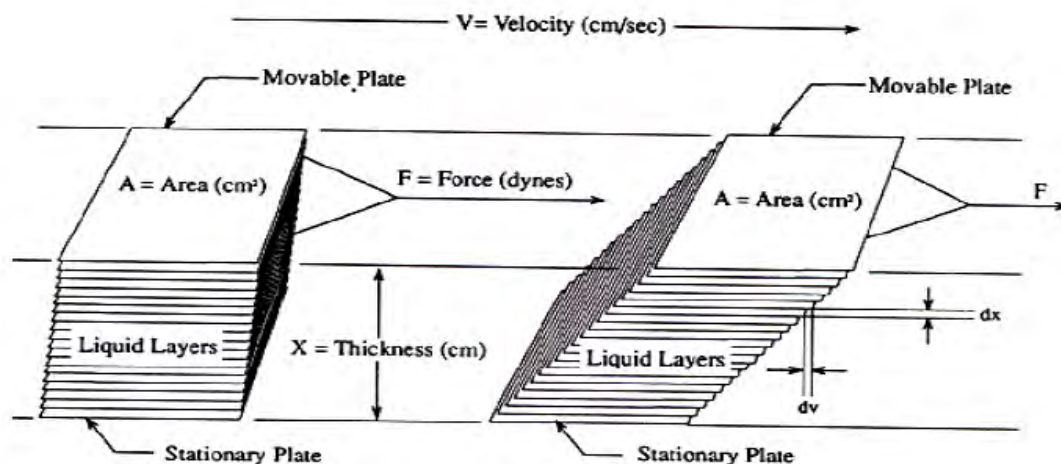
$$\eta = \frac{F'}{S} \dots\dots\dots \text{สมการ (4)}$$

เมื่อ F' คือ แรงเฉือนต่อหน่วยพื้นที่ มีหน่วยเป็น ไดน์ต่อตารางเซนติเมตร (dyne/cm<sup>2</sup>) หรือ ปาสคาล (Pascal; P)

S คือ อัตราเฉือน มีหน่วยเป็น ต่อวินาที (sec<sup>-1</sup>)

หน่วยของความหนืด คือ ไดน์ วินาทีต่อตารางเซนติเมตร หรือ ปอยส์ (poise)

โดย 1 ปอยส์ คือแรงที่ใช้ทำให้ของเหลวที่มีพื้นที่หน้าตัดหนึ่งตารางเซนติเมตร หนาหนึ่งเซนติเมตร เคลื่อนที่ด้วยความเร็วหนึ่งเซนติเมตรต่อวินาที และมีค่าเท่ากับ 100 เซนติปอยส์ (1 poise = 100 centipoise)



ภาพที่ 8 แสดงไดอะแกรมก่อนของไหลขณะหยุดนิ่ง (ซ้าย) และเมื่อได้รับแรง (ขวา) (Macosko, 1994)

จากสมมติฐานของไหลของเซอร์ไอแซค นิวตันสามารถแบ่งของไหลตามลักษณะการไหลได้ 2 แบบคือ

1. ของไหลแบบนิวโทเนียน (Newtonian fluid) มีลักษณะการไหลตามสมมติฐานที่ว่าของไหลจะมีความหนืดคงที่อุณหภูมิกำหนดค่าหนึ่งโดยอัตราเฉือนหรือความเร็วไม่มีผลต่อค่าความหนืดเช่น น้ำบริสุทธิ์ น้ำผึ้ง เป็นต้น

2. ของไหลแบบนอน-นิวโทเนียน (Non-Newtonian fluid) มีลักษณะการไหลไม่เป็นไปตามสมมติฐานของนิวตันกล่าวคือ ของไหลจะมีความหนืดไม่คงที่ที่อุณหภูมิกำหนดค่าหนึ่งโดยเปลี่ยนแปลงได้ตามอัตราเฉือนที่ได้รับ สามารถแบ่งออกได้ 4 ชนิดคือ

2.1 พลาสติกเทียม (pseudoplastic) คือ ของไหลจะมีความหนืดลดลงเมื่อเพิ่มอัตราเฉือนซึ่งการกวของไหลชนิดนี้เร็วขึ้นจะทำให้ไหลได้เร็วขึ้น ตัวอย่างเช่น พอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติและการสังเคราะห์ เป็นต้น

2.2 ไดลาเทนท์ (dilatent) คือ ของไหลที่จะมีความหนืดเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราเฉือนโดยของไหลชนิดนี้เมื่อกวเร็วขึ้นจะหนืดมากขึ้น ตัวอย่างเช่น น้ำดินหรือน้ำแป้งมัน เป็นต้น

2.3 พลาสติก (plastic) ของไหลชนิดนี้จะอยู่ในสภาพแข็งตัวในสภาวะที่อยู่นิ่ง (static condition) ที่ต้องมีแรงกระทำมากกว่าค่าความเค้น ณ จุดคราก (yield stress) จึงจะเริ่มไหล และไหลต่อได้แบบพลาสติกเทียมหรือไดลาเทนท์ ตัวอย่างเช่น ซอสมะเขือเทศ เป็นต้น

การตรวจสอบความหนืดและการไหลแผ่ของวัสดุบูรณะทางทันตกรรมโดยเฉพาะอย่างยิ่งวัสดุบูรณะเรซินคอมโพสิตชนิดไหลแผ่ได้ (flowable composite) และวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินมีประโยชน์ต่อทันตแพทย์ในด้านการนำวัสดุที่มีความหลากหลายในท้องตลาดไปใช้งานทางคลินิก เครื่องมือที่ใช้ในการวัดความหนืดในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปคือ รีโอมิเตอร์ (rheometer) โดยแบ่งได้ตามลักษณะการทำงานของเครื่องมือคือ ชนิดที่วัดจากแรงเฉือน (shear rheometer) และชนิดที่ไม่ได้วัดจากแรงเฉือน (extensional rheometer) ในที่นี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะชนิดที่วัดจากแรงเฉือนเนื่องจากเป็นชนิดที่มีการศึกษาและถูกนำมาใช้การศึกษาวัสดุทางทันตกรรม ทั้งนี้สามารถแบ่งรีโอมิเตอร์ชนิดที่วัดจากแรงเฉือนตามลักษณะการทำงานของเครื่องดังนี้

1. แบบท่อหรือคาร์พิลลารี (pipe or capillary) โดยของเหลวจะถูกผลักให้ไหลไปตามหลอดกลวงขนาดเล็กที่มีพื้นที่หน้าตัดเท่ากันตลอดด้วยความเร็วคงที่ (Barnes และคณะ, 2000)

2. แบบทรงกระบอกหมุน (rotational cylinder) โดยของเหลวจะถูกใส่ในหลอดที่มีแท่งทดสอบจมอยู่ภายใน เมื่อแท่งทดสอบหมุนด้วยความเร็วค่าหนึ่ง การคำนวณอัตราเฉือนภายในแท่งทดสอบจะเกิดจากการเคลื่อนที่ของของเหลวรอบแท่งที่ทำให้เกิดทอร์ค (torque)

3. แบบกรวยและจาน (cone and plate) โดยของเหลวจะแผ่บนจานซึ่งมีกรวยปลายตั้งนูนอยู่ การวัดทอร์คจากปลายโคนจะเกิดขึ้นเมื่อจานเริ่มหมุน เทคนิคนี้ถูกนำมาใช้วัด ความหนืดของวัสดุเรซินคอมโพสิตและสามารถใช้เทคนิคนี้ในการวัดค่าเวลาทำงาน (working time) ของวัสดุเรซินชนิดบ่มตัวเองได้ด้วย (Ferracane และคณะ, 1981) นอกจากนี้ยังสามารถใช้หลักการแกว่ง (oscillation) ร่วมกับเทคนิคนี้เพื่อใช้ในการตรวจสอบสมบัติความยืดหยุ่น (elastic property) ได้ (Lee และคณะ, 2006; Beun และคณะ, 2008)

### 1.2.6 การรั่วซึมตามขอบ

การรั่วซึมตามขอบเป็นความล้มเหลวชนิดหนึ่งของวัสดุบูรณะประเภทเรซิน รวมถึงวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันทำให้เกิดเป็นทางผ่านของเชื้อแบคทีเรียและของเหลวในช่องปากเข้าสู่รอยต่อของวัสดุ ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จของการใช้วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันในหลุมร่องฟันได้แก่ธรรมชาติของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันในการยึดติด (retention capacity) กับผิวฟัน เช่น ความหนืดและความหนาแน่นของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน เป็นต้น และปัจจัยที่มาจากคุณภาพของผิวเคลือบฟัน เช่น ความกว้างของหลุมร่องฟันและพลังงานพื้นผิว (surface tension) ที่ต้องสูงมากพอที่จะช่วยลดอุปสรรคที่มาจากตัววัสดุ วิธีการที่ช่วยปรับสภาพผิวเคลือบฟันให้ดีขึ้นเช่น การกรอปรับสภาพผิวและหลุมร่องฟันด้วยหัวกรอให้กว้างขึ้นและขรุขระมากขึ้นร่วมกับการใช้กรดก่อนการใช้วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเพื่อเพิ่มพลังงานพื้นผิวและป้องกันผิวฟันจากการปนเปื้อนด้วยความชื้นหรือน้ำลายที่จะส่งผลให้การยึดติดของวัสดุต่ำลง (Thomson และคณะ, 1981) หรือส่งเสริมให้วัสดุเกิดการรั่วซึมมากขึ้น (Borem และ Feigal, 1994) โดยทั่วไปอัตราการใช้ของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันลงในหลุมจะเกิดได้เร็วขึ้นหากวัสดุมีความหนาแน่นสูงและมีความตึงผิว (surface tension) น้อยกว่าพลังงานพื้นผิวของผิวเคลือบฟัน (Barnes และคณะ, 2000)

นอกจากการใช้กรดในการปรับสภาพผิวฟันเพียงอย่างเดียวในยุคแรก การศึกษาในยุคหลังเริ่มมีการนำสารเดนทีนบอนด์ (dentine bonding agent) มาใช้ภายหลังการปรับสภาพผิวฟันร่วมด้วยเนื่องจากข้อดีของมอนอเมอร์องค์ประกอบในสารบอนด์ที่มักมีความหนืดต่ำช่วยให้เกิดการไหลแผ่หรือเป็นมอนอเมอร์ที่มีสมบัติเป็นโมเลกุลมอนอเมอร์สองขั้ว (bifunctional monomer) โดยปลายข้างหนึ่งของโมเลกุลมอนอเมอร์เหล่านี้จะเกิดพันธะกับมอนอเมอร์ของวัสดุ เรซินและปลายอีกข้างหนึ่งเกิดพันธะเคมีกับโมเลกุลบนผิวฟันที่อาจมีความชื้นปะปนอยู่จึงช่วยเสริมการยึดติดของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินในสภาพผิวฟันที่มีการปนเปื้อนความชื้นเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้สารบอนด์

เองยังมีตัวทำลายบางชนิดเช่น อะซีโตนหรือแอลกอฮอล์ที่มีความสามารถในการไล่น้ำ (water chasing effect) ซึ่งช่วยเพิ่มการไหลผ่านให้กับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินที่มีสมบัติกลัวน้ำ (hydrophobicity) และมีความหนืดมากกว่าที่ตามลงมาภายหลังอีก การศึกษาการรั่วซึมตามขอบในห้องปฏิบัติการเป็นวิธีการหนึ่งซึ่งช่วยในการทำนายการรั่วซึมที่อาจเกิดขึ้นจากวัสดุภายหลังการใช้งาน ในช่องปากเป็นระยะเวลาหนึ่งซึ่งการศึกษาในห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องเร่งกระบวนการดังกล่าวให้เร็วขึ้น หนึ่งในวิธีการดังกล่าวคือการเปลี่ยนอุณหภูมิร้อนเย็นของขึ้นทดสอบอย่างเป็นจังหวะ (thermal cycling process) เพื่อเป็นการจำลองสภาพในช่องปาก เนื่องจากวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเป็นวัสดุที่อยู่ในช่องปากที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอยู่ตลอดเวลาจากอาหารหรือเครื่องดื่มที่รับประทาน ความเครียดภายในวัสดุที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะส่งผลให้เกิดการประสานกันของรอยร้าวและการขยายตัวของช่องอากาศภายในเนื้อวัสดุทำให้เกิดความล้มเหลวหลังการใช้งาน (Gale และ Darvell, 1999) จึงเป็นเสมือนการเร่งอายุให้กับชิ้นวัสดุและเทียบเคียงกับการใช้งานในช่องปากของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซิน

### 1.3 สมบัติทางชีวภาพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซิน

การศึกษาสมบัติทางกายภาพเป็นการประเมินวัสดุเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการทางด้านลักษณะทางกายภาพและสมบัติเชิงกลแต่การจะนำวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไปใช้ในช่องปากของมนุษย์ จำเป็นต้องทำการศึกษาสมบัติทางชีวภาพในขั้นต่อไป การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการมักถูกนำมาใช้ในการประเมินความเป็นพิษเบื้องต้นของวัสดุบูรณะประเภทเรซินโดยมีวิธีการตรวจสอบการอยู่รอดของเซลล์ต่าง ๆ กัน ทั้งนี้เซลล์ที่นำมาทดสอบอาจเป็นเซลล์ต้นกำเนิด (cell line origin or permanent cell) เช่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์ต้นกำเนิดชนิด L929 (Thonemann และคณะ, 2002; Franz และคณะ, 2007) หรือชนิด Balb/c 3T3 (Hanks และคณะ, 1999; Al-Hiyasat และคณะ, 2005) เป็นต้น หรืออาจนำมาจากเนื้อเยื่อโดยตรง (primary cell) เช่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือกมนุษย์ (Hanks และคณะ, 1991; Schweikl และ Schmalz, 1996; Bouillaguet และคณะ, 2002; Issa และคณะ, 2004; Darmani และคณะ, 2007; Moharamzadeh และคณะ, 2007) เป็นต้น โดยทั่วไปเซลล์ทั้งสองกลุ่มนี้มีธรรมชาติในการตอบสนองต่อการทดสอบไม่เหมือนกันกล่าวคือ เซลล์ต้นกำเนิดมักจะมีความคล้ายคลึงกันทั้งในด้านรูปร่างและสรีรวิทยารวมถึงการตอบสนองต่อวัสดุทดสอบ ทำให้การนำมาใช้ทดสอบไม่ยุ่งยากมากนัก ตรงข้ามกับเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อโดยตรงที่มักพบความแตกต่างกันในด้านรูปร่าง การตอบสนองและ

ช่วงชีวิตที่สั้นกว่าแต่มีข้อดีคือสามารถเลียนแบบสภาพแวดล้อมจริงในช่องปากได้ดีกว่า (Atsumi และคณะ, 1998; Geurtsen, 2000)

การทดสอบวัสดุบูรณะประเภทเรซินมอนอเมอร์โดยการสัมผัสตรงระหว่างผิววัสดุและเซลล์ทดสอบซึ่งเป็นการทดสอบวัสดุที่แข็งตัวแล้วโดยเลียนแบบสภาพความเป็นจริงในช่องปากที่มีการสัมผัสผิวหน้าของวัสดุกับเซลล์ในช่องปาก วิธีการทดสอบนี้จะเป็นการทดสอบความเป็นพิษของมอนอเมอร์องค์ประกอบที่หลงเหลือจากปฏิกิริยาออกจากวัสดุ (uncured monomer) ที่เกิดจากความไม่สมบูรณ์ของปฏิกิริยาการแข็งตัวและถูกปลดปล่อยออกมาอย่างมากในช่วง 24 ชั่วโมงแรก (Geurtsen, 2000) และเป็นการทดสอบวัสดุในภาพรวมโดยไม่คำนึงถึงองค์ประกอบที่อาจมีความหลากหลายในตัววัสดุ ขั้นตอนการเตรียมชิ้นวัสดุที่ใช้ทดสอบเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความเป็นพิษ โดยพบว่า วัสดุที่เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวเต็มที่ (set material) จะพบความเป็นพิษน้อยกว่าหรือไม่พบเลยเมื่อเทียบกับวัสดุที่ยังไม่แข็งตัวหรือแข็งตัวไม่สมบูรณ์เนื่องจากเหลือองค์ประกอบที่เป็นพิษน้อยกว่า (Kaga และคณะ, 1990; Schmalz, 1998) บางการศึกษากล่าวถึงบทบาทของสารฟอรัมาลดีไฮด์ที่พบในชั้นออกซิเจนอินฮิบิเทด (oxygen inhibited layer) ที่ปกคลุมบนผิววัสดุที่เกิดจากการสัมผัสกับออกซิเจนในบรรยากาศระหว่างปฏิกิริยาการแข็งตัวว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์จึงมีการแนะนำให้ทำการกำจัดชั้นนี้ทุกครั้งด้วยการขัดหรือเซ็ดผิวหน้าวัสดุบูรณะภายหลังการฉายแสง (Ruyter, 1995)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยการสัมผัสสารที่ปลดปล่อยออกจากวัสดุมีความสำคัญเพราะนอกจากมอนอเมอร์ที่หลงเหลือจากปฏิกิริยาดังกล่าวแล้วยังอาจพบมอนอเมอร์องค์ประกอบที่ถูกปลดปล่อยหรือสลายตัว (leachable substances) จากวัสดุหลังผ่านการใช้งานในช่องปากเมื่อวัสดุบูรณะได้รับแรงบดเคี้ยว (mechanical degradation) หรือจากการเสื่อมสลายทางเคมีเนื่องจากสภาวะในช่องปาก (chemical degradation) ซึ่งเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา (Freund และ Munksgaard, 1990; Sekiya และคณะ, 1993; Nathanson และคณะ, 1997) เช่น จากเอนไซม์เอสเทอเรสในช่องปาก เป็นต้นและสะสมอยู่ในน้ำลาย (Gopferich, 1996; Geurtsen, 1998; Pulgar และคณะ, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าธรรมชาติของมอนอเมอร์เองก็มีส่วนสำคัญเช่น ความสามารถในการดูดซับและการละลายตัวของสารยูติเอมเอเป็นสารที่เกิดขึ้นได้น้อยกว่าสารบิส-จีเอมเอทำให้ถูกปลดปล่อยออกจากวัสดุน้อยกว่าภายหลังการใช้งาน (Pearson และ Longman, 1989; Floyd และ Dickens, 2006) หรือสารที่อีจีดีเอมีขนาดเล็กและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าสารพวกบิส-จีเอมเอหรือยูติเอมเอทำให้หลุดออกมาสู่สภาพแวดล้อมภายในช่องปากได้ง่ายกว่าและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Freund และ Munksgaard, 1990; Sekiya และคณะ, 1993; Reichl และคณะ, 2001)

วิธีการวัด (measuring assay) ในการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ในห้องปฏิบัติการมักกระทำร่วมกับการส่องดูลักษณะทางกายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อประเมินความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) เช่น วิธีการเอ็มทีที (MTT assay) เป็นการตรวจสอบการคงอยู่ของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial dehydrogenase enzyme) ภายในเซลล์ที่มีชีวิตโดยเอนไซม์จะทำหน้าที่เปลี่ยนสารประเภทเมทิลไทอะโซลเตตราโซเลียม (methylthiazol tetrazolium) ให้กลายเป็นสารฟอร์มาซานที่มีสี (formazan) (Mosmann, 1983)

ปัจจัยที่มีผลต่อการศึกษาความเป็นพิษของมอนอเมอร์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากวัสดุบูรณะประเภทเรซินได้แก่ อัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ที่กำหนดปริมาณ (amount) มอนอเมอร์ในสภาพแวดล้อม ความสามารถของตัวทำละลายและกระบวนการสกัดโดยพบว่าตัวทำละลายที่มีส่วนประกอบของแอลกอฮอล์จะแทรกซึมเข้าไปในเนื้อวัสดุได้มากกว่าและทำการละลายได้มากกว่า การใช้น้ำหรือน้ำลายเทียมเป็นตัวทำละลาย เป็นต้น นอกจากนี้ปัจจัยในเรื่องขนาดและโครงสร้างทางเคมีของมอนอเมอร์ส่งผลต่อปริมาณที่ถูกปลดปล่อยออกมาโดยพบว่ามอนอเมอร์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะถูกปลดปล่อยออกมาได้ง่ายกว่า (Ferracane, 1994) จากการศึกษามอนอเมอร์กว่า 30 ชนิดในวัสดุบูรณะประเภทเรซินพบว่า มอนอเมอร์ชนิดที่อีจีดีเอ็มเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะถูกปลดปล่อยออกมาในปริมาณมากกว่ามอนอเมอร์ชนิดอื่น (Santerre และคณะ, 2001) สอดคล้องกับการตรวจพบปริมาณมอนอเมอร์ชนิดนี้มากในหนูทดลอง (Reichl และคณะ, 2001) โดยมีผู้รายงานสรุปกลไกความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารที่อีจีดีเอ็มเอที่มีต่อโครงสร้างและเมทาบอลิซึมของเซลล์ไว้ 4 ประการ (Geurtsen และ Leyhausen, 2001) คือ

1. ผลของมอนอเมอร์ที่มีต่อเยื่อหุ้มเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของโมเลกุลไขมัน (lipid molecule) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์โดยเฉพาะพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) และมีบทบาทต่อการส่งผ่านสัญญาณระหว่างภายในและภายนอกเซลล์โดยมีการศึกษาด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR spectroscopy) ยืนยันว่า มอนอเมอร์ชนิดนี้กระจายอยู่ทั่วไปภายในเซลล์โดยเฉพาะบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และมีการศึกษาสรุปว่าบริเวณหมู่ฟังก์ชันเอทิลีนไกลคอล (ethylene glycol group) ของมอนอเมอร์ที่อีจีดีเอ็มเออาจจะทำหน้าที่เป็นเหมือนสารซักฟอก (detergent-like substance) เข้าจับกับชั้นของไขมันทำให้เกิดการละลายตัวของชั้นนี้ (Fujisawa และคณะ, 1988)

2. ผลที่มีต่อกลูตาไทโอนหรือเมทาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานของเซลล์ ทั้งนี้สารกลูตาไทโอนภายในเซลล์เชื่อว่ามีผลสำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและมีบทบาทใน



กระบวนการขับสารพิษของเซลล์ (detoxification) มีการศึกษาพบมोनอเมอร์ที่อีจีดีเอ็มเอมากภายในเซลล์ที่มีปริมาณกลูตาไทโอนภายในเซลล์ลดลงโดยผลเสียดังกล่าวไม่เกิดกับมोनอเมอร์ชนิดอื่นเช่น บิส-จีเอ็มเอหรือยูดีเอ็มเอ เป็นต้น (Meister, 1994)

3. ผลของมोनอเมอร์ต่อสารพันธุกรรมดีเอ็นเอหรือกระบวนการอักเสบการศึกษาพบการเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายหลังการสัมผัสมोनอเมอร์ที่อีจีดีเอ็มเอและพบจำนวนไมโครนิวเคลียสเพิ่มขึ้นในไซโตพลาสซึม (Schweikl และ Schmalz, 1999) นอกจากนี้ปริมาณมोनอเมอร์เพียงเล็กน้อยกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของไซโตไคน์ชนิด IL-6 ที่มีบทบาทในการเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อ (Geurtsen, 1998)

4. ผลต่อองค์ประกอบเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix) แม้ว่าจะยังมีการศึกษาไม่มากนักเกี่ยวกับมोनอเมอร์ที่อีจีดีเอ็มเอต่อการเปลี่ยนแปลงเมทริกซ์นอกเซลล์จึงยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัด (Geurtsen และ Leyhausen, 2001) แต่การศึกษามोनอเมอร์ชนิดบิส-จีเอ็มเอพบว่ามีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์หรือการแสดงออกของโปรตีนทีนาซิน (tenascin) (Theilig และคณะ, 2000)

นอกจากมोनอเมอร์องค์ประกอบที่กล่าวมาแล้วยังมีการศึกษาที่พบการปลดปล่อยสารแคมไพโรควิโนนที่ถูกนำมาใช้เป็นสารเริ่มต้นปฏิกิริยาของวัสดุบูรณะประเภทเรซินที่แข็งตัวด้วยแสงอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน (Spahl และคณะ, 1998) โดยทำให้สารพันธุกรรมเกิดความเสียหายจากการกระตุ้นโดยอนุมูลอิสระ (Atsumi และคณะ, 1998; Geurtsen, 2000) อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะเริ่มมีการใช้งานสารมोनอเมอร์ประเภทนี้มานานหลายสิบปียังไม่มียางานความเป็นพิษทางระบบ (systemic effect) ในร่างกายมนุษย์ของวัสดุบูรณะประเภทเรซิน (Geurtsen, 2000; Simonsen, 2002)

## 2. ไคโตซานวิสเกอร์ (chitosan whiskers)

### 2.1 สมบัติทั่วไปของสารไคตินและไคโตซาน

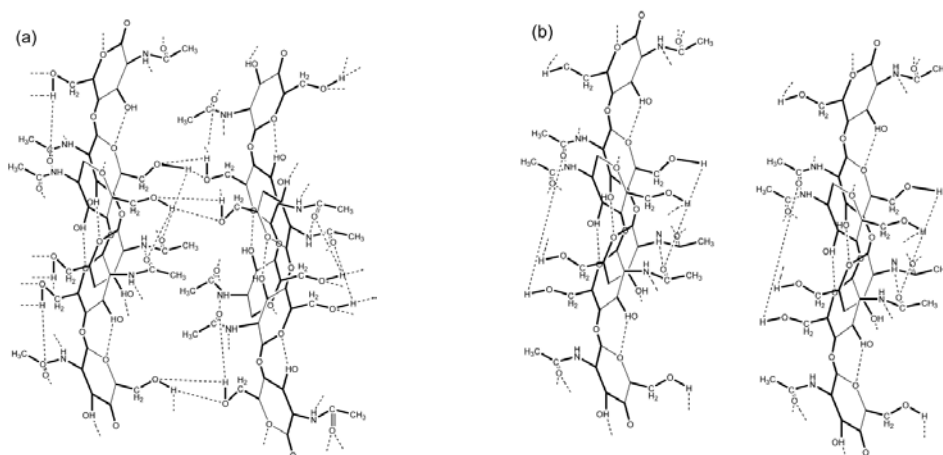
สารไคติน (chitin) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า poly( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetyl-D-glucosamine) มีโครงสร้างของผลึกที่แข็งแรงและมีระเบียบสูง (highly-ordered crystallized microfibril) (ภาพที่ 10) โดยพบมากในเปลือกของสิ่งมีชีวิตที่มีเปลือกแข็งห่อหุ้มร่างกาย (exoskeleton) จำพวกสัตว์ขาปล้อง (arthropod) เช่น กุ้ง ปู หอยและแมลงต่างๆ นอกจากนี้อาจพบ

ได้ในเห็ดรา ยีสต์และสาหร่ายบางชนิด ในธรรมชาติสารไคตินจะมีโครงสร้างหลักเป็นสารจำพวกพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) ร่วมกับสารประกอบอนินทรีย์ (inorganic compound) เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต ในสัดส่วนแตกต่างกันออกไปตามแต่ละแหล่งกำเนิดดังแสดงในตารางที่ 1 (Kurita, 2006)

Source	Chitin (%)	CaCO <sub>3</sub> (%)
Crab cuticle	15-30	40-50
Shrimp cuticle	30-40	20-30
Krill cuticle	20-30	20-25
Squid pen	20-40	Negligible
Clam/oyster shell	3-6	85-90
Insect cuticle	5-25	Negligible
Fungi cell wall	10-25	Negligible

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณร้อยละของสารไคตินและสารประกอบอนินทรีย์ในแต่ละแหล่งธรรมชาติ (Kurita, 2006)

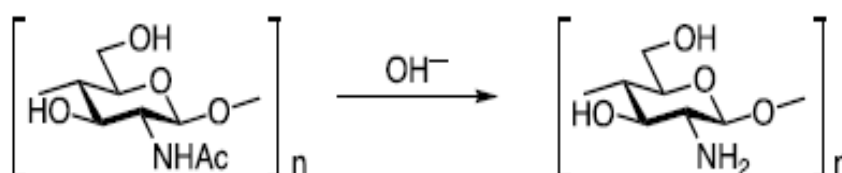
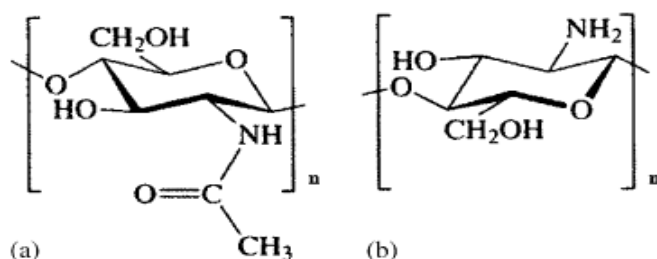
ด้านโครงสร้างเคมีของสารไคติน โดยทั่วไปมีความแตกต่างกันแบ่งออกได้ 3 ประเภท คือ สารไคตินชนิดอัลฟา ( $\alpha$ -type) ซึ่งเป็นชนิดที่พบได้มากที่สุด ในธรรมชาติเช่น จากเปลือกกุ้ง ปู เป็นต้น สารไคตินชนิดเบตา ( $\beta$ -type) ที่พบได้มากในแกนปลาหมึก (Squid pen) สำหรับทะเลหรือโปรโตซัวบางชนิดโดยเป็นชนิดที่มีองค์ประกอบสารอนินทรีย์ต่ำกว่าและมีโครงสร้างระหว่างโมเลกุลไม่แข็งแรงเท่ากับชนิดอัลฟา ส่วนสารไคตินชนิดแกมมา ( $\gamma$ -type) เป็นชนิดที่พบได้น้อยกว่าสองชนิดที่กล่าวไป ความแตกต่างของแต่ละชนิดเกิดจากความแตกต่างของระบบผลึก (crystal system) ซึ่งเป็นผลมาจากรูปแบบการเรียงตัวที่เป็นแผ่นพับซ้อน (pleated sheet) แตกต่างกัน ในผลึกของหน่วยเซลล์ โดยพบการเรียงตัว 2 รูปแบบคือ แบบขนานไปทางเดียวกัน (parallel pattern) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไคตินชนิดเบตา และแบบสวนทางกัน (anti-parallel pattern) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไคตินชนิดอัลฟา สำหรับไคตินชนิดแกมมามักเป็นรูปแบบผสมระหว่างสองแบบโดยเชื่อว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงมาจากชนิดอัลฟา (Pillai และคณะ, 2009) รูปแบบการเรียงตัวดังกล่าวส่งผลต่อสมบัติในด้านต่างๆ อาทิเช่น ความสามารถในการละลายของไคตินซึ่งเป็นสารที่ละลายได้ยากในตัวทำละลายทั่วไปเนื่องจากการมีพันธะไฮโดรเจนมากมายภายในสายและระหว่างสายพอลิเมอร์โดยเฉพาะชนิดอัลฟาที่มีเสถียรภาพทางเคมีของโมเลกุลมากกว่า ทำให้พบไคตินชนิดอัลฟาได้มากกว่าในธรรมชาติ พันธะไฮโดรเจนดังกล่าวเกิดจากอะตอมไฮโดรเจนและออกซิเจนของหมู่ฟังก์ชันอะเซทาไมด์ (acetamide group; -CONH-) (ภาพที่ 9) จากเหตุผลดังกล่าวทำให้ไคตินถูกนำไปใช้ประโยชน์ได้ไม่มากนัก



ภาพที่ 9 แสดงแผนภูมิรูปแบบการเรียงตัวของโมเลกุลแบบสวนทางกันของไคตินชนิดอัลฟาและการเกิดพันธะไฮโดรเจน (ซ้าย) และแบบทางเดียวกันของไคตินชนิดเบตาและการเกิดพันธะไฮโดรเจน (ขวา) (Pillai และคณะ, 2009)

โดยทั่วไปไคตินและไคโตซานจะอยู่ในลักษณะโคพอลิเมอร์ (copolymer) ที่มีหน่วยพื้นฐานย่อยเป็นแซคคาไรด์ของวงแหวนกลูโคไพราโนส (glucopyranose ring) ซึ่งเป็นอนุพันธ์หนึ่งของกลูโคสเรียงสลับต่อกันไปเป็นสายยาวโดยไม่พบการแตกแขนงของสายพอลิเมอร์ สารไคโตซานมีสูตรโครงสร้างทางเคมีแตกต่างจากสารไคตินบริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 โดยมีหมู่ฟังก์ชันอะมิโน ( $-NH_2$ ) แทนที่หมู่ฟังก์ชันอะเซทาไมด์ ( $-NHCO-$ ) จากกระบวนการกำจัดหมู่อะเซทิลของสารไคติน (deacetylation) ภายใต้สภาวะที่มีความเป็นด่างเข้มข้นร้อยละ 40-50 และอุณหภูมิมากกว่า 120 องศาเซลเซียส (Muzzarelli และ Peter, 1997) (ภาพที่ 10) โดยมีค่าร้อยละของกระบวนการดีอะเซทิลเลชันหรือค่าดีกรีออฟดีอะเซทิลเลชัน (%DD) แสดงถึงสัดส่วนของหน่วยพื้นฐานไคโตซานในโครงสร้างของไคติน ในสภาวะต่างเข้มข้นดังกล่าวจะมีค่าประมาณ 70 ถึง 95 แม้ว่าจะไม่มีการกำหนดอย่างชัดเจนว่าค่าดีกรีออฟดีอะเซทิลเลชันเท่าใดจัดว่าเป็นสารไคโตซานแต่ค่าดีกรีที่มากกว่า 70 จัดได้ว่าเป็นสารไคโตซานเนื่องจากความสามารถในการละลายที่มากขึ้นในสารละลายกรดอ่อนเช่น กรดอะซิติก (acetic acid) (Kurita, 2006) การเตรียมซ้ำในสารละลายต่างเข้มข้นหลายครั้งจะทำให้ได้ค่าดีกรีออฟดีอะเซทิลเลชันสูงขึ้น บ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของสารไคโตซานที่ได้จากกระบวนการสกัดและสมบัติดีขึ้นจากการที่มีหมู่ฟังก์ชันเอมีนมากขึ้น (Mima และคณะ, 1983) นอกจากค่าดีกรีออฟดีอะเซทิลเลชันที่กล่าวมาแล้ว น้ำหนักโมเลกุลและลำดับการเรียงตัวของหมู่ฟังก์ชันอะมิโนและอะเซทาไมด์ยังเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญในการกำหนดสมบัติทางกายภาพของไคโตซาน (Pillai และคณะ, 2009) เช่น ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบของไคโตซานที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า เนื่องจากสามารถแทรกซึมผ่านชั้นหนาที่หุ้มแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้ดีกว่าโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่าและ

มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า ทั้งนี้กระบวนการดิวเอซีเทิลชันเป็นการปรับปรุงคุณสมบัติของไคโตซานให้ดีขึ้นเพื่อต่อการนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ ให้มีความหลากหลายมากกว่าสารไคตินที่ถูกนำมาใช้อย่างจำกัดเนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องการละลาย (Zheng และ Zhu, 2003)



ภาพที่ 10 บน แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารไคติน (a) และสารไคโตซาน (b)

ล่าง แสดงแผนภูมิกระบวนการสังเคราะห์สารไคโตซานด้วยการกำจัดหมู่อะเซทาไมด์ในโครงสร้างของสารไคตินโดยกระบวนการดิวเอซีเทิลชันในสภาวะต่าง

กระบวนการกำจัดหมู่อะเซทิลหรือดิวเอซีเทิลชัน เป็นกระบวนการทางเคมีที่ใช้ในการลดหรือกำจัดหมู่อะเซทิล (-CH<sub>3</sub>CO-) ที่อยู่บนโมเลกุลของไคตินให้เกิดเป็นไคโตซานซึ่งเป็นการเพิ่มหมู่เอมีน (-NH<sub>2</sub>) ในโครงสร้างโดยหมู่เอมีนนี้จะรับโปรตอน (H<sup>+</sup>) จากสารละลายกรดอ่อนเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมไอออน กระบวนการดังกล่าวจะกระทำโดยใช้สารละลายต่างที่มีความเข้มข้นสูงมากกว่าร้อยละ 40 ขึ้นไปโดยสามารถแบ่งการเกิดปฏิกิริยาได้เป็น 2 ลักษณะคือ ปฏิกิริยาเกิดเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous reaction) โดยเตรียมจากไคตินในรูปแบบต่าง (alkali chitin) (Sannan และคณะ, 1975) ร่วมกับสารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1-6 วัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้ภายใต้สภาวะนี้จะเกิดเป็นโคพอลิเมอร์ชนิดสุ่ม (random-type copolymer) อีกรูปแบบหนึ่งคือปฏิกิริยาไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (heterogeneous reaction) ซึ่งเป็นรูปแบบที่ใช้กันโดยทั่วไปจะกระทำในสารละลายไซเตียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40-50 ที่อุณหภูมิ 90-130 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 4-5 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้มักเกิดเป็นโคพอลิเมอร์ชนิดกลุ่ม (block-type copolymer) (Kasaai, 2009)

## 2.2 ดีกรีของฟดีอะเซทิลเลชัน (Degree of Deacetylation : DD)

ค่าดีกรีของฟดีอะเซทิลเลชันเป็นตัววัดหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อสมบัติทั้งในด้านชีวภาพเคมี ฟิสิกส์หรือสมบัติเชิงกลของสารไคตินและไคโตซานรวมถึงอนุพันธ์ของสารทั้งสองประเภทนี้ด้วย โดยทั่วไปค่าที่น้อยกว่าร้อยละ 50 จะแสดงถึงความเป็นสารไคติน สำหรับค่าที่ใกล้เคียงร้อยละ 100 จะบอกถึงความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาดีอะเซทิลเลชันของสารไคโตซานซึ่งหมายถึงความเป็นผลึกสูงในโครงสร้าง (highly crystallined) และความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้น (enhanced solubility) สารไคโตซานที่มีค่าดีกรีของฟดีอะเซทิลเลชันมากจะทำให้เกิดความหลากหลายในการนำไปใช้งานได้มากขึ้น นอกจากนี้ค่าดังกล่าวยังบอกถึงประสิทธิผลและทำนายความสามารถด้านต่างๆ เพื่อให้การนำสารดังกล่าวไปใช้งานเกิดประโยชน์สูงสุดได้ จากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีในปัจจุบัน ทำให้มีวิธีการต่างๆ มากมายในการตรวจสอบค่าดีกรีของฟดีอะเซทิลเลชันซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดี ข้อเสียและข้อจำกัดแตกต่างกันไป การเลือกใช้เครื่องมือในการวัดที่ดีและเหมาะสมกับสารตัวอย่างเป็นสิ่งที่ทำนายต่อผู้วิจัยเนื่องจากข้อจำกัดในการเตรียมชิ้นทดสอบหรือปริมาณสารอาจเป็นตัวจำกัดการใช้งานเครื่องมือชนิดนั้นๆ และส่งผลต่อความเที่ยงตรงในการวัด เครื่องมือที่ใช้ในการวัดอาจแบ่งออกได้ตามลักษณะของหลักการทำงานดังต่อไปนี้

### 2.2.1 หลักการสเปกโตรสโคปี (Spectroscopy)

หลักการโดยทั่วไปคือ การวัดอัตราส่วนระหว่างความหนาแน่นหรือความสูงของแถบพลังงาน (energy band intensities) ของสารตัวอย่าง ( $A_m$ ) ต่อสารอ้างอิง ( $A_r$ ) ร่วมกับการสร้างเส้นกราฟของอัตราส่วนการดูดซับพลังงานของสารตัวอย่างเทียบกับสารอ้างอิง วิธีการที่ใช้หลักการนี้ได้แก่

2.2.1.1 วิธีการนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (Nuclear Magnetic Resonance: NMR spectroscopy) ชนิด  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$   $^{15}\text{N}$  เป็นต้น เครื่องมือชนิดนี้จะวัดความหนาแน่นของพลังงานผ่านทางอะตอมของธาตุทั้งสามบนโครงสร้างเคมีของสารไคตินและ/หรือไคโตซาน ข้อดีของเครื่องมือชนิดนี้คือ ให้ความแม่นยำในการวัดสารไคตินที่ทำละลายได้ยากกว่าสารไคโตซาน ไม่ต้องทำการเตรียมตัวอย่างที่มีความยุ่งยากมากนักและความชื้นไม่มีผลต่อการวัด แต่มีข้อเสียคือ มีความไวต่อสารปนเปื้อนประเภทโปรตีนรวมถึงเครื่องมือที่ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก และมีราคาแพง (Hirai และคณะ, 1991)

2.2.1.2 วิธีการอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Infrared spectroscopy) ทั้งแบบชนิด IR และ near-IR เป็นการวัดแถบการดูดซับ (absorption band) ช่วง

อินฟราเรด (IR) (Sannan และคณะ, 1978; Baxter และคณะ, 1992; Sabnis และ Block, 1997) หรืออินฟราเรดช่วงใกล้ (near-IR) ของอิเล็กทรอนิกส์แบบเนติสเปกตรัม (Rathke และ Hudson, 1993) ข้อมูลที่ได้เป็นการประเมินผลทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ (qualitative and quantitative evaluation) การคำนวณค่าดีกรีออฟดีอะเซทิเลชันได้จากการวัดความสูงจากเส้นฐาน (baseline) ของแถบการดูดกลืนทดสอบ (probe band) เทียบเป็นอัตราส่วนกับความสูงของแถบการดูดกลืนอ้างอิง (reference band) ร่วมกับค่าคงที่ซึ่งแตกต่างกันไปตามแต่ละแนวคิด (Kasaai, 2008) ข้อดีของวิธีการนี้คือ การเตรียมตัวอย่างที่ไม่ยุ่งยากมากนัก มีความแม่นยำสูง รวดเร็วและเครื่องมือใช้งานง่าย ส่วนข้อเสียคือ ต้องใช้ปริมาณสารทดสอบมากกว่าวิธีอื่นในการเตรียมตัวอย่าง การทดสอบมีความไวต่อความชื้นและปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศมากซึ่งอาจส่งผลต่อการเกิดแถบการดูดซับรบกวนการวัดและการคำนวณค่าดีกรีออฟดีอะเซทิเลชันได้ นอกจากนี้หากแถบการดูดซับเกิดขึ้นไม่ชัดเจนหรือทับซ้อนมากอาจทำให้การวัดเส้นฐาน (baseline) เป็นไปได้ยากและมีผลต่อความเที่ยงตรงในการการคำนวณ ในที่นี้ผู้วิจัยจะขอกล่าวรายละเอียดเฉพาะการใช้งานในช่วงความยาวคลื่นรังสีอินฟราเรดเนื่องจากการเตรียมตัวอย่างที่ได้จากการทดลองครั้งนี้มีความเหมาะสมกับวิธีการทดสอบวิธีการนี้ อีกทั้งยังมีการศึกษาในอดีตมากมายที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบในช่วงความยาวคลื่นอินฟราเรด โดยทั่วไปความยาวคลื่นในช่วงรังสีอินฟราเรดจะอยู่ในช่วง 1200 ถึง 4000 ส่วนต่อเซนติเมตร ( $\text{cm}^{-1}$ ) ชิ้นตัวอย่างในการทดสอบจะทำการเตรียมเป็นแผ่นฟิล์มบางของส่วนผสมผงโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) และสารทดสอบหรือทำให้เกิดแผ่นฟิล์มบางของสารละลายโคตินและ/หรือโคโตซาน ในอดีตมีผู้ทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างแถบการดูดซึมอ้างอิงและแถบการดูดซึมอ้างอิงรวมถึงสมการในการคำนวณค่าดีกรีออฟดีอะเซทิเลชันไว้มากมาย เช่น  $A_{1560}/A_{2875}$  (Baxter และคณะ, 1992),  $A_{1655}/A_{2875}$  (Brugnerotto และคณะ, 2001a),  $A_{1655}/A_{3450}$  (Domszy และ Roberts, 1985),  $A_{1655}/A_{1070}$  (Miya และคณะ, 1980),  $A_{1655}/A_{1030}$  (Muzzarelli และคณะ, 1980),  $A_{1560}/A_{1160}$  (Sannan และคณะ, 1978) เป็นต้น (Kasaai, 2008)

แถบการดูดกลืนอ้างอิงคือ แถบการดูดกลืนที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปตามค่าดีกรีออฟดีอะเซทิเลชัน ซึ่งหมายถึงหมู่ฟังก์ชันบนโครงสร้างที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากปฏิกิริยาทางเคมี โดยทั่วไปมักใช้แถบไฮดรอกซิล (OH) และพันธะคาร์บอนไฮโดรเจนสายตรง (C-H) ที่แถบการดูดกลืน 3450 และ 2877 ส่วนต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ การใช้พันธะคาร์บอนไฮโดรเจนสายตรงมักเกิดปัญหาเนื่องจากการทับซ้อนของยอดกราฟเนื่องจากการมีพันธะนี้มากมายในโครงสร้าง จึงทำให้การใช้แถบการดูดกลืนของพันธะไฮดรอกซิลได้รับความนิยมมากกว่าเนื่องจากเห็นได้ชัดเจน แต่มีข้อเสียคืออาจเกิดยอดกราฟทับซ้อนได้บ้างจากการรบกวนของพันธะไฮโดรเจนที่มาจากหมู่ไฮดรอกซีเมทิล (hydroxymethyl group;  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) ภายในสายพอลิเมอร์หรือการปนเปื้อนความชื้นของชิ้นทดสอบ

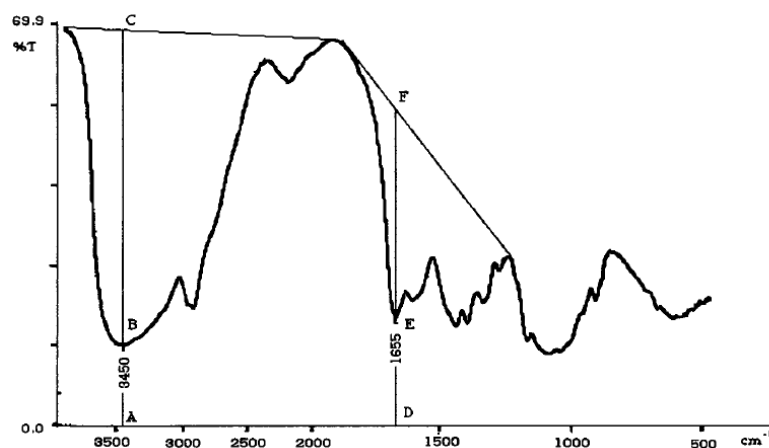
สำหรับแถบการดูดกลืนทดสอบคือ แถบการดูดกลืนที่เปลี่ยนแปลงไปตามค่าดีกรีดือฟตีอะเซทิลเลชัน เมื่อพิจารณาที่ปฏิกิริยาดีอะเซทิลเลชันที่เกิดการเปลี่ยนหมู่อะเซทาไมด์ (-CONH<sub>2</sub>) บนโครงสร้างของไคติน เป็นหมู่อะมิโน (-NH<sub>2</sub>) ของไคโตซานทำให้แถบการดูดกลืนของหมู่ฟังก์ชันคาร์บอนิล (C=O) และพันธะไฮโดรเจนไฮโดรเจน (-NH-) ที่ช่วง 1626/1655 และ 1561 ส่วนต่อเซนติเมตรตามลำดับถูกนำมาใช้ตรวจสอบความสูงที่ลดลงภายหลังปฏิกิริยาดีอะเซทิลเลชัน

ในปี 1978 Moore และคณะได้เสนอสมการ (5) ที่ใช้ความยาวคลื่นในช่วง 1655 (amide I band) และ 3450 (Hydroxyl I band) ส่วนต่อเซนติเมตรของแถบการดูดกลืนในช่วงความยาวคลื่นอินฟราเรดเป็นครั้งแรก โดยทำการเตรียมตัวอย่างโดยใช้สารอะเซทิลเลทไคโนซานเนื้อผสม (heterogeneous N-acetylated chitosan) และวัดความสูงของยอดกราฟในช่วงความยาวคลื่นทั้งสอง โดยมีอัตราส่วนเท่ากับ 1.33 และ 0 เป็นอัตราส่วนของสารอะเซทิลเลทไคติน (fully N-acetylated chitin) และสารดีอะเซทิลเลทไคโตซาน (fully deacetylated chitosan) ตามลำดับ สมการนี้ถูกใช้ในการคำนวณค่าดีกรีดือฟตีอะเซทิลเลชันซึ่งมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 85 ถึง 87 ใกล้เคียงกับการศึกษาเปรียบเทียบโดยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปีชนิด <sup>13</sup>C (Prashanth และคณะ, 2002)

$$\% DD = 100 - \left[ \left( \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times 75.2 \right] \dots \dots \dots \text{สมการ (5)}$$

Baxter และคณะในปี 1992 ได้เสนอสมการ (6) ที่ใช้แถบการดูดกลืนเดิมโดยอธิบายแก้ไขการลากเส้นฐานที่แถบการดูดกลืนอ้างอิงที่ 3450 ส่วนต่อเซนติเมตร (amide I band) ว่ามีความถูกต้องมากกว่าการใช้ความสูงของแถบการดูดกลืนอ้างอิงพันธะคาร์บอนไฮโดรเจนสายตรงที่ 2878 ส่วนต่อเซนติเมตร (amide II band) ที่เสนอไว้โดย Sannan และคณะในปี 1978 ซึ่งไม่เที่ยงตรงในการคำนวณค่าในช่วงดีกรีสูงๆ แม้ว่าสารทดสอบจะเกิดปฏิกิริยาดีอะเซทิลเลชันอย่างสมบูรณ์ก็ตาม เนื่องจากแถบการดูดกลืนช่วงนี้มักหายไป งานวิจัยครั้งนี้ยอมรับอัตราส่วนที่ความยาวคลื่น 3450 ส่วนต่อเซนติเมตรร่วมกับการใช้แถบเอไมด์ที่หนึ่ง (amide I band : 1655 ส่วนต่อเซนติเมตร) โดยการลากเส้นฐานประกอบกับการคำนวณดังภาพที่ 11 โดยแนะนำการเตรียมขึ้นทดสอบว่าควรให้สารไคโตซานมีขนาดเล็กและใช้ผงโพแทสเซียมโบรไมด์จำนวนเล็กน้อยเพื่อให้ขึ้นทดสอบมีความใส

$$\% DD = 100 - \left[ \left( \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times 115 \right] \dots \dots \dots \text{สมการ (6)}$$



ภาพที่ 11 แสดงแผนภูมิตัวอย่างแถบสเปกตรัมอินฟราเรดและตัวอย่างการวาดเส้นฐานเพื่อการคำนวณค่าดีกรีของฟิโอะเซทิเลชัน (Sabnis และ Block, 1997)

สำหรับการคำนวณโดยใช้อัตราส่วนแถบการดูดกลืนอื่น ๆ มีผู้เสนอไว้มากมายซึ่งจะไม่ขอก้าวถึงในที่นี้แต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อแตกต่างกันเนื่องจากแต่ละความยาวคลื่นก็มีข้อจำกัดและความเหมาะสมตามลักษณะสารตัวอย่างแต่ละประเภท อีกทั้งการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นจากการเตรียมตัวอย่างไม่ว่าจะมาจากความชื้นหรือสิ่งแปลกปลอมอื่นที่มีพันธะหรือหมู่ฟังก์ชันที่ทำให้เกิดการรบกวนของยอดกราฟทำให้วิธีการคำนวณเพียงแบบเดียวอาจทำให้ได้ค่าดีกรีที่ไม่แม่นยำและเที่ยงตรงนัก ทั้งนี้ค่าดีกรีที่ถูกต้องและแม่นยำต้องเกิดจากการที่เลือกอัตราส่วนการดูดกลืนของแต่ละความยาวคลื่นที่ดี เพื่อให้ได้สเปกตรัมในการวัดค่าที่เหมาะสมต่อการแปลผลทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ โดยทั่วไปสเปกตรัมที่ดีมักเกิดจากสารทดสอบที่มีความเป็นผลึกสูง (highly crystalline) เนื่องจากจะให้เส้นกราฟที่ชัดเจนและมีฐานของยอดกราฟที่แคบกว่า

2.2.1.3 วิธีการอัลตราไวโอเลตสเปกโตรสโคปี (Ultraviolet Spectroscopy) (Tan และคณะ, 1998) รวมทั้งโครมาโทกราฟีชนิดเจล (Gel permeation Chromatography) (Aiba, 1986) โดยอาศัยหลักการการวัดค่าความยาวคลื่นดูดกลืน (absorption wavelength) ของอะเซทิลกลูโคซามีน (*N*-acetyl glucosamine) ในโครงสร้างไคตินและ/หรือไคโตซานที่เปลี่ยนแปลงไปจากค่าสูงสุด ( $200 \pm 2$  นาโนเมตร) ข้อดีคือ เป็นเครื่องมือที่มีความเที่ยงตรงและแม่นยำสูงเมื่อเทียบกับวิธีอื่นแต่มีข้อด้อยคือ ต้องการความชำนาญในการเตรียมตัวอย่างและความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างมีผลต่อความแม่นยำในการวัด

## 2.2.2 หลักการดั้งเดิม (Conventional method)



หลักการทั่วไปจะอาศัยสารเคมีจำพวกกรด ต่างที่สามารถแตกตัวเกิดประจุเป็นตัววัด ปฏิกริยาหรือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจึงมักเลือกใช้กับสารโคโคไตซานที่สามารถเกิดประจุบนหมู่ฟังก์ชัน ในโครงสร้างและเกิดปฏิกริยากับสารละลายที่สามารถแตกตัวให้ประจุได้ ข้อดีของหลักการนี้คือ ทำได้ง่าย สารเคมีที่ใช้ไม่มีความยุ่งยากในการเตรียมรวมถึงความชื้นในระบบไม่มีผลต่อการวัด แต่มีข้อจำกัดคือต้องทำในสภาวะที่เป็นสารละลายและต้องไม่มีการปนเปื้อนโปรตีนหรือไอออนโลหะที่ส่งผลต่อการวัด ตัวอย่างหลักการนี้เช่น กระบวนการไทเทรชัน (titration) ด้วยสารละลายต่างของสารทดสอบโคโคไตซานที่มีประจุบวก ( $-NH_3^+$ ) แล้วทำการวัดค่ากรด-ด่าง (pH) ที่เปลี่ยนแปลงไปแล้วจึงทำการวาดเส้นกราฟเพื่อวัดปริมาณสารละลายต่างที่ใช้ไปในปฏิกริยาซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงดีกรีของฟอสเฟตอะเซทิลเลชัน (Arcidiacono และ Kaplan, 1992) หากเป็นการวัดด้วยสารละลายกรดจะทำการเตรียมสารโคโคไตซานในสารละลายต่างเฉื่อยแล้วจึงทำการวัดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ค่าดีกรีที่วัดได้เกิดจากการวัดปริมาณสารละลายกรดที่ใช้ในการทำปฏิกริยากับหมู่อะมิโนอิสระของสารโคโคไตซาน (Sannan และคณะ, 1976) การวัดแบบไดเรคคอลลอยด์ไทเทรชัน (Direct colloid titration) ซึ่งทำการวัดปริมาณของประจุลบของสารจำพวกเกลือโพแทสเซียมที่ทำปฏิกริยากับประจุบวกบนโคโคไตซานในสารละลายกรด (Hirai และคณะ, 1991) การวัดแบบคอนดัคไทเทตรี (Conductometry) อาศัยการวัดหมู่เอมีนของโคโคไตซานจากปริมาณสารละลายต่างที่ใช้เพื่อทำให้เกิดสภาพเป็นกลาง (neutralization) โดยสังเกตจากกราฟที่สร้างขึ้น (Raymond และคณะ, 1993) นอกจากนี้ยังมีวิธีการวัดชนิดอื่นโดยอาศัยหลักการนี้ อาทิเช่น โปเทนชิโอเมตริก (potentiometric titration) (Tolaimate และคณะ, 2000) เป็นต้น

### 2.2.3 หลักการแบบทำลาย (Destructive method)

วิธีนี้จะมีการใช้เอนไซม์ (Nanjo และคณะ, 1991) หรือสารละลายกรด (Niola และคณะ, 1993) เข้ามาตัดหรือทำลายโครงสร้างของสารโคโคไตซินและ/หรือโคโคไตซานเพื่อให้เกิดโมเลกุลที่เล็กลง เช่น หน่วยกลูโคซามีนและ/หรืออะเซทิลกลูโคซามีน ทำให้เกิดหมู่ฟังก์ชันที่ง่ายต่อการดักจับของสารที่ใช้ในการวัด เช่น แอมโมเนียมไอออน ( $-NH_3^+$ ) เป็นต้นแล้วจึงทำการตรวจสอบด้วยคัลเลอร์เมตริ (Colorimetry) หรือโครมาโทกราฟีชนิด HPLC (High performance liquid chromatography) นอกจากนี้ยังรวมถึงการวิเคราะห์ในระดับธาตุเช่น การวิเคราะห์หาธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน หรือออกซิเจนด้วยเครื่องวิเคราะห์ธาตุ (Elemental Analyzer) (Ottoy และคณะ, 1996) หรือการวิเคราะห์แบบแคลอรีเมตริชนิดดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่ง (Differential scanning Calorimetry) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์โดยอาศัยปริมาณไนโตรเจนจากตัวอย่างที่ผ่านการเผาทำลาย (decomposed sample)

แต่มีข้อเสียคือปริมาณน้ำปนเปื้อนในตัวอย่างที่ทำให้อาจทำให้ผลผลิตปลา (Guinesi และ Cavalheiro, 2006)

### 2.3 การใช้ประโยชน์ของสารไคโตซานในทางการแพทย์และทันตกรรม

นอกจากความสามารถในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารไคตินและไคโตซานแล้วสารทั้งสองชนิดนี้ยังมีคุณสมบัติที่ดีในด้านอื่นๆ เช่น ไม่มีความเป็นพิษ (non-toxic) มีความเข้ากันได้ดีทางชีวภาพสูง (biocompatibility) และสามารถละลายตัวได้ในชีวภาพ (biodegradation) เป็นต้น เส้นใยไคตินหรือเส้นด้ายไคโตซานถูกนำไปใช้เป็นวัสดุตกแต่งแผลและไหมเย็บแผล เนื่องจากช่วยส่งเสริมการหายของแผลและห้ามเลือด เป็นต้น นอกจากนี้ยังถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในเลนส์แก้วตาเทียม ผิวน้ำเทียมหรือวัสดุผสมกระดูกเทียมเนื่องจากข้อดีดังกล่าวไว้แล้วข้างต้น (Rinaudo, 2006)

การประยุกต์สารไคโตซานมาใช้ทางด้านทันตวัสดุโดยมักเป็นการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไคโตซานด้วยกระบวนการทางเคมีเพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่มีความหลากหลายและเป็นการปรับปรุงคุณสมบัติของสารไคโตซานให้ดียิ่งขึ้น (Jakubiak และคณะ, 2003) เช่น เอ็น-อะซิetyl (N-acetyl) เอ็น-ฟอร์มิล (N-formyl) หรือเอ็น-ซัลเฟต (N-sulfate) เป็นต้น การศึกษาอนุพันธ์ชนิดเอ็นคาร์บอกซีเมทิลไคโตซาน (N-carboxymethyl chitosan) และอิมิดาโซลิลไคโตซาน (imidazolyl chitosan) พบว่าสามารถปกป้องผิวไฮดรอกซีอะพาไทต์จากการเกาะติดของเชื้อแบคทีเรียและทำให้เชื้อแบคทีเรียหลุดออกจากผิวฟันโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์โดยไม่มีผลต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัสสายพันธุ์อื่นในปาก (Tarsi และคณะ, 1997) การศึกษาผลการยับยั้งเชื้อโดยใช้สารไคโตซานชนิดเบตาพบว่าจะสามารถฆ่าเชื้อสเตรปโตคอคคัสมิวแทนส์ได้เช่นกัน (Shimojoh และคณะ, 1996) บางการศึกษา ยังมีการนำมาผสมร่วมกับสารคลอเฮกซิดีน (chlorhexidine) พบว่าช่วยเสริมประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้มากขึ้น (Decker และคณะ, 2005) การศึกษาผลิตภัณฑ์สำหรับใช้ในช่องปากที่มีส่วนผสมของสารไคโตซานพบว่า หมากฝรั่งผสมสารไคโตซานสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุได้ร้อยละ 20 จากการศึกษากทางคลินิก (Hayashi และคณะ, 2007) และสามารถลดจำนวนเชื้อและการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้ เมื่อผสมลงในน้ำยาบ้วนปาก (Bae และคณะ, 2006)

### 2.4 สมบัติด้านจุลชีพของสารไคโตซาน

สารโคโตซานถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างมากมาย เนื่องจากเป็นวัสดุที่หาได้ง่าย ราคาถูกและไม่มีความเป็นพิษ คุณสมบัติในด้านการเป็นสารต้านจุลชีพทำให้สารโคโตซานได้รับความสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งในทางการแพทย์ แม้ว่าในปัจจุบันกลไกการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของโคโตซานยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดโดยมีผู้เสนอแนวคิดไว้ว่า เกิดจากประจุบวกของหมู่ฟังก์ชันเอมีนบริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ในสภาพที่เป็นกรดเล็กน้อย (ค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 6) โดยในสภาวะนี้สารโคโตซานซึ่งมีค่า pKa อยู่ในช่วง 6.1 ถึง 6.4 (Tsai และ Hwang, 2004) จะจับกับโปรตอน (protonation) เกิดเป็นแอมโมเนียมไอออนที่มีประจุบวกจับกับโปรตีนที่มีประจุลบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียหน้าที่ในการทำงานตามปกติและเกิดการหลุดร่วของโปรตีน อิเล็กโทรไลต์ หรือสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ออกภายนอกเซลล์นอกจากกลไกดังกล่าวแล้วสารโคโตซานยังสามารถทำหน้าที่คล้ายสารคีเลตติ้ง (chelating agent) โดยจับกับไอออนโลหะยับยั้งการสร้างสารพิษและหยุดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ บางการศึกษาพบว่าสารโคโตซานสามารถกระตุ้นกลไกและยับยั้งเอนไซม์บางชนิดในกลไกป้องกันของร่างกาย (host defense mechanism) (Rabea และคณะ, 2003; Qin และคณะ, 2006) หรือสามารถซึมผ่านเข้าสู่นิวเคลียสเข้าจับกับสารพันธุกรรม ยับยั้งการสังเคราะห์เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) และโปรตีนได้ (Sudarshan และคณะ, 1992) การศึกษาของ Liu และคณะในปี 2001 ได้รายงานค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (minimum inhibitory concentration : MIC) สายพันธุ์ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 (Liu และคณะ, 2000)

Bacteria	MIC (ppm)
Agrobacterium tumefaciens	100
Bacillus cereus	1000
Corinebacterium michiganence	10
Erwina sp.	500
Erwinia carotovora subsp.	200
Escherichia coli	20
Klebsiella pneumonia	700
Micrococcus luteus	20
Pseudomonas fluorescens	500
Staphylococcus aureus	20

ตารางที่ 2 แสดงค่า MIC ของสารโคโตซานต่อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ (Liu และคณะ, 2000)

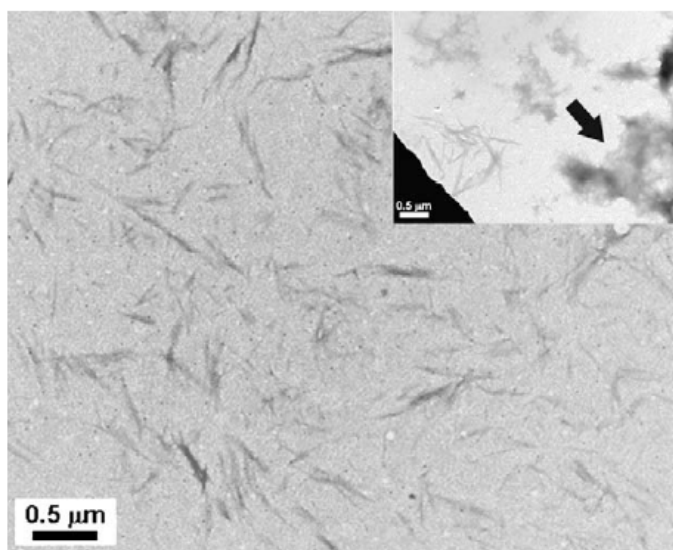
อสมมา ปาลเดชพงศ์ในปี 2005 ทำการศึกษาการผสมโคโตซานวิสเกอร์ปริมาณร้อยละ 1.2, 3.3, 5 และ 6.5 โดยนำหน้าลงในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่มีองค์ประกอบหลักเป็นสารบิส-จีเอมเอ และทีอีจีดีเอมเอพบว่าปริมาณสารโคโตซานวิสเกอร์อย่างน้อยร้อยละ 3.3 โดยนำหน้าสามารถยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (อสมมา ปาลเดชพงศ์, 2548)

การศึกษานี้เลือกใช้สารไตรโคซาน (triclosan) เป็นกลุ่มควบคุมชนิดบวก (positive control) จากการศึกษาในอดีตพบว่า สารดังกล่าวสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีฤทธิ์ครอบคลุมเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและลบ เชื้อรา ยีสต์และไวรัส เป็นต้น การศึกษาของ Marsh และคณะในปี 1991 รายงานค่าความเข้มข้นน้อยสุดที่ยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) ของสารไตรโคซานต่อเชื้อแบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และกลุ่มแลคโตบาซิลลัสพบว่ามีค่าเท่ากับ 10 ppm ซึ่งมีความปลอดภัยในการนำมาใช้ในมนุษย์ (Marsh, 1991) สำหรับกลไกการฆ่าเชื้อของไตรโคซานพบว่ามีเกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียโดยที่ระดับความเข้มข้นต่ำสารไตรโคซานจะขัดขวางการนำเข้ากรดอะมิโนที่มีความสำคัญสู่ภายในเซลล์ ทำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโตและทำให้เกิดความเสียหายกับเยื่อหุ้มเซลล์อย่างถาวรหากมีความเข้มข้นสูงขึ้น จากประสิทธิภาพดังกล่าวทำให้สารไตรโคซานได้รับความสนใจในทางทันตกรรมโดยนำมาใช้เป็นส่วนผสมในน้ำยาบ้วนปากและยาสีฟัน โดยพบว่ามีประสิทธิภาพในการลดการเกาะติดของเชื้อ โดยเฉพาะเชื้อที่เกี่ยวข้องกับโรคฟันผุและเหงือกอักเสบโดยให้ผลดีในระยะยาว (Gaffar และคณะ, 1997) ผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาการใช้งานยาสีฟันผสมสารไตรโคซานในทางคลินิก (Volpe และคณะ, 1993) ทำให้สารไตรโคซานได้รับการยอมรับในการเป็นสารต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพสูงโดยผลิตภัณฑ์ยาสีฟันที่ผสมสารไตรโคซานโดยได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกาในปี 1997 การศึกษานี้เลือกใช้สารเดนตินบอนด์ (dentine bonding agent) ยี่ห้อซีลแอนท์โพรเทกท์ (Seal&Protect<sup>®</sup>; Dentsply, USA) ซึ่งมีองค์ประกอบพื้นฐานเป็นเรซินมอนอเมอร์ประเภทไดและไตรเมทาคริเลทที่มีส่วนผสมของสารไตรโคซานเป็นวัสดุกลุ่มเปรียบเทียบ

## 2.5 กระบวนการสกัดและเตรียมเส้นใยโคโตซานวิสเกอร์

เส้นใยวิสเกอร์มีลักษณะเป็นเส้นใย (fiber) ขนาดเล็กที่สามารถสร้างขึ้นได้จากการสังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางเคมี (self-assembling) หรือการตัดแบ่งให้มีขนาดเล็กลง (breaking down) เกิดเป็นเส้นใยขนาดเล็กมากในระดับนาโนเมตร เนื่องจากการเตรียมให้ได้ขนาดเส้นใยที่มี

ขนาดเล็กทำให้มีประโยชน์ในด้านวัสดุศาสตร์ จึงได้รับความสนใจและถูกนำมาศึกษาผสมลงในเมทริกซ์ชนิดต่างๆ เกิดเป็นวัสดุผสมคอมโพสิตมากมายหลายรูปแบบ เส้นใยไคโตซานวิสเกอร์สามารถเตรียมได้จากกระบวนการสกัดสารไคตินจากเปลือกกุ้งผ่านกระบวนการกำจัดแร่ธาตุโดยใช้สารละลายกรด (demineralization) เพื่อละลายสารอนินทรีย์ออกจากเปลือก และกระบวนการกำจัดโปรตีน (deproteinization) โดยใช้สารละลายด่าง (Shimahara และ Takigushi, 1988) จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการสลายแอสิดไฮโดรไลซิส (acid hydrolysis) ให้ได้สารคอลลอยด์วิสเกอร์ (colloidal whisker suspension) นำไปปั่นแยกเพื่อให้พันธะระหว่างโมเลกุลแยกสลายอย่างสมบูรณ์ได้สารไคตินในรูปวิสเกอร์ (Paillet และ Dufresne, 2001) การเปลี่ยนให้เป็นเส้นใยไคโตซานวิสเกอร์กระทำได้โดยการนำเส้นใยไคตินวิสเกอร์ไปทำการกำจัดหมู่อะเซทิลเพื่อให้ได้หมู่ฟังก์ชันแอมโมเนียมที่มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับโซเดียมโบโรไฮไดรด์ในสภาวะที่มีความดันและอุณหภูมิจนได้เส้นใยไคโตซานวิสเกอร์ เส้นใยวิสเกอร์ที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นเรียวยาวระดับนาโนเมตรและมีการกระจายตัวห่างกันเนื่องจากการผลักกันของประจุบวกที่เกิดขึ้นในโมเลกุล (ภาพที่ 12) (Watthanaphanit และคณะ, 2010)



ภาพที่ 12 แสดงลักษณะเส้นใยไคโตซานวิสเกอร์ที่ได้จากการสกัดเปลือกกุ้งสายพันธุ์ *Penaeus merquiensis* ผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Watthanaphanit และคณะ, 2010)

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### วัสดุอุปกรณ์

1. ถุงเยื่อแผ่นกรองเซลลูโลส (dialysis tubing cellulose membrane) ขนาด 33X21 มิลลิเมตร (Sigma-Aldrich, UK)
2. ชุดเครื่องแก้วระบบรีฟลักซ์ (reflux system)
3. กระจกสไลด์ (glass slide) และแผ่นแก้วปิดสไลด์ (cover slip) ความหนา 0.15 มิลลิเมตร
4. กระจกทรายซิลิกอนคาร์ไบด์ความละเอียดเบอร์ 1200 (Metprep, IMPECH, South Africa)
5. กระจกกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร
6. ฟลasks สำหรับเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร
7. จานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร
8. จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60x15 มิลลิเมตร
9. จานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมชนิดก้นแบน (flat bottom 24-well plate)
10. ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer)
11. แผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร (Minisart®; Sartorius, Germany)
12. หลอดฉีดยาพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 และ 5 มิลลิเมตร
13. หลอดแก้วทดลองขนาดปริมาตร 5 มิลลิลิตร
14. หลอดทดลองชนิดเอเพนดอร์ฟ (eppendorf tube) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร
15. หลอดทดลองชนิดไครโอ (Cryotube) สำหรับเก็บแบคทีเรียและเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำ (-80°C)

## สารเคมี

ตารางที่ 3 แสดงรุ่นผลิต วันหมดอายุและบริษัทผู้ผลิตของสารเคมี

สารเคมี	รุ่นผลิต	วันหมดอายุ	บริษัทผู้ผลิต
สารเดนทินบอนด์ยี่ห่อซีลแอนโพรเทกท์	0811000497	10/2010	DENTSPLY, USA
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห่อเดลตัน	091030	10/2011	DENTSPLY, USA
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห่อที่ซัทเมท เอฟวัน	00102A	12/2010	KURARAY, JAPAN
อาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชัน (Brain Heart Infusion)	488657	01/2010	Oxoid, England
วุ้นผสมอาหาร (agar)	7116718	02/2012	BD company, France
อาหารเลี้ยงเชื้อโรโกซา (Rogosa agar)	748541	08/2010	Oxoid, England
อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มเอ็ม (DMEM)	699015	10/2010	Invitrogen, USA
ซีรัมจากฟิโตสัว	210080K	06/2013	Invitrogen, USA
ยาปฏิชีวนะสำหรับอาหารเลี้ยงเซลล์ (เพนนิซิลลิน แอมพิเทอริซินบีและสเตรปโตมัยซิน)	622184	06/2010	Invitrogen, USA
สารละลายเอ็มทีที	445146	-	Invitrogen, USA
สีย้อมทริปแฟนบลู (tryphan blue)	697483	10/2010	Invitrogen, USA
สารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)	83K2315	05/2010	Sigma-Aldrich, UK
ตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์	21930	-	Sigma-Aldrich, UK
สารละลายทริปซิน-อีดีทีเอ ร้อยละ 0.25	713712	05/2010	Invitrogen, USA

## เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องผสมอาหาร (food mixer)
2. เครื่องบดชนิดบอลมิลล์ (ball mill grinding machine)
3. โปรแกรมวิเคราะห์ภาพ SemAfore<sup>®</sup> 4.0 (Ins.tsto J.Rimppi Oy, Finland)
4. กล้องควบคุมอุณหภูมิ (Temperature controller; หจก.สวณหวงเอนจิเนียริง จำกัด, ประเทศไทย)
5. เครื่องกวนผสมแบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer; SM26, Stuart Scientific, England)
6. หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave machine) สำหรับการเตรียมโคโตซานวีสเกอร์
7. ออโตปิเปตต์ขนาด 1000, 100 และ 10 ไมโครลิตร (Eppendorf autopipette)
8. เครื่องผสมสารแบบมือถือ (hand homogenizer; S8N-8G, Ultra-turrax, Germany)
9. เครื่องปั่นผสมวอร์เทกซ์ (vortex mixing machine; 560E, Vortex-Genie2, USA)
10. เครื่องฉายแสง (light-curing unit; Elipar Trilight, 3M ESPE, USA)
11. เครื่องวัดความหนาแบบดิจิตอล (micrometer; Mitotoyo, Japan)
12. ตู้อบแห้ง (Hot air oven; Contherm, serie five, USA)
13. เครื่องระเหิดแห้ง (Lyophilizer; Flexi-Dry<sup>™</sup>, Stone Ridge, New York, USA)
14. เครื่องวัดความแข็งผิวระดับจุลภาค (FM-700e, Future-TECH, Japan)
15. เครื่องเอฟทีไออาร์สเปกโตรมิเตอร์ชนิดฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม (FTIR Spectrometer; Thermo Nicolet NEXUS 670, GMI, Inc., Minnesota, USA)
16. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (TEM; JEM-200CX, JEOL, USA)
17. ตู้ดูดความชื้น (Desiccator)
18. เครื่องวิเคราะห์ความหนืดของเหลว (Viscosimeter; RVDV-II, Brookfield, USA)



19. เครื่องตัดพื้นความเร็วต่ำ (Low speed cutting machine; KOMET 1000, BUEHLER, USA)
20. เครื่องควบคุมอุณหภูมิร้อนเย็นเป็นจังหวะ(Thermo-cycling machine; TC301+ CWB332R + HWB332R, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand)
21. เครื่องขัดผิววัสดุ (Polishing Machine; DPS 3200, IMPECH, South africa)
22. เครื่องชั่งดิจิตอลความละเอียด 0.0001 กรัม (Fine Digital Balancer; BP110S, Sartorius, Germany)
23. เครื่องเหวี่ยงแรงศูนย์กลาง (centrifuge machine; 6K15, Sigma, Germany)
24. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer; Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech, England)
25. ตู้ปรับอุณหภูมิและก๊าซเฉพาะอย่าง (CO<sub>2</sub> incubator) สำหรับแบคทีเรียและเซลล์ (Forma Scientific Inc., USA)
26. กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ (Stereo microscope; ML 9300, MEIJI, Japan)
27. กล้องจุลทรรศน์ดูเนื้อเยื่อ (Inverted stereo microscope; OLYMPUS IX70-88F, Olympus Optical Co.Ltd., Japan)
28. ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Lamina air flow; BH 2000 Series, Australia)

## วิธีการวิจัย

1. การสังเคราะห์วัสดุเคลือบหุ้มร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์และการพิสูจน์เอกลักษณ์

### 1.1 การสังเคราะห์โคตินและโคโตซานวิสเกอร์

เปลือกกุ้งสายพันธุ์ *Litopeneous vannamei* นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งและตากแดดจนเปลือกแห้งสนิทและไม่มีสีแล้วตัดส่วนหางและขาออกด้วยกรรไกร บดให้เปลือกมีขนาดเล็กลงด้วยเครื่องผสมอาหาร นำไปผ่านกระบวนการทางเคมีตามขั้นตอนดังนี้

1.1.1 การกำจัดสารประกอบอนินทรีย์ (Demineralization) ออกจากเปลือกกุ้ง โดยแช่เปลือกกุ้งในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ในอัตราส่วนเปลือก 1 มิลลิกรัมต่อสารละลาย 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วจึงทำการเปลี่ยนโดยใช้สารละลายชนิดและความเข้มข้นเดิมอีกครั้งทิ้งไว้อีก 24 ชั่วโมง เศษเปลือกที่ได้จะถูกนำไปล้างด้วยน้ำสะอาด จนกว่าจะได้ระดับความเป็นกรด-ด่างใกล้เคียง 7 นำเศษเปลือกที่ได้ไปอบให้แห้งในตู้อบแห้งอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงจนแห้ง

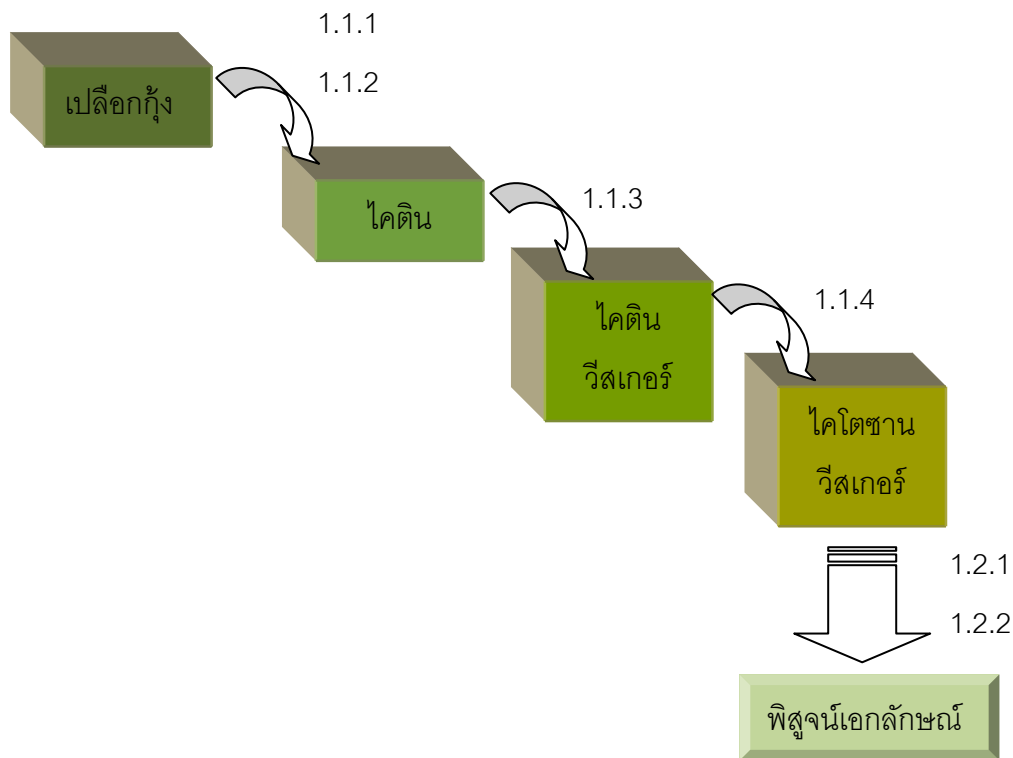
1.1.2 การกำจัดโปรตีน (Deproteinization) โดยต้มเศษเปลือกแห้งสนิทในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักในอัตราส่วนเปลือก 1 มิลลิกรัมต่อสารละลาย 10 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมงโดยในระหว่างการต้มต้องทำการคนอย่างต่อเนื่องและกระทำในตู้ดูดควันเท่านั้นเพื่อป้องกันอันตรายจากไอระเหยของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ภายหลังครบ 4 ชั่วโมงเศษเปลือกที่ได้จะมีสีจางลง นำมาทำการกรองแยกเศษเปลือกออก แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้งจนเศษเปลือกที่ได้มีความเป็นกรด-ด่างใกล้เคียง 7 นำเศษเปลือกที่ได้ไปทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เศษเปลือกที่ได้จะมีขนาดเล็กและกลายเป็นเกล็ดขนาดเล็ก ภายหลังการอบแห้งเกล็ดที่ได้จากกระบวนการดังกล่าวคือ เกล็ดโคติน (chitin flakes) ดังแสดงในภาพที่ 13 (Shimahara และ Takigushi, 1988)



ภาพที่ 13 แสดงลักษณะเกล็ดไคติน (ซ้ายบน) เกล็ดไคตินภายหลังการบดด้วยเครื่องบดชนิดบอลมิลล์ (ขวาบน) และการเปรียบเทียบขนาดเกล็ดก่อนและหลังการบด (ล่าง)

1.1.3 การเปลี่ยนเกล็ดไคตินให้เป็นเส้นใยไคตินวิสเกอร์ (chitin whiskers) โดยนำเกล็ดไคตินแห้งไปผ่านการบดละเอียดอีกครั้งด้วยเครื่องบดชนิดบอลมิลล์ให้ได้เกล็ดขนาดเล็ก ลงประมาณ 3 มิลลิเมตร (ภาพที่ 13) แล้วจึงนำไปผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยสารละลายกรด ไฮโดรคลอริก (acid hydrolysis) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ในสัดส่วนเกล็ดไคตินแห้ง 1 กรัมต่อสารละลาย กรด 30 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 104 องศาเซลเซียสทิ้งไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมงในระบบปริฟลักซ์ เมื่อครบ 6 ชั่วโมงจะเกิดเป็นสารแขวนลอยของไคตินที่มีสีขาวขุ่น ปล่อยให้สารเย็นตัวแล้วจึงนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาทีซึ่งจะทำให้เกิดการแยกชั้น ของสารแขวนลอยเกิดส่วนตะกอนและส่วนเหลว ดูดส่วนเหลวที่เป็นสารละลายกรดทิ้ง เปลี่ยนเป็นน้ำ กลั่นเพื่อล้างตะกอนแล้วทำการเหวี่ยงซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยความเร็วรอบเดิม นำไปทำการกรองด้วยถุงเยื่อ แผ่นกรองเซลลูโลสในระบบน้ำวนเป็นเวลา 3 วันจนมีค่าความเป็นกรด-ด่างใกล้เคียง 7 ซึ่งจะทำให้สาร ไคตินบางส่วนเกิดการตะกอนด้านล่างโดยมีสารคอลลอยด์ไคตินวิสเกอร์ลอยอยู่ด้านบน (Paillet และ Dufresne, 2001) แบ่งเก็บสารคอลลอยด์ไคตินในชั้นตอนนี้บางส่วนเพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์

1.1.4 การกำจัดหมู่อะเซทาไมด์ในโครงสร้างไคตินวีสเกอร์เพื่อเปลี่ยน เป็น ไคโตซานวีสเกอร์ ขั้นตอนนี้จะใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตรโดย สัดส่วนสารไคตินวีสเกอร์ 1 กรัมต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 มิลลิลิตรรวมกับการเติมสาร โซเดียมโบโรไฮไดรด์ร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก นำเข้าหม้อนิ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที สารแขวนลอยที่ได้จะถูกนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออน และผ่านเข้าเครื่องเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง นำไปทำการกรองในถุงเยื่อแผ่นกรองเซลลูโลสระบบน้ำวนจนเกิดเป็นชั้นตะกอนและสารคอลลอยด์ไค โตซานวีสเกอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.3 ขั้นตอนการเตรียมไคโตซานวีสเกอร์จากเปลือกกุ้ง ทั้งหมดแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 แสดงแผนภูมิสรุปขั้นตอนการสังเคราะห์ไคโตซานวีสเกอร์จากเปลือกกุ้ง

## 1.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ไคตินและไคโตซานวีสเกอร์

1.2.1 การตรวจสอบค่าดีกรีออฟดีอะเซทิเลชันและโครงสร้างเคมีของไคติน และไคโตซานวีสเกอร์ด้วยวิธีการฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรเมตรี

1.2.1.1 การเตรียมขึ้นทดสอบ โดยเจือจางสารแขวนลอยโคติน วิสเกอร์และโคโตซานวิสเกอร์ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 หยดลงในหลุมพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร นำไปอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลอกแผ่นฟิล์มออกจากหลุมพลาสติก

1.2.1.2 การทดสอบ นำแผ่นฟิล์มไปตรวจสอบด้วยเครื่องเอฟทีไออาร์สเปกโทรมิเตอร์ บันทึกแถบอินฟราเรดสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 400 ถึง 4000 ส่วนต่อเซนติเมตร วัดความสูงของแถบการดูดซับที่ความยาวคลื่น 1655 ส่วนต่อเซนติเมตร (amide I band) และ 3450 ส่วนต่อเซนติเมตร (hydroxyl I band) จากเส้นฐาน ค่าดีกรีออฟดีอะเซทิเลชันได้จากการคำนวณตามสมการ (Baxter และคณะ, 1992)

$$\% DD = 100 - \left[ \left( \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times 115 \right] \dots\dots\dots \text{สมการ (6)}$$

1.2.1.3 การวิเคราะห์ข้อมูล แถบอินฟราเรดสเปกตรัมที่ได้จะนำมาทำการคำนวณค่าดีกรีออฟดีอะเซทิเลชันและศึกษาโครงสร้างทางเคมีของโคตินและโคโตซานวิสเกอร์โดยวิธีบรรยายเชิงพรรณนา

1.2.2 การศึกษาขนาด (size) รูปร่าง (morphology) และการกระจายตัว (distribution) ของสารคอลลอยด์โคโตซานวิสเกอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน

1.2.2.1 การเตรียมขึ้นทดสอบ โดยเจือจางสารคอลลอยด์โคโตซานวิสเกอร์ 1 ส่วนในน้ำกลั่นปราศจากอ็อกซิเจน 100 ส่วน หยดลงบนกริดทองแดงที่เคลือบด้วยคาร์บอน (carbon coated copper formvar grid) วางทิ้งไว้ในอากาศให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 2 วัน

1.2.2.2 การทดสอบ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านที่กำลังขยาย 10000, 25000 และ 30000 เท่าตามลำดับ บันทึกภาพที่ได้เพื่อการแปลผลและวัดขนาดของวิสเกอร์ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ SemAfore<sup>®</sup> 4.0 (Ins.tsto J.Rimppi Oy, Finland) โดยวัดจากวิสเกอร์ที่แยกจากกันอย่างน้อย 50 วิสเกอร์ในแต่ละภาพร่วมกับทำการตรวจสอบรูปร่างและการกระจายตัว

1.2.2.3 การวิเคราะห์ข้อมูลจากภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน นำมาทำการศึกษานาดความกว้างและความยาวเฉลี่ย รูปร่างและการกระจายตัวของเส้นใยไคโตซานวีสเกอร์โดยวิธีบรรยายเชิงพรรณนา

### 1.3 การเตรียมวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมไคโตซานวีสเกอร์

1.3.1 การเตรียมวีสเกอร์แห้ง สารคอลลอยด์ไคโตซานที่ได้จะถูกนำไปเข้ากระบวนการทำให้แห้งด้วยวิธีการพรีชดราย (freeze-dried method) ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ผลผลิตที่ได้จะมีลักษณะเป็นเส้นใยขาวและมีความฟูเบาดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 แสดงกระบวนการทำสารคอลลอยด์ไคโตซานวีสเกอร์ให้แห้งด้วยวิธีไลโอไฟไลเซชัน (ซ้าย) และลักษณะวีสเกอร์ภายหลังกระบวนการ (ขวา)

### 1.3.2 การผสมไคโตซานวีสเกอร์ในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซิน

การผสมวัสดุจะกระทำในห้องที่บดแสงโดยก่อนการผสมต้องทำการอุ่นสารบิส-จีเอ็มเอในตู้อบแห้งอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสก่อนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้มอนอเมอร์มีความหนืดลดลง จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักวีสเกอร์ที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งและผสมลงในมอนอเมอร์ที่อีจีดีเอ็มเอ ปริมาณร้อยละ 1, 1.5, 2 และ 2.5 โดยน้ำหนักด้วยเครื่องผสมแบบมือถือด้วยความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที สำหรับสารแคมโฟรควิโนนจะผสมลงในสารเอมีนดีเอ็มเออีเอ็มเอในอัตราส่วน

ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนักของน้ำหนักเรซินมอนอเมอร์รวม จากนั้นจึงทำการผสมมอนอเมอร์องค์ประกอบทั้งหมดเป็นลำดับโดยเริ่มจากการใส่มอนอเมอร์ที่อีจีดีเอ็มเอที่มีวิสเกอร์ลงในมอนอเมอร์บิส-จีเอ็มเอ ตามด้วยสารดีเอ็มเออีเอ็มเอที่มีสารแคมโฟรควิโนนโดยก่อนการใส่แต่ละครั้งจะผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมแบบมือถือความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที โดยอัตราส่วนของมอนอเมอร์ชนิดต่างๆต่อมอนอเมอร์รวมโดยน้ำหนักคือ มอนอเมอร์บิส-จีเอ็มเอร้อยละ 58 มอนอเมอร์ที่อีจีดีเอ็มเอร้อยละ 41 และสารเอมีนดีเอ็มเออีเอ็มเอร้อยละ 1 ที่มีสารแคมโฟรควิโนนร้อยละ 0.2 ภายหลังจากผสมวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินจะถูกเก็บในขวดบรรจุที่มีสีทึบ สำหรับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์จะมีลำดับการผสมเหมือนขั้นตอนที่ได้กล่าวไว้ด้านบนโดยไม่มีการผสมโคโตซานวิสเกอร์ในมอนอเมอร์ที่อีจีดีเอ็มเอ

1.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ปริมาณโดยน้ำหนักน้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน

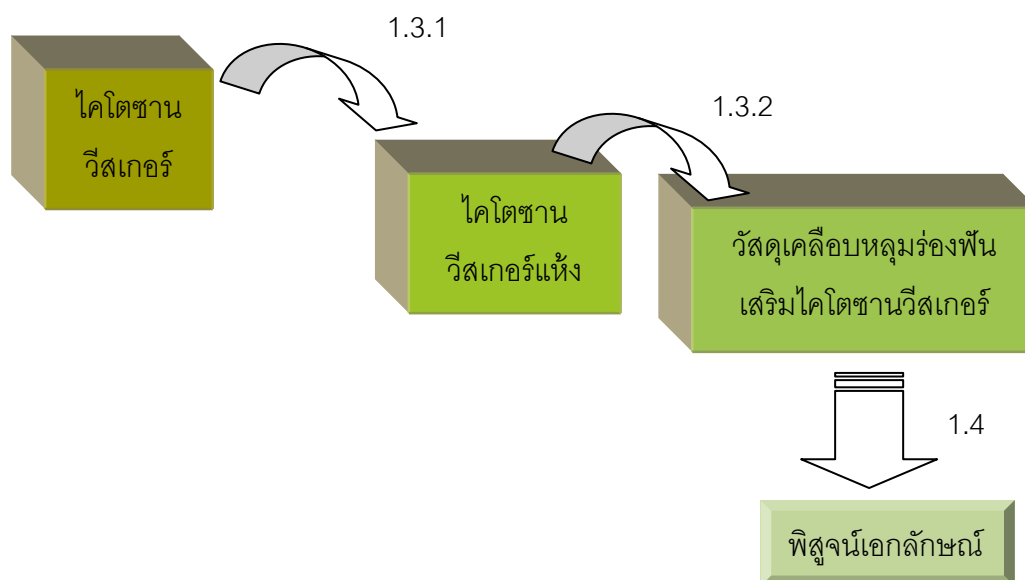
1.4.1 การเตรียมชิ้นวัสดุที่แข็งตัวแล้ว โดยหยดวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ปริมาณโดยน้ำหนักน้อยที่สุดที่ยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์จำนวน 1 หยดบนหลุมพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 3 มิลลิเมตร ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ทำการฉายแสงด้วยเครื่องฉายแสงความเข้ม 400 มิลลิวัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 40 วินาทีเพื่อให้วัสดุเกิดการแข็งตัว

1.4.2 การเตรียมชิ้นทดสอบสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยฝั่งชิ้นทดสอบที่ได้จาก 2.2.1 ในเรซิน นำไปตัดด้วยเครื่องมือโครโตม (microtome) ให้เป็นชิ้นบางและวางอยู่กึ่งริดทองแดง

1.4.3 การตรวจสอบ นำชิ้นทดสอบที่ได้จาก 2.2.2 ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านที่กำลังขยาย 2000 และ 8000 เท่าตามลำดับ บันทึกภาพที่ได้เพื่อการแปลผล

1.4.4 การวิเคราะห์ข้อมูล ภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านจะนำมาศึกษาการกระจายตัวของโคโตซานวิสเกอร์ปริมาณโดยน้ำหนักน้อยที่สุดที่ยับยั้ง

แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินโดยวิธีบรรยายเชิงพรรณนา ดังแสดงในแผนภูมิภาพที่ 16



ภาพที่ 16 แสดงแผนภูมิสรุปขั้นตอนการสังเคราะห์วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์และการพิสูจน์เอกลักษณ์

## 2. การทดสอบสมบัติด้านจุลชีพของสารคอลลอยด์โคโตซานวิสเกอร์และวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์

2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และแลคโตบาซิลลัส คาเซอิ โดยทำการเพาะเชื้อจากเชื้อตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเบรนนาร์ทอนิฟิวชัน (BHI broth) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่ไขว้ข้ามคืน จากนั้นแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเปล่า 95 มิลลิลิตร (5% inocula) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเลี้ยงเชื้อต่อภายใต้สภาวะเดิมของเชื้อแต่ละชนิดโดยในแต่ละชั่วโมงจะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงและดูดอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตรไปหว่านลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนนาร์ทอนิฟิวชันชนิดวุ้น (BHI agar plate) เพื่อตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนจานเพาะเลี้ยง สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (optical density) และจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ชั่วโมงต่างๆ ขั้นตอนนี้จะถูกทำซ้ำอีก 2 ครั้ง เชื้อแบคทีเรียที่เลือกใช้ตลอดการทดสอบจะอยู่ในช่วง mid



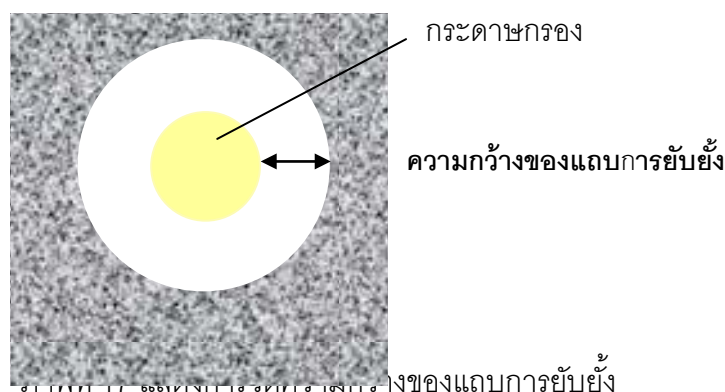
exponential phase ซึ่งมีปริมาณ  $5 \times 10^8$  สำหรับเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และ  $8 \times 10^8$  สำหรับเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิโดยมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง  $0.50 \pm 0.05$

2.2 การทดสอบสมบัติต้านจุลชีพของสารคอลลอยด์ไคโตซานวิสเกอร์จากการสัมผัสด้วยวิธีการวัดความกว้างของแถบการยับยั้ง (zone of inhibition)

2.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย กระทำในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง  $0.50 \pm 0.05$  ซึ่งมีเชื้อปริมาณ  $5 \times 10^8$  สำหรับเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และ  $8 \times 10^8$  สำหรับเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิ

2.2.2 การเตรียมสารคอลลอยด์ไคโตซานวิสเกอร์ โดยการแขวนลอยวิสเกอร์แห้งในน้ำกลั่นปราศจากอิออนและเชื้อโรค (sterile deionized water) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40, 20, 10 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธีการปลอดเชื้อในตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ

2.2.3 การเตรียมชิ้นทดสอบ ทำการเตรียมจำนวน 3 ชิ้นต่อกลุ่มทดสอบเพื่อการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้งโดยหยดสารคอลลอยด์ไคโตซานวิสเกอร์ปริมาตร 50 ไมโครลิตรที่มีความเข้มข้น 40, 20, 10 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงบนกระดาษกรองปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางกระดาษกรองคว่ำลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดวุ้นสำหรับเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และอาหารเลี้ยงเชื้อโรโกซาชนิดวุ้น (Rogosa agar plate) สำหรับเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิที่ได้ทำการหว่านเชื้อที่เตรียมไว้แล้วจากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรซึ่งมีเชื้อปริมาณ  $5 \times 10^7$  สำหรับเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และ  $8 \times 10^7$  สำหรับเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบโดยการวัดความกว้างของแถบการยับยั้งที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 17) โดยมีสารคลอเฮกซีดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นกลุ่มควบคุมชนิดบวกและสารละลายน้ำเกลือ (normal saline solution) เป็นกลุ่มควบคุมชนิดลบ



2.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล กระทำโดยเปรียบเทียบความกว้างของแถบการยับยั้งของโคโตซานวีสเกอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์โดยวิธีบรรยายเชิงพรรณนา

2.3 การตรวจหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) และ MBC (Minimum Bactericidal Concentration) ของสารคอลลอยด์โคโตซานวีสเกอร์

2.3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเบรนนาร์ทอินฟิวชันในหลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร เติมสารคอลลอยด์โคโตซานวีสเกอร์ลงในอาหารจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 40, 20, 10, 5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยมีสารคลอเฮกซิดีนความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และสารละลายน้ำเกลือเป็นกลุ่มควบคุมชนิดบวกและลบตามลำดับ ทำการเติมเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 100 ไมโครลิตรจากเชื้อที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 2.2.1

2.3.2 การตรวจหาค่า MIC โดยการตรวจสอบความขุ่นของหลอดทดลองจะกระทำภายหลังการผสมสารคอลลอยด์โคโตซานวีสเกอร์ความเข้มข้นต่าง ๆ กันร่วมกับเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดทดลองจากข้อ 2.3.1 เขย่าให้เข้ากัน นำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ค่า MIC คือ ความเข้มข้นน้อยที่สุดของโคโตซานวีสเกอร์ที่ไม่มีเชื้อขึ้นในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.3 การตรวจหาค่า MBC โดยการตรวจดูปริมาณโคโลนีเชื้อจากหลอดทดลองที่ไม่เห็นความขุ่นของเชื้อจะกระทำโดยแบ่งสารละลายเชื้อจากแต่ละหลอดปริมาณ 100 ไมโครลิตร หว่านลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนนาร์ทอินฟิวชันชนิดวุ้นสำหรับเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และอาหารเลี้ยงเชื้อโรโกซาชนิดวุ้นสำหรับเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอี นำไป

เพาะเลี้ยงต่อภายใต้สภาวะเดิมอีกครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ค่า MBC คือ ความเข้มข้นน้อยที่สุดของไคโตซานวิสเกอร์ที่ไม่ทำให้เกิดโคโลนีเชื้อบนจานเพาะเลี้ยง

2.3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล ค่า MIC และ MBC ของไคโตซานวิสเกอร์ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์จะถูกวิเคราะห์โดยวิธีบรรยายเชิงพรรณนา

2.4 การทดสอบสมบัติด้านจุลชีพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมไคโตซานวิสเกอร์จากการสัมผัสด้วยวิธีการวัดความกว้างของแถบการยับยั้ง (zone of inhibition)

2.4.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย กระจายในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเบรนนฮาร์ทอินฟิวชันให้มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง  $0.50 \pm 0.05$  ซึ่งมีเชื้อปริมาณ  $5 \times 10^8$  สำหรับเชื้อ สเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ และ  $8 \times 10^8$  สำหรับเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิ

2.4.2 การเตรียมชิ้นทดสอบ ทำการเตรียม 3 ชิ้นต่อกลุ่มทดสอบโดยเป็นการทดสอบ 3 ครั้ง โดยนำวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมไคโตซานวิสเกอร์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 2, 1.5 และ 1 โดยน้ำหนัก วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมไคโตซานวิสเกอร์ สารบอนด์ซึลแอนด์โพเรเทกท์และวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดันและทีซท์เมทเอฟ-วัน หยดลงในแม่แบบหลอดฉีดยาพลาสติกตัดขวางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรสูง 2 มิลลิเมตรจนเต็ม ปิดทับด้านบนด้วยกระจกปิดสไลด์ ฉายแสงด้วยเครื่องฉายแสงความเข้ม 400 มิลลิวัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 40 วินาที แกะชิ้นงานที่แข็งตัวแล้วออกจากแม่แบบ ทำการฆ่าเชื้อชิ้นวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินทดสอบทั้งหมดด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมงและทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนเริ่มการทดสอบ

2.4.3 การทดสอบ กระจายโดยวางชิ้นทดสอบปราศจากเชื้อลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนนฮาร์ทอินฟิวชันชนิดวุ้นสำหรับเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และอาหารเลี้ยงเชื้อโรโกซาชนิดวุ้นสำหรับเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิที่ได้หว่านเชื้อที่เตรียมไว้แล้วจาก 2.2.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรซึ่งมีเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์จำนวน  $5 \times 10^7$  และเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิจำนวน  $8 \times 10^7$  ทำการเพาะเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมงภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจากการวัดความกว้างของแถบการยับยั้งเช่นเดียวกับวิธีการแสดงในภาพที่ 17 โดยมีวัสดุกลุ่มเปรียบเทียบคือ สารบอนด์ซึลแอนด์โพเรเทกท์ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเดลดันและทีซท์เมทเอฟ-วัน

2.4.4 การวิเคราะห์ข้อมูล กระทำโดยเปรียบเทียบความกว้างของแถบการยับยั้งของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ปริมาณต่างๆกันและวัสดุเปรียบเทียบต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์โดยวิธีบรรยายเชิงพรรณนา

2.5 การทดสอบสมบัติด้านจุลชีพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินผสมสารโคโตซานวิสเกอร์ด้วยวิธีการนับโคโลนี (colony counting method) และการคำนวณอัตราการลดลงของเชื้อ (bacteria reduction rate)

2.5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย กระทำเช่นเดียวกับในข้อ 2.2.1

2.5.2 การเตรียมชิ้นทดสอบ ทำการเตรียมจำนวน 3 ชิ้นต่อกลุ่มทดสอบ โดยนำวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 2, 1.5 และ 1 โดยน้ำหนัก วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์ สารบอนด์ซีลแอนทีโพรเทกท์และวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดันและทีชท์เมทเอฟ-วัน หยดลงในแม่แบบหลอดฉีดยาพลาสติกตัดขวาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร สูง 2 มิลลิเมตรจนวัสดุเต็ม ปิดทับด้านบนด้วยกระจกปิดสไลด์ ฉายแสงด้วยเครื่องฉายแสงความเข้ม 400 มิลลิวัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 40 วินาที แกะชิ้นงานที่แข็งตัวแล้วออกจากแม่แบบ ทำการฆ่าเชื้อชิ้นวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินทดสอบทั้งหมดด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์เป็นเวลา 5 ชั่วโมงและทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนเริ่มการทดสอบ

2.5.3 การตรวจนับโคโลนีก่อนการสัมผัสชิ้นงาน โดยเตรียมเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.5.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำการปั่นแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อให้เชื้อตกตะกอน ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าออกเพื่อเปลี่ยนเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 10 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปตรวจนับโคโลนี จากนั้นแบ่งเชื้อในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ลงในหลอดทดลองปริมาตรหลอดละ 1 มิลลิลิตร

2.5.4 การตรวจนับโคโลนีหลังการสัมผัสชิ้นงาน กระทำโดยนำชิ้นทดสอบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในข้อ 2.5.2 มาใส่ในหลอดสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเชื้อจาก 2.5.3 ด้วยวิธีการปราศจากเชื้อ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมชนิดวอร์เท็กซ์เป็นเวลา 10 วินาที วางหลอดทดลองชนิดเอฟเพนดอร์ฟที่มีชิ้นทดสอบบนเครื่องเขย่าในตู้อบที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการตรวจนับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนนาร์ทอินฟิวชันชนิด

วุ้นสำหรับเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และอาหารเลี้ยงเชื้อโรโกซาชนิดวุ้นสำหรับเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอลิงบนจานเพาะเลี้ยง เพาะเลี้ยงต่อภายใต้สภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อนับจำนวนเชื้อ ทำการคำนวณอัตราการลดลงของเชื้อแบคทีเรียภายหลังการสัมผัสขึ้นทดสอบ 12 ชั่วโมง จากสมการ (Li และคณะ, 2006)

$$\text{อัตราการลดลงของแบคทีเรีย} = \frac{(\text{จำนวนโคโลนีหลอดที่ไม่สัมผัส} - \text{จำนวนโคโลนีหลอดที่สัมผัส})}{\text{จำนวนโคโลนีหลอดที่ไม่สัมผัส}} \times 100$$

2.5.5 การวิเคราะห์ข้อมูล โดยทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการลดลงของแบคทีเรียของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์และวัสดุกลุ่มเปรียบเทียบ ด้วยวิธีการทางสถิติดังนี้

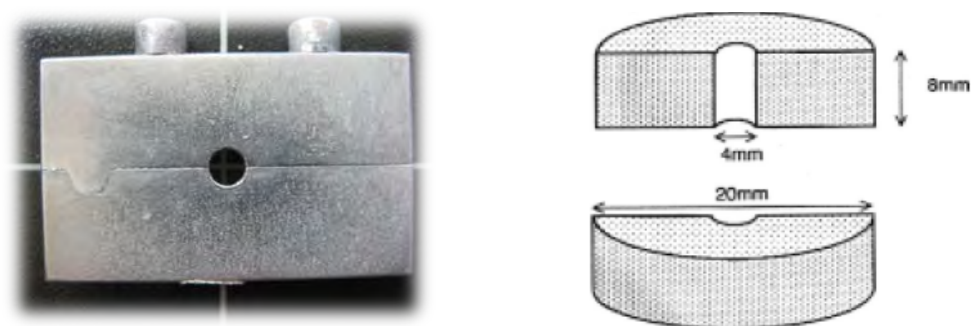
2.5.5.1 กรณีประชากรมีการแจกแจงปกติ จะทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way Analysis of Variance) และทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยอัตราการลดลงในแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดเชฟเฟ (Scheffe) กรณีมีความแตกต่างกันของความแปรปรวน (Homogeneity of variances) จะทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยอัตราการลดลงในแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดทามเฮนส์ (Tamhane's)

2.5.5.2 กรณีประชากรมีการแจกแจงไม่ปกติ จะทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติครัสคัลวัลลิส เอช (Kruskal-Wallis H) และทำการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยอัตราการลดลงในแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบพหุคูณระหว่างกลุ่ม (Multiple comparison between treatments)

3. การทดสอบสมบัติกายภาพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ปริมาณโดยน้ำหนักน้อยที่สุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์

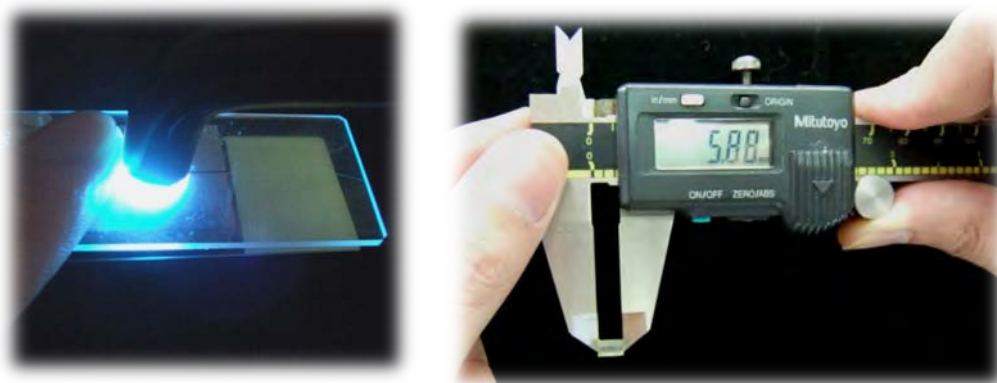
3.1 ความลึกของการแข็งตัวตามมาตรฐานสากลไอเอสโอ 6874:2005 (The International Organization for Standardization, 2005)

3.1.1 การเตรียมชิ้นทดสอบ ทำการเตรียมจำนวน 10 ชิ้นต่อกลุ่มวัสดุโดยหดยวัสดุลงในแม่แบบโลหะรูปทรงกระบอกดังแสดงในภาพที่ 18 ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร สูง 6 มิลลิเมตรจนเต็ม ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ด้านบน ทำการฉายแสงด้วยเครื่องฉายแสงความเข้ม 400 มิลลิวัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 20 วินาที นำชิ้นทดสอบออกจากแม่แบบและใช้กระดาษทิชชูเช็ดชั้นของวัสดุที่ไม่แข็งตัวออกจากด้านล่างของชิ้นทดสอบ วัสดุที่ใช้ในการเปรียบเทียบได้แก่ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซาน วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ปริมาณน้อยที่สุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดันและที่ซัทเมทเอฟ-วัน (The International Organization for Standardization, 2005)



ภาพที่ 18 แสดงแม่แบบโลหะที่ใช้ในการขึ้นรูปชิ้นทดสอบ (ซ้าย) และมิติของชิ้นทดสอบ (ขวา)

3.1.2 การทดสอบ กระทำโดยการวัดความลึกของการแข็งตัวจากความสูงของชิ้นทดสอบด้วยเครื่องวัดความหนาแบบดิจิตอลความละเอียด 0.001 มิลลิเมตร (ภาพที่ 19) บันทึกผลและแสดงผลในรูปค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 19 แสดงวิธีการใช้เครื่องวัดความหนาแบบดิจิตอลเพื่อวัดความลึกของการแข็งตัว

3.1.3 การวิเคราะห์ข้อมูล กระทำโดยเปรียบเทียบค่าความลึกการแข็งตัวของวัสดุ 3 ชิ้นแรกกับค่ามาตรฐานสากลจำนวน (มากกว่า 1.5 มิลลิเมตร) จากนั้นจึงทำการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของวัสดุทั้ง 10 ชิ้นต่อกลุ่มวัสดุด้วยวิธีการทางสถิติดังนี้

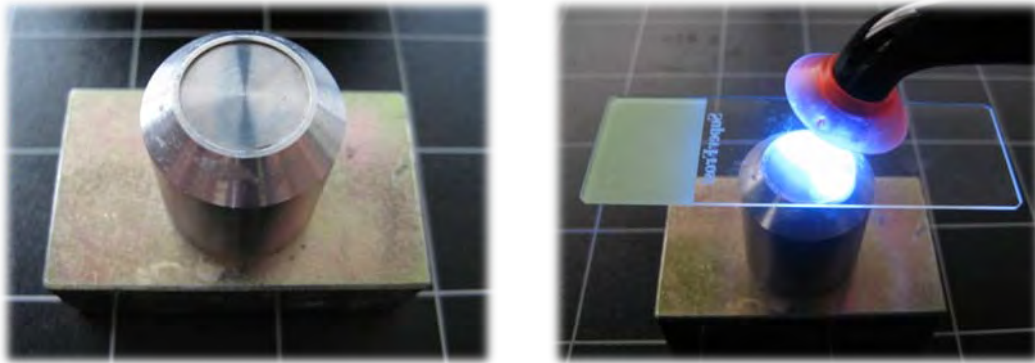
3.1.3.1 กรณีประชากรมีการแจกแจงปกติ จะทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวและทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดเซฟเฟ่ กรณีมีความแตกต่างกันของความแปรปรวนจะทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดทามเฮนส์

3.1.3.2 กรณีประชากรมีการแจกแจงไม่ปกติ จะทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติครัสคัล-วัลลิส เอชและทำการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบพหุคูณระหว่างกลุ่ม

3.2 การดูดซับน้ำและการละลายตัวตามมาตรฐานสากลไอเอสโอ 4049: 2000 (The International Organization for Standardization, 2000)

3.2.1 การเตรียมชิ้นทดสอบ ทำการเตรียมจำนวน 5 ชิ้นต่อกลุ่มโดยหดยวัสดุลงในแบบพิมพ์โลหะเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 มิลลิเมตร หนา 0.5 มิลลิเมตรจนเต็ม ปิดทับด้านบนด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ ทำการฉายแสงด้วยเครื่องฉายแสงความเข้ม 400 มิลลิวัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 20 วินาทีต่อครั้ง โดยแต่ละครั้งให้ทำการฉายแสงซ้อนเหลื่อมกัน (overlap) จำนวน 5 ครั้งเพื่อให้วัสดุเกิดปฏิกิริยาแข็งตัวสมบูรณ์ทั้งชิ้นดังแสดงในภาพที่ 20 วัสดุที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

ได้แก่ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ ปริมาณน้อยที่สุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดันและทีชท์เมทเอฟ-วัน



ภาพที่ 20 แสดงแม่แบบโลหะสำหรับขึ้นรูปขึ้นทดสอบ (ซ้าย) และขั้นตอนการฉายแสงเพื่อให้ขึ้นงานเกิดการแข็งตัว (ขวา)

3.2.2 การบันทึกค่าน้ำหนักครั้งที่ 1 ( $m_1$ ) นำขึ้นทดสอบเก็บในสภาวะที่มีสารดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำออกมาชั่งน้ำหนักทุกๆ 24 ชั่วโมงด้วยเครื่องชั่งแบบอิเล็กทรอนิกส์ระบบดิจิทัล ความละเอียด 0.0001 กรัมจนกระทั่งขึ้นทดสอบมีน้ำหนักคงที่จึงทำการบันทึกค่าน้ำหนักที่วัดได้

3.2.3 การบันทึกค่าน้ำหนักครั้งที่ 2 ( $m_2$ ) นำขึ้นทดสอบที่ผ่านการชั่งน้ำหนักครั้งที่ 1 แล้วแช่ในน้ำปราศจากอ็อกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน นำขึ้นทดสอบขึ้นจากน้ำและซับน้ำส่วนเกินออกด้วยกระดาษกรองจนกระทั่งไม่พบความชื้นบนพื้นผิว ทำการบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ครั้งที่ 2 โดยระยะเวลาในการชั่งน้ำหนักต้องไม่เกิน 1 นาทีหลังจากน้ำ

3.2.4 การบันทึกค่าน้ำหนักครั้งที่ 3 ( $m_3$ ) นำขึ้นทดสอบไปเก็บในตู้ดูดความชื้นที่มีสารดูดความชื้นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสอีกครั้ง นำออกมาชั่งน้ำหนักทุก 24 ชั่วโมงจนขึ้นทดสอบมีน้ำหนักคงที่แล้วจึงทำการบันทึกน้ำหนักครั้งที่ 3

3.2.5 การทดสอบ โดยการคำนวณค่าการดูดซับน้ำและการละลายตัวจากค่าน้ำหนักที่วัดได้ทั้ง 3 ครั้งจากสมการ

$$\text{ค่าการดูดซับน้ำ (water sorption)} = \frac{m_2 - m_3}{V}$$



$$\text{ค่าการละลายตัว (water solubility)} = \frac{m_1 - m_3}{V}$$

โดย ค่า  $m_1$  หมายถึง ค่าน้ำหนักครั้งที่ 1 (หลังเตรียมขึ้นทดสอบ)

ค่า  $m_2$  หมายถึง ค่าน้ำหนักครั้งที่ 2 (หลังแช่ขึ้นทดสอบในน้ำ)

ค่า  $m_3$  หมายถึง ค่าน้ำหนักครั้งที่ 3 (หลังทิ้งให้แห้ง)

ค่า  $V$  หมายถึง ปริมาตรของขึ้นทดสอบ คำนวณจากค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางในสองตำแหน่งที่ตั้งฉากกันและความหนาในตำแหน่งที่ตัดเส้นผ่านศูนย์กลางสี่ตำแหน่งและกลางขึ้นทดสอบอีกตำแหน่งโดยใช้เครื่องวัดระยะที่มีความละเอียด 0.001 มิลลิเมตร

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล กระทำโดยเปรียบเทียบค่าการดูดซับน้ำและการละลายตัวของวัสดุแต่ละกลุ่มจำนวน 5 ขึ้นกับค่ามาตรฐานสากล (ค่าการดูดซับน้ำน้อยกว่า 50 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรและค่าการละลายตัวน้อยกว่า 7.5 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) และทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของวัสดุทั้ง 5 ขึ้นต่อกลุ่มด้วยวิธีการทางสถิติ ดังนี้

3.2.6.1 กรณีประชากรมีการแจกแจงปกติ จะทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวและทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดเซฟเฟ กรณีมีความแตกต่างกันของความแปรปรวนจะทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดทามเฮนส์

3.2.6.2 กรณีประชากรมีการแจกแจงไม่ปกติ จะทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติครัสคัลวัลลิส เอชและทำการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบพหุคูณระหว่างกลุ่ม

### 3.3 การทดสอบความแข็งแรงผิววิกเกอร์ส

3.3.1 การเตรียมขึ้นทดสอบ ทำการเตรียมจำนวน 10 ขึ้นต่อกลุ่มโดยหยดวัสดุลงในแม่แบบโลหะรูปทรงกระบอกเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร สูง 2 มิลลิเมตรจนเต็มปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ด้านบน ฉายแสงด้วยเครื่องฉายแสงความเข้ม 400 มิลลิวัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 40 วินาที เช็ดผิวขึ้นทดสอบด้วยกระดาษทิชชูเพื่อกำจัดชั้นผิวที่ไม่แข็งตัว เก็บขึ้น

ทดสอบไว้ที่อุณหภูมิห้อง ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ  $50 \pm 10$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัสดุที่ใช้ในการเปรียบเทียบได้แก่ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวีสเกอร์ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ปริมาณน้อยที่สุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดันและทีซท์เมทเอฟ-วัน

3.3.2 การทดสอบ กระทำโดยวัดค่าความแข็งผิวแบบวิกเกอร์สด้วยเครื่องวัดความแข็งผิวระดับจุลภาคโดยใช้แรงกด 500 มิลลิกรัมเป็นเวลา 15 วินาที จำนวน 10 รอยกดต่อชิ้นทดสอบ โดยให้ตำแหน่งที่กดอยู่ห่างกันอย่างน้อย 10 เท่าของความกว้างรอยกดและให้กระจายรอยกดครอบคลุมชิ้นทดสอบเป็นบริเวณกว้าง บันทึกผล

3.3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล กระทำโดยการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยวิธีการทางสถิติดังนี้

3.3.3.1 กรณีประชากรมีการแจกแจงปกติ จะทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวและทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดเซฟเฟ กรณีมีความแตกต่างกันของความแปรปรวนจะทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดตามเฮนส์

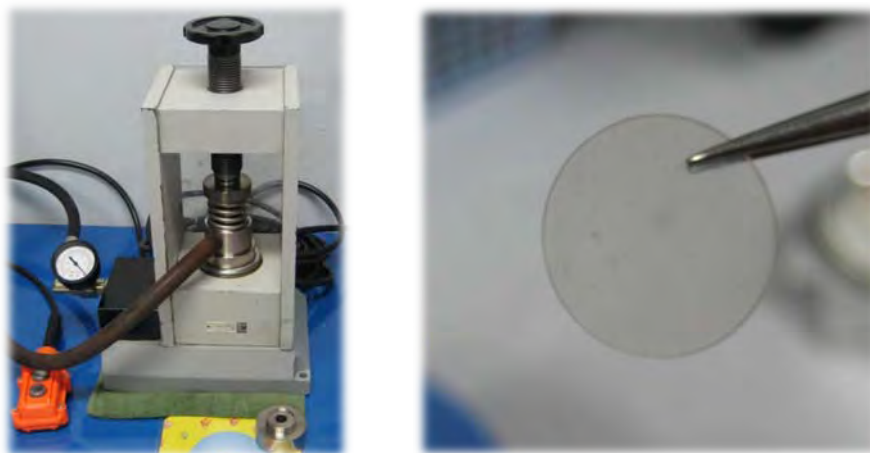
3.3.3.2 กรณีประชากรมีการแจกแจงไม่ปกติ จะทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติครัสคัล-วัลลิส เอชและทำการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบพหุคูณระหว่างกลุ่ม

### 3.4 การทดสอบอัตราการเปลี่ยนแปลงฟันระดู

3.4.1 การเตรียมชิ้นทดสอบ ทำการเตรียมจำนวน 5 คู่ตัวอย่างต่อกลุ่ม (วัสดุทดสอบที่แข็งตัวและยังไม่แข็งตัว) โดยกลุ่มวัสดุที่ใช้เปรียบเทียบได้แก่ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวีสเกอร์ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ปริมาณน้อยที่สุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดันและทีซท์เมทเอฟ-วัน

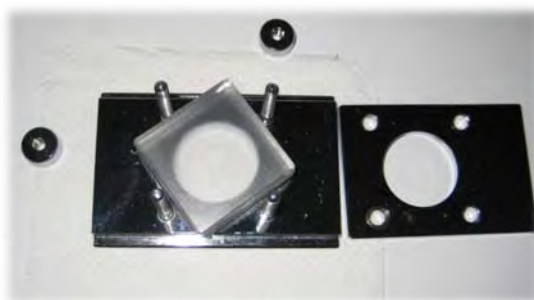
3.4.2 การเตรียมวัสดุทดสอบที่แข็งตัวแล้ว โดยหยดวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันลงในแม่แบบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตรฉายแสงความเข้ม 400 มิลลิวัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 40 วินาที ตัดแบ่งชิ้นวัสดุให้มีน้ำหนักชิ้นละประมาณ 5 มิลลิกรัม เก็บชิ้นทดสอบ

ทั้งหมดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บดชิ้นงานให้ละเอียดแล้วนำไปผสมกับผงโปแตสเซียมโบรไมด์ อัดขึ้นรูปเป็นแผ่นกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตรหนา 0.5 มิลลิเมตรด้วยเครื่องอัด ความดันดังแสดงในภาพที่ 21



ภาพที่ 21 แสดงลักษณะเครื่องอัดความดันขึ้นรูปขึ้นทดสอบ (ซ้าย) และลักษณะขึ้นทดสอบหลังการอัดขึ้นรูป (ขวา)

3.4.3 การเตรียมวัสดุทดสอบที่ยังไม่แข็งตัว โดยทำการหยดวัสดุปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำให้เกิดเป็นชั้นฟิล์มบางบนแท่นโพแทสเซียมโบรไมด์ (potassium bromide liquid cell) ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 แสดงลักษณะแท่นโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr liquid cell)

3.4.4 การทดสอบ จะกระทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเอฟทีไออาร์ สเปกโทรมิเตอร์ชนิดฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม บันทึกแถบสเปคตรัมอินฟราเรดทำการวัดความสูงแถบการดูดซึ่มที่ 1636 และ 1582 ส่วนต่อเซนติเมตรจากเส้นฐานและทำการคำนวณหาอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่จากสมการ (Ferracane และ Greener, 1984; Rueggeberg และคณะ, 1990)

$$\text{ดัชนีการดูดซับ (ร้อยละ)} = 100 - \frac{\text{อัตราส่วนการดูดซับ (absorbance ratio) ของวัสดุที่แข็งตัว}}{\text{อัตราส่วนการดูดซับ (absorbance ratio) ของวัสดุที่ไม่แข็งตัว}}$$

$$\text{อัตราส่วนการดูดซับ} = \frac{\text{ความสูงของยอดคาร์บอนพันธะคู่สายตรง (aliphatic C = C peak)}}{\text{ความสูงของยอดคาร์บอนพันธะคู่วงแหวน (aromatic C = C peak)}}$$

3.4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล กระทำโดยทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยวิธีการทางสถิติดังนี้

3.4.5.1 กรณีประชากรมีการแจกแจงปกติ จะทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวและทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดเซฟเฟ กรณีสมีความแตกต่างกันของความแปรปรวนจะทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดตามเฮนส์

3.4.5.2 กรณีประชากรมีการแจกแจงไม่ปกติ จะทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติครัสคัล-วัลลิส เอชและทำการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบพหุคูณระหว่างกลุ่ม

### 3.5 การทดสอบความเหน็ด

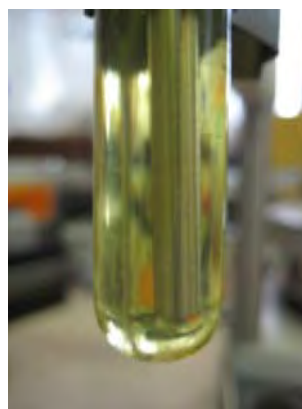
3.5.1 การเตรียมวัสดุทดสอบ กระทำโดยการตวงวัสดุใส่ลงในหลอดทดลองปริมาตร 4 มิลลิลิตร จำนวน 10 หลอด วัสดุที่ใช้เปรียบเทียบได้แก่ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวีสเกอร์และวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ปริมาณน้อยที่สุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์

3.5.2 การทดสอบ กระทำการทดสอบด้วยเครื่องวัดความเหน็ดที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสโดยการจุ่มแท่งทดสอบ (test probe) ลงในหลอดวัสดุแต่ละหลอดโดยให้ระมัดระวังการสัมผัสกันของแท่งทดสอบกับขอบหลอดดังแสดงในภาพที่ 23 บันทึกผล

3.5.3 การวิเคราะห์ข้อมูล กระทำโดยทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของวัสดุทั้งสองกลุ่มด้วยวิธีการทางสถิติ ดังนี้

3.5.3.1 กรณีประชากรมีการแจกแจงปกติ จะทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติอินดิเพนเดนท์ แซมเปิล ที-เทส (Independent sample T-test)

3.5.3.2 กรณีประชากรมีการแจกแจงไม่ปกติ จะทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติแบบแมน-วิทนีย์ ยู เทส (Mann-Whitney U test)



ภาพที่ 23 แสดงเครื่องตรวจวัดความหนืด (ซ้าย) และขั้นตอนการวัดด้วยแท่งทดสอบ (ขวา)

### 3.6 การทดสอบการรั่วซึมตามขอบ

การทดสอบส่วนนี้จะเลือกใช้พินกรามน้อยที่สมบูรณ์และไม่มีรอยผุจำนวน 10 ซีตต่อกลุ่ม หากมีหินน้ำลายให้กำจัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิกสเกลเลอร์ก่อนแล้วจึงทำการขัดผิวพินให้สะอาดด้วยผงขัดพิมิส ล้างด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด ตรวจสอบความสะอาดบนพื้นผิวอีกครั้งด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอโดยมีวัสดุกลุ่มเปรียบเทียบได้แก่ วัสดุเคลือบหลุมร่องพินไม่เสริมโคโตะซานวิสเกอร์และวัสดุเคลือบหลุมร่องพินเสริมโคโตะซานวิสเกอร์ปริมาณน้อยที่สุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์

3.6.1 การเตรียมผิวพินด้วยวัสดุเคลือบหลุมร่องพิน พินที่ทำความสะอาดแล้วจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 10 ซี ปรับสภาพผิวพินด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 37 เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำให้สะอาดและเป่าให้แห้ง ทำการเคลือบหลุมร่องพินด้วยวัสดุทดสอบฉายแสงความเข้ม 400 มิลลิวัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 40 วินาที นำพินทั้ง 2 กลุ่มเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิร้อนเย็นเป็นจังหวะสลับกันในช่วงอุณหภูมิ 5 และ 55 องศาเซลเซียสนานครั้งละ 30 วินาทีโดยมีช่วงพักก่อนเปลี่ยนอุณหภูมิรอบละ 10 วินาที ทำสลับกันไปจำนวน 10,000 รอบ จากนั้น

นำฟันขึ้นมาฝั่งให้แห้งแล้วทำการย้อมด้วยสารละลายเมทิลีนบลู (methylene blue) ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Cehreli และ Gungor, 2008) ล้างน้ำให้สะอาด ปล่อยให้แห้ง

3.6.2 การเตรียมชิ้นทดสอบ โดยทำการตัดฟันในแนวใกล้แก้ม-ใกล้ลิ้น (bucco-lingual direction) ความหนา 1 มิลลิเมตรด้วยเครื่องตัดฟันความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยระหว่างการตัดต้องมีน้ำช่วยลดอุณหภูมิขณะตัด (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 แสดงลักษณะชิ้นทดสอบที่ผ่านการตัด

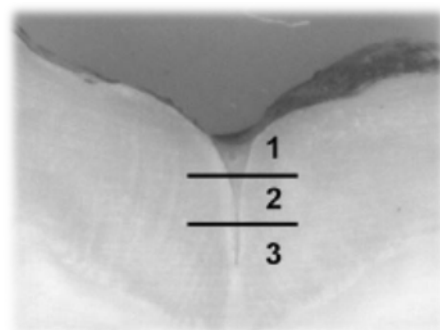
3.6.3 การทดสอบ กระทำโดยตรวจดูการรั่วซึมตามขอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอกำลังขยาย 30 เท่า และจำแนกตามหลักเกณฑ์ของ Övrebö และ Raadal ในปี 1990 (ภาพที่ 25)

ระดับ 0 คือ ตรวจไม่พบการแทรกซึมของสารละลายสีย้อม

ระดับ 1 คือ พบการแทรกซึมของสารละลายสีย้อมส่วนครึ่งบน (top half) ของวัสดุ

ระดับ 2 คือ พบการแทรกซึมของสารละลายสีย้อมส่วนครึ่งล่าง (bottom half) ของวัสดุ

ระดับ 3 คือ พบการแทรกซึมของสารละลายสีย้อมภายใต้วัสดุ



ภาพที่ 25 แสดงการจำแนกระดับการรั่วซึมตามขอบ (Koyuturk และคณะ, 2008)

3.6.4 การวิเคราะห์ข้อมูล กระทำโดยเปรียบเทียบชนิดวัสดุเคลือบหลุมร่องพื้นเรซินที่มีผลต่อระดับการรั่วซึมตามขอบด้วยวิธีการโคสแควร์และทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระดับการรั่วซึมตามขอบของวัสดุเคลือบหลุมร่องพื้นทั้งสองกลุ่มด้วยวิธีการทางสถิติ ดังนี้

3.6.4.1 กรณีประชากรมีการแจกแจงปกติ จะทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติอินดิเพนเดนท์ แซมเปิล ที-เทส

3.6.4.2 กรณีประชากรมีการแจกแจงไม่ปกติ จะทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติแบบแมน-วิทนีย์ ยู เทส

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด L929 ของวัสดุเคลือบหลุมร่องพื้น ภายหลังสัมผัสโดยตรงและโดยอ้อม

#### 4.1 การเตรียมเซลล์เพื่อทดสอบ

4.1.1 เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบคือ L929 (ATCC, CCL-1) ซึ่งแช่แข็งไว้ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะถูกนำมาทำการเลี้ยงต่อทันทีที่อุณหภูมิห้องด้วยพลาสติกขนาด 25 ตารางเซนติเมตรด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดัลเบคโคโมดิฟายด์อีเกิล (Dulbecco's Modified Eagles medium, DMEM; Invitrogen, USA) ผสมซีรัมจากฟิทัสของวัว (Fetal bovine serum) ร้อยละ 10 โดยปริมาตรร่วมกับยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สเตร็ปโตมัยซินซัลเฟตและแอมโฟเทอริซินบี 100 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ในตู้บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

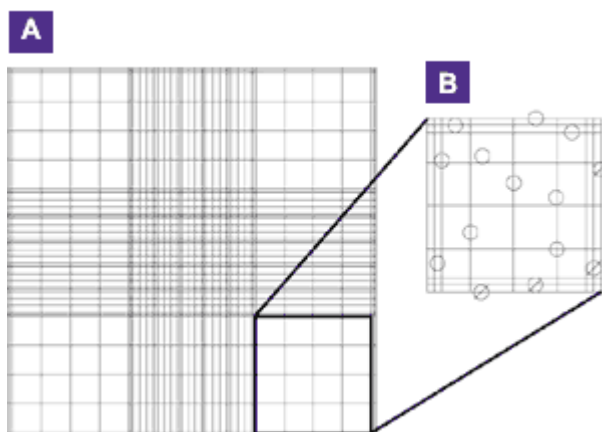
4.1.2 เมื่อเซลล์ในพลาสติกมีความหนาแน่น (confluency) ร้อยละ 80 ให้ทำการแบ่งขยายเซลล์ไปยังพลาสติกใหม่โดยทำการทริปซินในสเซลล์ในพลาสติกด้วยสารทริปซินผสมสารอีดีทีเอ (EDTA) ร้อยละ 0.25 เป็นเวลา 1 นาทีในตู้บอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ถ้ายาสารแขวนลอยเซลล์ (cell suspension) ไปยังหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเหวี่ยงแรงสูงศูนย์กลางความเร็วรอบ 800 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์

4.1.3 ภายหลังกการเหียงเซลล์จะเกิดการตกตะกอน ให้ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนบนออก เซลล์ที่ตกตะกอน (cell pellet) อยู่บริเวณก้นหลอดจะถูกเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเข้าไปผสมให้เข้ากัน แล้วจึงทำการนับจำนวนเซลล์โดยผสมสารแขวนลอยของเซลล์ลงในสารละลายทริฟแฟนบลู (tryphan blue) ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 โดยดูดสารแขวนลอยของเซลล์ปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายทริฟแฟนบลูปริมาตร 45 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดขนาดเล็ก หยดสารละลายผสมปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนฮีโมไซโตมิเตอร์เพื่อทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ สำหรับวิธีการนับจะทำการนับเซลล์ภายในช่องสี่เหลี่ยมจากมุมทั้ง 4 ทั้งนี้มีเงื่อนไขว่าให้ทำการนับเซลล์เฉพาะที่ทับอยู่บนเส้นด้านบนและด้านซ้ายของช่องสี่เหลี่ยมดังแสดงในภาพที่ 26 ค่าที่ได้นำมาหาค่าเฉลี่ยแล้วคูณ 10,000 และค่าปัจจัยการละลาย (dilution factor) ในที่นี้คือ 10 และ ผลลัพธ์ที่ได้คือ จำนวนเซลล์ในสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรดังแสดงในตัวอย่างการคำนวณ

ตัวอย่างการคำนวณ จำนวนที่นับได้ในช่องสี่เหลี่ยมทั้ง 4 มุม คือ 25, 27, 28, 24 รวม 104

หารด้วย 4 มีค่าเท่ากับ 26 และคูณด้วย 10 และ 10000

ผลลัพธ์ที่ได้คือ 2,600,000 เซลล์ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร



ภาพที่ 26 แสดงลักษณะช่องสี่เหลี่ยมของฮีโมไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และตัวอย่างในการเลือกนับเซลล์

4.1.4 ทำการแบ่งเซลล์ไปยังฟลาสก์ใหม่ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 ซึ่งเซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงจนมีความหนาแน่นใกล้เคียงร้อยละ 80 อีกครั้งก่อนทำการเพาะเลี้ยงขยายต่อจนถึงรุ่นที่ 3 (third passage) ก่อนเริ่มใช้ในการทดสอบ



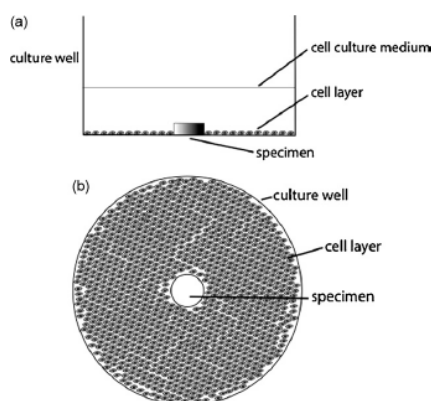
## 4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แบบสัมผัสโดยตรง

4.2.1 การเตรียมชิ้นทดสอบ ทำการเตรียมจำนวน 3 ชิ้นต่อกลุ่มทดสอบ โดยเป็นการทดสอบ 3 ครั้งโดยหยดลงในแม่แบบหลอดฉีดยาพลาสติกตัดขวางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร สูง 2 มิลลิเมตรจนเต็ม ปิดทับด้านบนด้วยกระจกปิดสไลด์ ฉายแสงด้วยเครื่องฉายแสงความเข้ม 400 มิลลิวัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 40 วินาที แกะชิ้นงานที่แข็งตัวแล้วออกจากแม่แบบ ทำการฆ่าเชื้อชิ้นวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินทดสอบทั้งหมดรวมถึงวัสดุกลุ่มควบคุมทั้งชนิดบวกและลบด้วยก๊าซเอทิลีนออกไซด์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมงและทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนเริ่มการทดสอบ วัสดุที่ใช้เปรียบเทียบกับได้แก่ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ปริมาณน้อยที่สุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์กับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวีสเกอร์ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดันและพีซีทเมทเอฟ-วัน โดยมีวัสดุควบคุมทางบวกคือ แผ่นยางซิงค์ไดเอทิลไดไทโอคาร์บาเมต (Zinc Diethyldithio-carbamate rubber; ZDEC) และวัสดุควบคุมทางลบคือ แผ่นพอลิเอทิลีนชนิดความหนาแน่นสูง (high-density polyethylene)

4.2.2 การเตรียมเซลล์เพื่อใช้ในการทดสอบ โดยทริปซิโนสเซลล์ออกจากฟลาสก์เลี้ยงเซลล์จากข้อ 4.1

### 4.2.3 การทดสอบ

4.2.3.1 การเตรียมเซลล์ในหลุม โดยหว่านเซลล์ที่ได้จากข้อ 4.1 ลงในหลุมจำนวน 30,000 เซลล์ต่อหลุมในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม เพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสโดยมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก วางชิ้นทดสอบแต่ละกลุ่มลงในหลุมๆละ 1 ชิ้นบนเซลล์ที่หว่านเพาะไว้แล้วดังแสดงในภาพที่ 27 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปล่อยให้วัสดุให้เกิดการสัมผัสกับเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในสภาวะเดิม โดยมีกลุ่มควบคุมการทดลองคือ กลุ่มที่ไม่ได้สัมผัสกับชิ้นทดสอบ



ภาพที่ 27 แสดงลักษณะการวางชั้นทดสอบในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยการสัมผัสตรง (a) ภาพแสดงด้านข้าง (b) ภาพแสดงด้านบน (Franz และคณะ, 2007)

4.2.3.2 เมื่อเวลาผ่านไป 23 ชั่วโมง ทำการบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ดูเนื้อเยื่อเพื่อประเมินลักษณะทางกายภาพของเซลล์ แล้วจึงดูอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมออกและเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ดัลเบคโคชนิดที่ 1 ไม่มีสารฟีนอลผสมกับสารเคมีที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ทำการเพาะเลี้ยงต่อจนครบกำหนด 24 ชั่วโมง

4.2.3.3 เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำการดูอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากหลุมจนหมด เติมตัวทำลายดีเอ็มเอสโอลงในแต่ละหลุมเพื่อละลายผลึกฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

4.2.3.4 คำนวณร้อยละอัตราการอยู่รอดของเซลล์โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนของกลุ่มควบคุมการทดลอง (ไม่ได้สัมผัสชั้นทดสอบ) จากสมการ

$$\text{ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{100 \times \text{ค่าการดูดกลืนที่ 570 นาโนเมตร ของเซลล์กลุ่มทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนที่ 570 นาโนเมตรของเซลล์กลุ่มควบคุม}}$$

4.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล กระทำโดยเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงภายหลังการสัมผัสจากภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์ดูเนื้อเยื่อด้วยวิธีบรรยายเชิงพรรณนา และทดสอบความแตกต่างอัตราการอยู่รอดของเซลล์ภายหลังการสัมผัสโดยตรงของวัสดุทดสอบด้วยวิธีการทางสถิติ ดังนี้

4.2.4.1 กรณีประชากรมีการแจกแจงปกติ จะทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวและทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างร้อยละ

อัตราการอยู่รอดในแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดเซฟเฟ กรณีนี้อาจมีความแตกต่างกันของความแปรปรวนจะทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างร้อยละอัตราการอยู่รอดในแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดทามเฮนส์

4.2.4.2 กรณีประชากรมีการแจกแจงไม่ปกติ จะทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติครัสคัลวัลลิส เอชและทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างร้อยละอัตราการอยู่รอดในแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบพหุคูณระหว่างกลุ่ม

### 4.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แบบสัมผัสโดยอ้อม

#### 4.3.1 เตรียมชั้นทดสอบตามวิธีการ 4.2.1

#### 4.3.2 เตรียมเซลล์เพื่อใช้ในการทดสอบตามวิธีการ 4.1

#### 4.3.3 การทดสอบ

4.3.3.1 การเตรียมเซลล์ในหลุม โดยหว่านเซลล์ที่ได้จาก 4.3.2 ลงในหลุมจำนวน 30,000 เซลล์ต่อหลุมในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม เพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในตู้บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

4.3.3.2 แช่ชิ้นวัสดุเคลือบหลุมร่องพื้นและวัสดุควบคุมทางบวกและลบกลุ่มละ 1 ชิ้นในหลอดทดลองชนิดเอฟเพนดอร์ฟที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หลังจากขั้นตอนการหว่านเซลล์ นำไปเก็บในตู้บอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดนี้จะเรียกว่า อาหารเลี้ยงเซลล์ทดสอบ (conditioned medium)

4.3.3.3 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุมที่หว่านเซลล์ไว้แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ทดสอบลงในจานเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์ที่หว่านไว้แล้วโดยมีกลุ่มควบคุมการทดลองคืออาหารเลี้ยงเซลล์ปกติที่ไม่ผ่านการสัมผัสกับชั้นทดสอบ ทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในตู้บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5

4.3.3.4 เมื่อผ่านไป 23 ชั่วโมง ทำการบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อประเมินลักษณะทางกายภาพของเซลล์แล้วจึงดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมออกและเปลี่ยนเป็น

อาหารเลี้ยงเซลล์ดัลเบคโคโมดิฟายด์อีเกิลชนิดที่ไม่มีสารฟีนอลเรดผสมกับสารเอมที่ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เพราะเลี้ยงต่อจนครบกำหนด 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากหลุมจนหมด เติมตัว ทำละลายดีเอมเอสไอเพื่อละลายผลึกฟอร์มazanที่เกิดขึ้น นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

4.3.3.5 คำนวณร้อยละอัตราการอยู่รอดของเซลล์โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนของกลุ่มควบคุมการทดลอง (อาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ) เช่นเดียวกับข้อ 4.2.3.4

4.3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล กระทำโดยเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงภายหลังการสัมผัสจากภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์ดูเนื้อเยื่อด้วยวิธีบรรยายเชิงพรรณนา และทดสอบความแตกต่างอัตราการอยู่รอดของเซลล์ภายหลังการสัมผัสโดยอ้อมของวัสดุทดสอบด้วยวิธีการทางสถิติ ดังนี้

4.3.4.1 กรณีประชากรมีการแจกแจงปกติ จะทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวและทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างร้อยละอัตราการอยู่รอดในแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดเซฟเฟ กรณีมีความแตกต่างกันของความแปรปรวนจะทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างร้อยละอัตราการอยู่รอดในแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดทามเฮนส์

4.3.4.2 กรณีประชากรมีการแจกแจงไม่ปกติ จะทำการวิเคราะห์ด้วยสถิติครัสคัลวัลลิส เอชและทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างร้อยละอัตราการอยู่รอดในแต่ละกลุ่มด้วยการเปรียบเทียบพหุคูณระหว่างกลุ่ม

### เกณฑ์เทียบระดับความคิดเห็น

การคำนวณทางสถิติจะกระทำด้วยโปรแกรมเอส พี เอส เอช เวอร์ชัน 13 (SPSS version 13) ด้วยระดับนัยสำคัญที่ p-value น้อยกว่า 0.05

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### ผลการศึกษา

##### 1.1 ผลการสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานวีลเกอร์

ภายหลังจากการนำเปลือกกุ้งผ่านกระบวนการกำจัดแร่ธาตุและโปรตีนทำให้ได้สารคอลลอยด์ไคตินวีลเกอร์ โดยสภาพความเป็นคอลลอยด์ดังกล่าวยังคงอยู่ภายหลังจากการดีอะเซทิเลชันเพื่อเปลี่ยนเป็นไคโตซานวีลเกอร์ภายในถุงเยื่อแผ่นกรองดังแสดงในภาพที่ 28

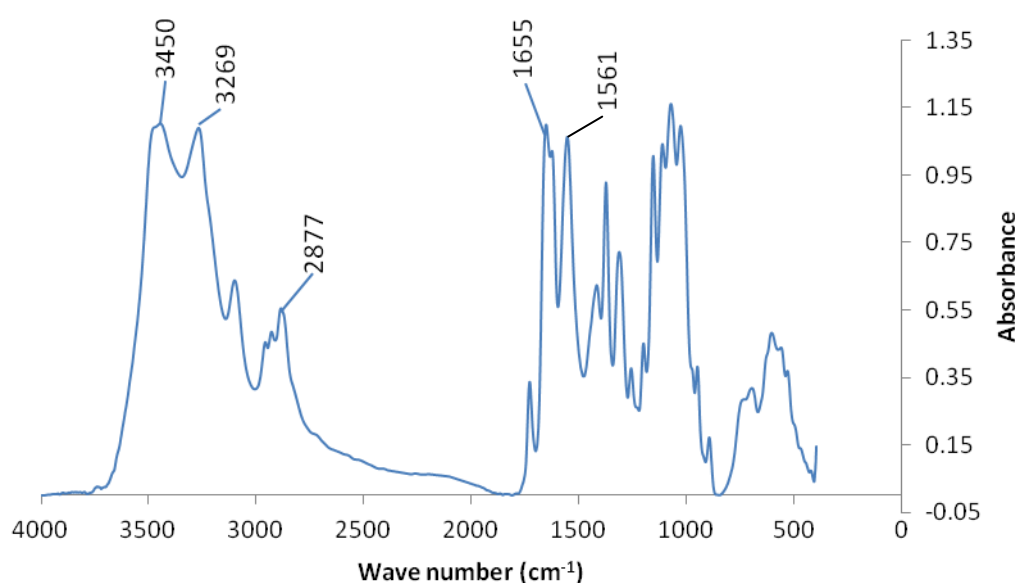


ภาพที่ 28 แสดงสารคอลลอยด์ไคตินวีลเกอร์ (ซ้าย) และสารคอลลอยด์ไคโตซานวีลเกอร์ (ขวา) ภายในถุงเยื่อแผ่นกรอง

## 1.2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์โคตินและโคโตซานวีสเกอร์

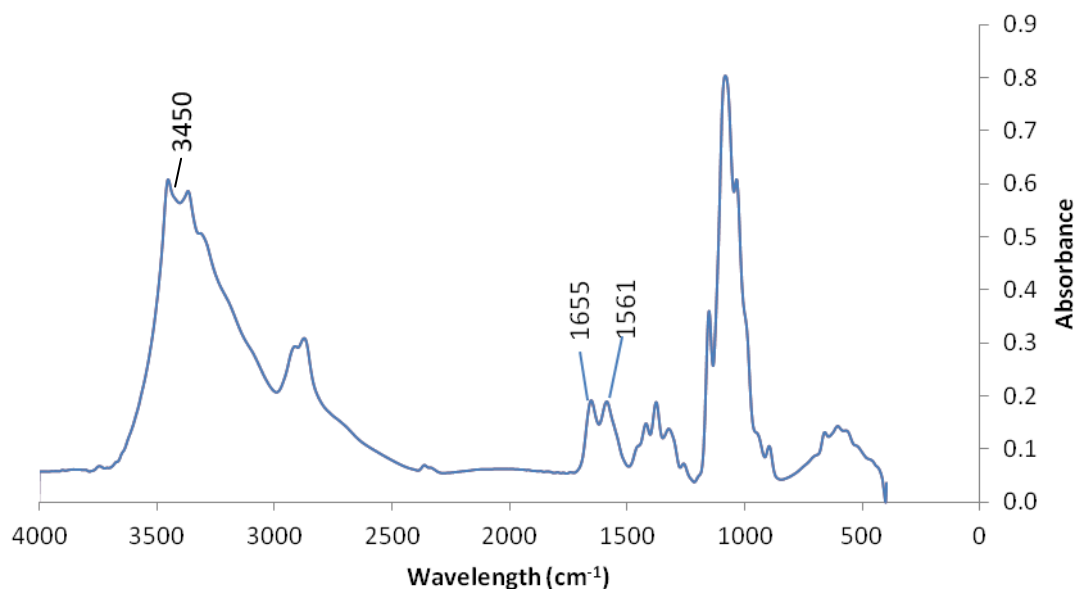
### 1.2.1 ผลการศึกษาค่าดีกรีออฟดีอะเซทิเลชันและโครงสร้างทางเคมีของโคตินและโคโตซานวีสเกอร์

ผลการศึกษาแถบสเปกตรัมอินฟราเรดของสารคอลลอยด์โคตินวีสเกอร์ (ภาพที่ 29) พบแถบการดูดกลืนอ้างอิงที่ความยาวคลื่น 3450 ต่อตารางเซนติเมตรซึ่งแสดงถึงหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิลและตรวจพบแถบการดูดกลืนตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 1655 ต่อตารางเซนติเมตรแสดงถึงหมู่ฟังก์ชันคาร์บอนิลและที่ความยาวคลื่น 1561 ต่อตารางเซนติเมตรแสดงถึงพันธะไนโตรเจนไฮโดรเจน ซึ่งการพบยอดกราฟสูงที่ความยาวคลื่นทั้งสองนี้แสดงถึงการมีหมู่ฟังก์ชันอะเซทาไมด์ (-CONH<sub>2</sub>) อยู่ในโครงสร้าง ค่าดีกรีออฟดีอะเซทิเลชันที่คำนวณจากสมการ(6) มีค่าร้อยละ 25



ภาพที่ 29 แสดงแถบสเปกตรัมอินฟราเรดของสารโคตินวีสเกอร์

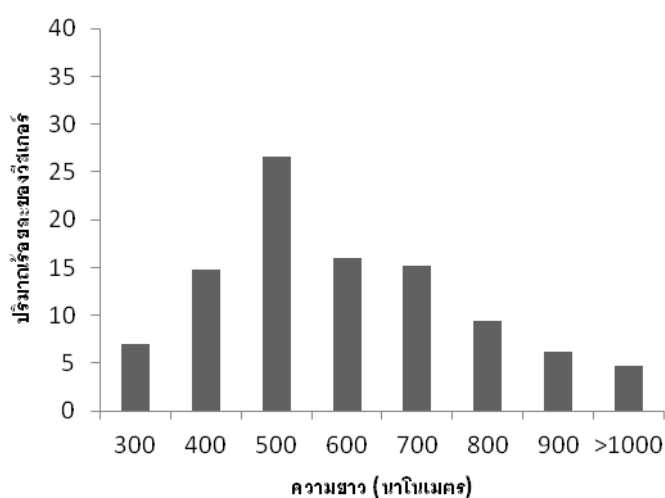
ผลการศึกษาระบบสเปกตรัมอินฟราเรดของสารคอลลอยด์ไคโตซานวีสเกอร์ (ภาพที่ 30) พบแถบการดูดกลืนอ้างอิงที่ความยาวคลื่น 3450 ต่อตารางเซนติเมตร แถบการดูดกลืนตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 1655 ต่อตารางเซนติเมตรและ 1561 ต่อเซนติเมตรซึ่งเป็นแถบการดูดกลืนของหมู่ฟังก์ชันอะเซทาไมด์ เมื่อเปรียบเทียบกับแถบสเปกตรัมของไคตินวีสเกอร์พบว่าแถบจากไคโตซานวีสเกอร์มีความสูงของแถบการดูดกลืนตรวจสอบทั้งสองลดลงอย่างเด่นชัดภายหลังจากกระบวนการดีอะเซทิเลชัน การคำนวณค่าดีกรีออฟดีอะเซทิเลชันของสารไคโตซานวีสเกอร์มีค่าร้อยละ 73.58



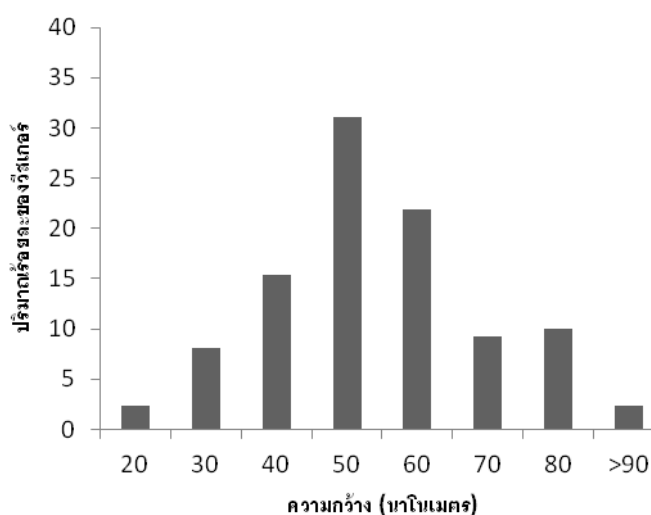
ภาพที่ 30 แสดงแถบสเปกตรัมอินฟราเรดของสารไคโตซานวีสเกอร์

### 1.2.2 ผลการศึกษาขนาด รูปร่างและการกระจายตัวของโคโตซานวิสเกอร์

ผลการศึกษาขนาดของวิสเกอร์พบว่า โคโตซานวิสเกอร์มีความยาวอยู่ในช่วง 328 ถึง 965 นาโนเมตรโดยมีความยาวเฉลี่ย 648 นาโนเมตร (ภาพที่ 31) สำหรับความกว้างอยู่ในช่วง 20 ถึง 87 นาโนเมตรโดยมีความกว้างเฉลี่ย 59 นาโนเมตร (ภาพที่ 32) โดยมีค่าอัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง (aspect ratio) เท่ากับ 10.98



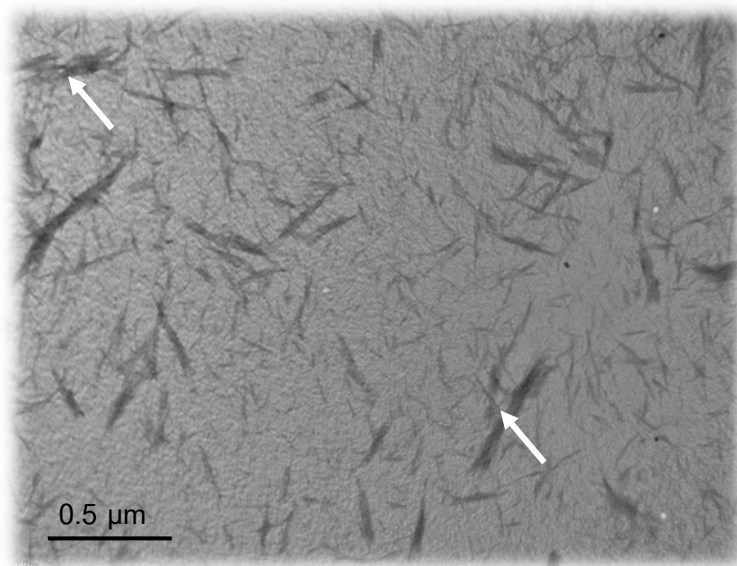
ภาพที่ 31 แสดงแผนภูมิความยาวโดยเฉลี่ยระดับนาโนเมตรของโคโตซานวิสเกอร์



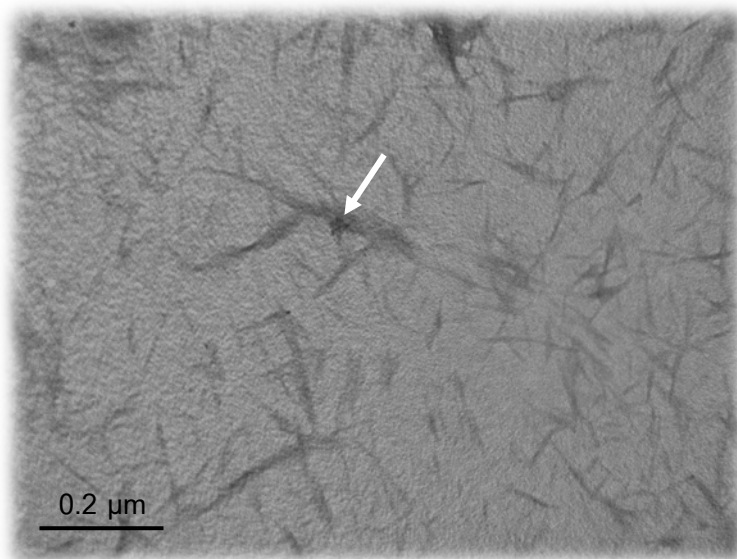
ภาพที่ 32 แสดงแผนภูมิความกว้างโดยเฉลี่ยระดับนาโนเมตรของโคโตซานวิสเกอร์



ผลการศึกษารูปร่างและการกระจายตัวของโคโตซานวิสเกอร์พบว่า วิสเกอร์มีลักษณะเป็นเส้นใยสั้นรูปร่างกระสวย กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในสารคอลลอยด์โดยพบการเกาะรวมกลุ่มกันของเส้นใยบางส่วนดังแสดงในภาพที่ 33 และ 34



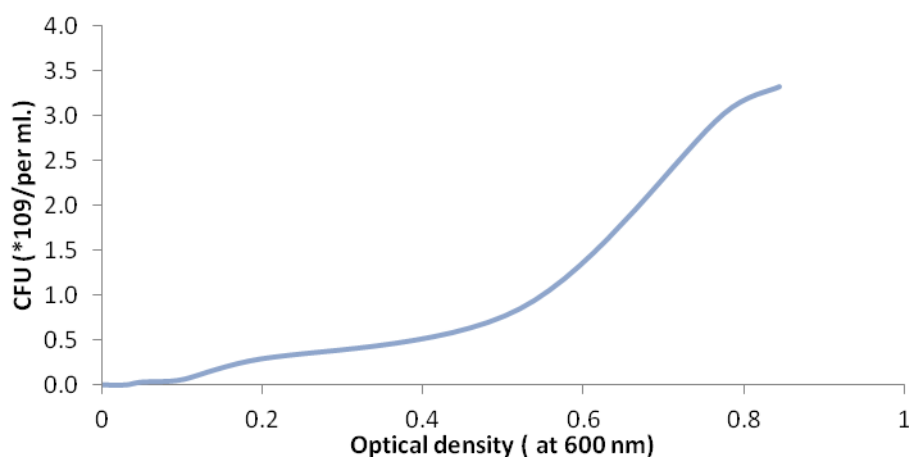
ภาพที่ 33 แสดงลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของเส้นใยโคโตซานวิสเกอร์ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า (ลูกศร แสดงการเกาะกลุ่มของวิสเกอร์บางโมเลกุล)



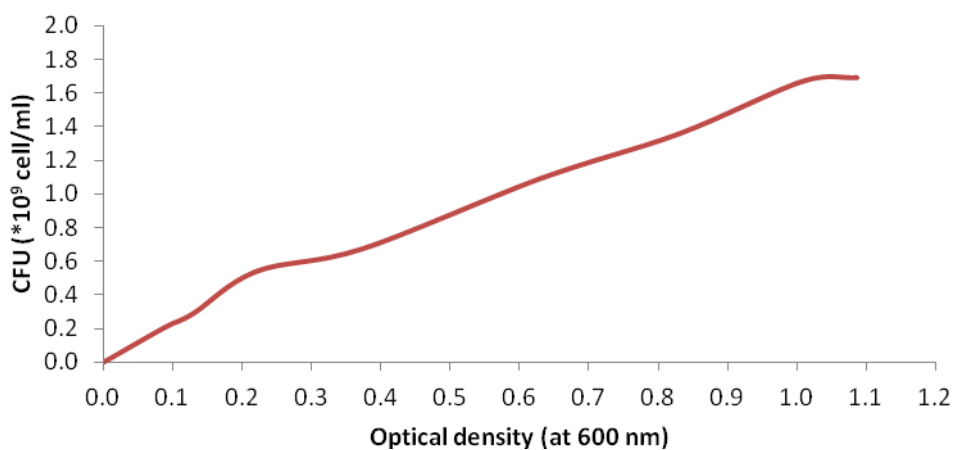
ภาพที่ 34 แสดงลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของเส้นใยโคโตซานวิสเกอร์ที่กำลังขยาย 25,000 เท่า (ลูกศร แสดงการเกาะกลุ่มของวิสเกอร์บางโมเลกุล)

## 2.1 ผลการสร้างกราฟมาตรฐานของแบคทีเรียในการศึกษา

ผลการศึกษาค่าความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่วัดค่าการดูดกลืนแสงต่างๆกันของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์แสดงในภาพที่ 35 และเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอีแสดงในภาพที่ 36 การศึกษาครั้งนี้เลือกค่าการดูดกลืนแสงในช่วง  $0.5 \pm 0.05$  ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียอยู่ในช่วง  $5 \times 10^8$  และ  $8 \times 10^8$  ตามลำดับตลอดทั้งการศึกษา



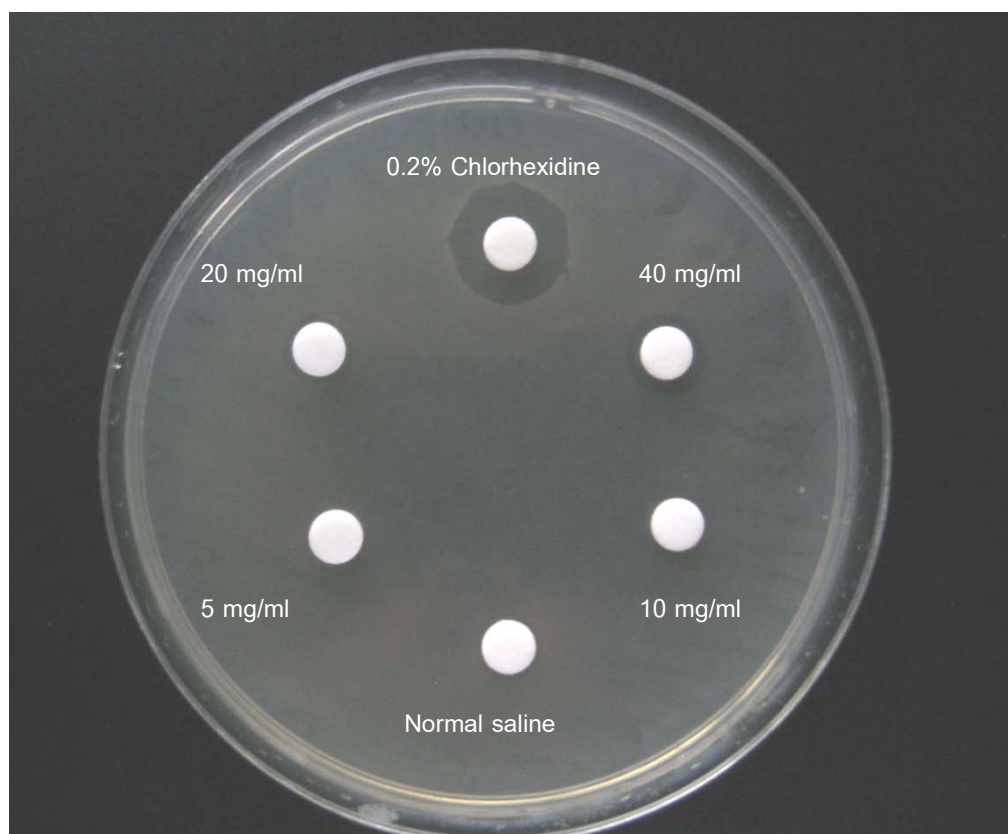
ภาพที่ 35 แสดงเส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์



ภาพที่ 36 แสดงเส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอี

2.2 ผลการทดสอบสมบัติต้านจุลชีพของสารคอลลอยด์ไคโตซานวีสเกอร์จากการสัมผัสด้วยวิธีการวัดความกว้างของแถบการยับยั้ง

ผลการศึกษาแถบการยับยั้งต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์พบว่า สารคอลเฮกซิดีนร้อยละ 0.2 สารไคโตซานวีสเกอร์ความเข้มข้น 40 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรทำให้เกิดแถบการยับยั้งที่มีความกว้างเฉลี่ย 3.63, 2.06 และ 1.26 มิลลิเมตรตามลำดับ ขณะที่ไม่พบแถบการยับยั้งโดยรอบสารละลายน้ำเกลือ สารไคโตซานวีสเกอร์ความเข้มข้น 10 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรดังแสดงในภาพที่ 37 และ 38



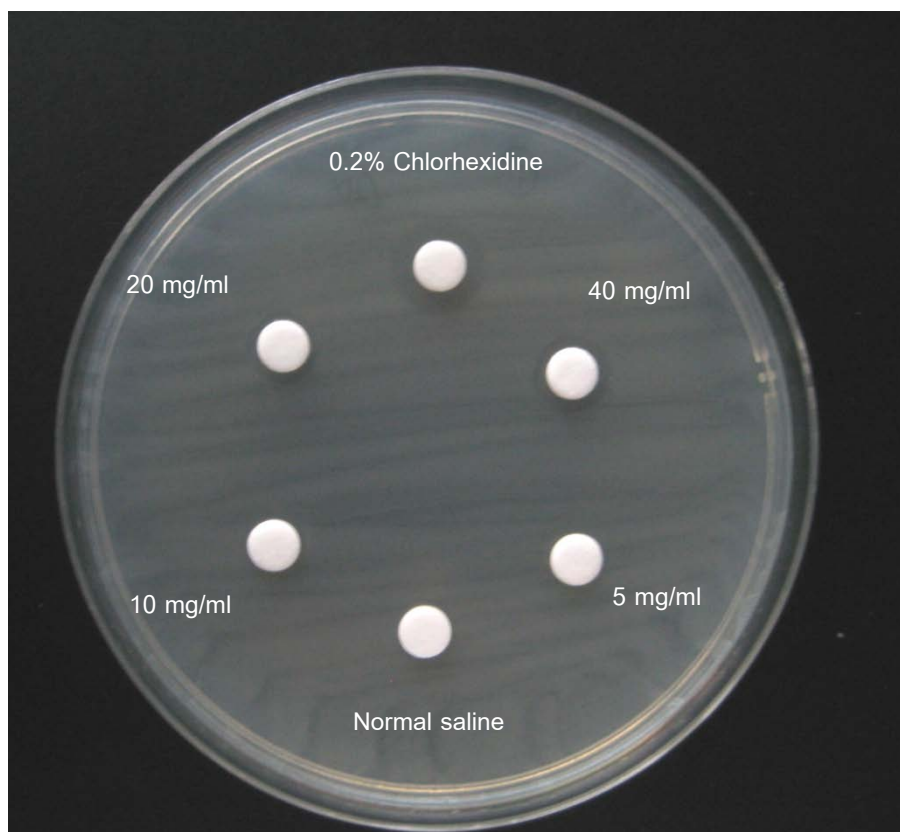
ภาพที่ 37 แสดงภาพรวมแถบการยับยั้งของไคโตซานวีสเกอร์ความเข้มข้นโดยน้ำหนักต่างกันและวัสดุควบคุมต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์



ภาพที่ 38 แสดงแถบการยับยั้งของไคลโตซานวีสเกอร์แต่ละความเข้มข้นโดยน้ำหนักและวัสดุควบคุมต่อ เชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์

ผลการศึกษาแถบการยับยั้งต่อเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิพบว่าสารคลอเฮกซิดีนร้อยละ 0.2 สารไคลโตซานวีสเกอร์ความเข้มข้น 40, 20 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรทำให้เกิดแถบการ

ยับยั้งที่มีความกว้างเฉลี่ย 3.46, 1.42, 1.12 และ 0.57 มิลลิเมตรตามลำดับ ขณะที่ไม่พบแถบการยับยั้งโดยรอบสารละลายน้ำเกลือ สารโคโตซานวีสเกอร์ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 39 และ 40)



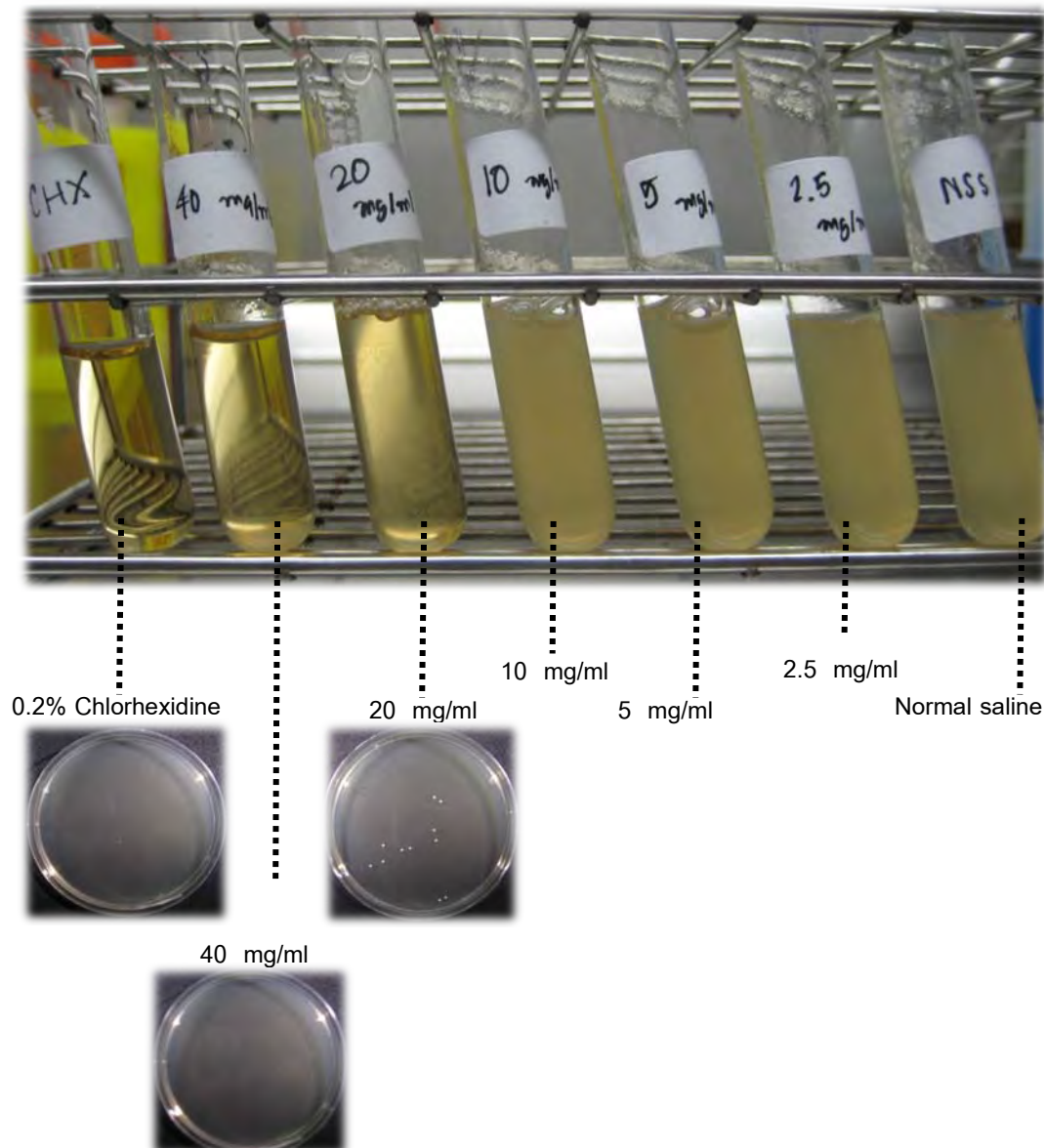
ภาพที่ 39 แสดงภาพรวมแถบการยับยั้งของโคโตซานวีสเกอร์ความเข้มข้นโดยน้ำหนักต่างกันและวัสดุควบคุมต่อเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอี



ภาพที่ 40 แสดงแถบการยับยั้งของโคโตซานวีสเกอร์แต่ละความเข้มข้นโดยน้ำหนักและวัสดุควบคุมต่อ  
เชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิ

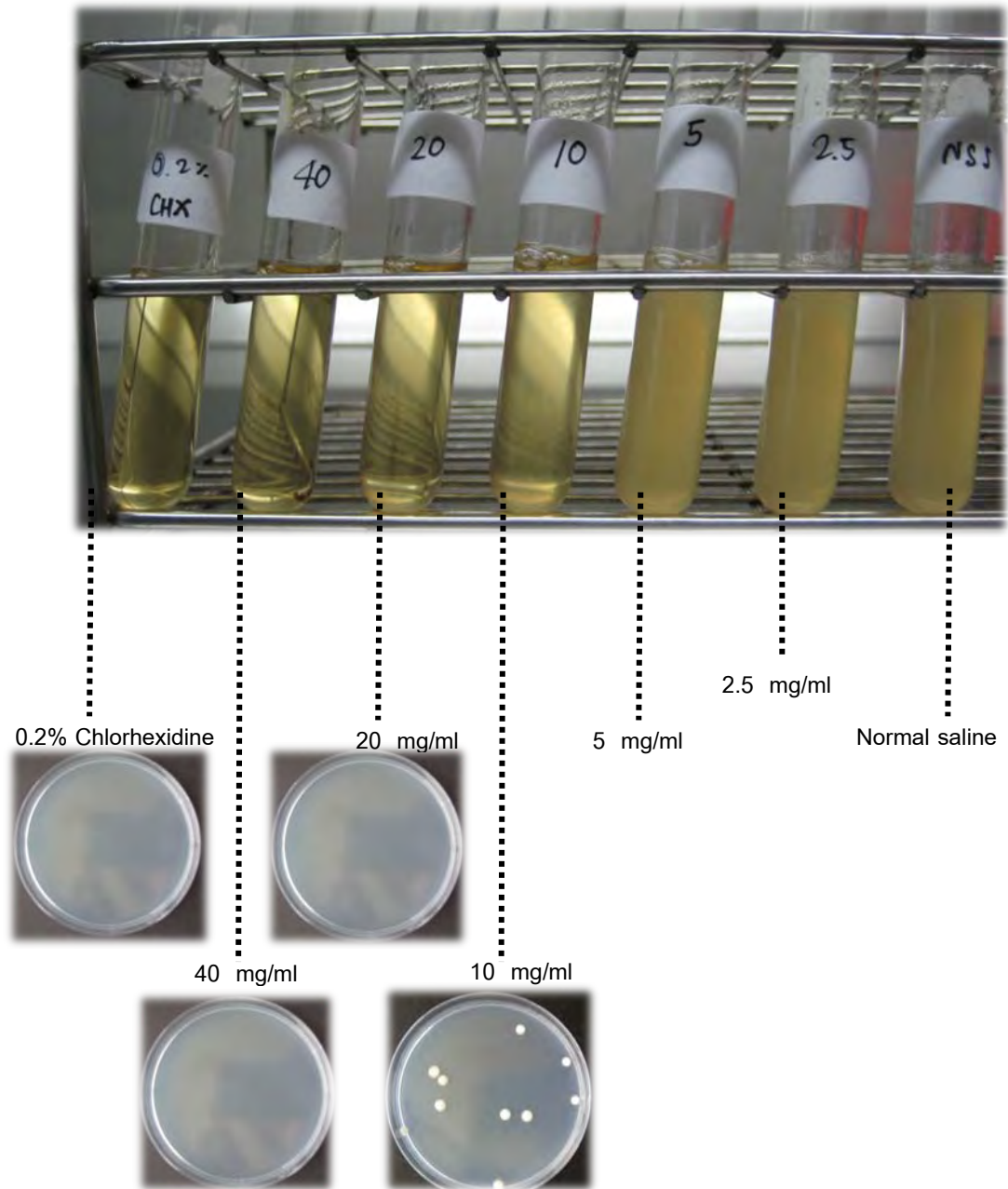
2.3 ผลการตรวจหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) และ MBC (Minimum Bactericidal Concentration) ของสารคอลลอยด์ไคโตซานวีส์เกอร์

ผลการตรวจสอบค่า MIC และ MBC ของไคโตซานวีส์เกอร์ต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัสมีวแทนส์พบว่ามีค่าเท่ากับ 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 41



ภาพที่ 41 แสดงความขุ่นของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อสเตรปโตคอคคัส มีวแทนส์

ผลการตรวจสอบค่า MIC และ MBC ของไคโตซานวีสเกอร์ต่อเชื้อแลคโตบาซิล ลัสคาเซียพบว่ามีความเท่ากับ 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 42)

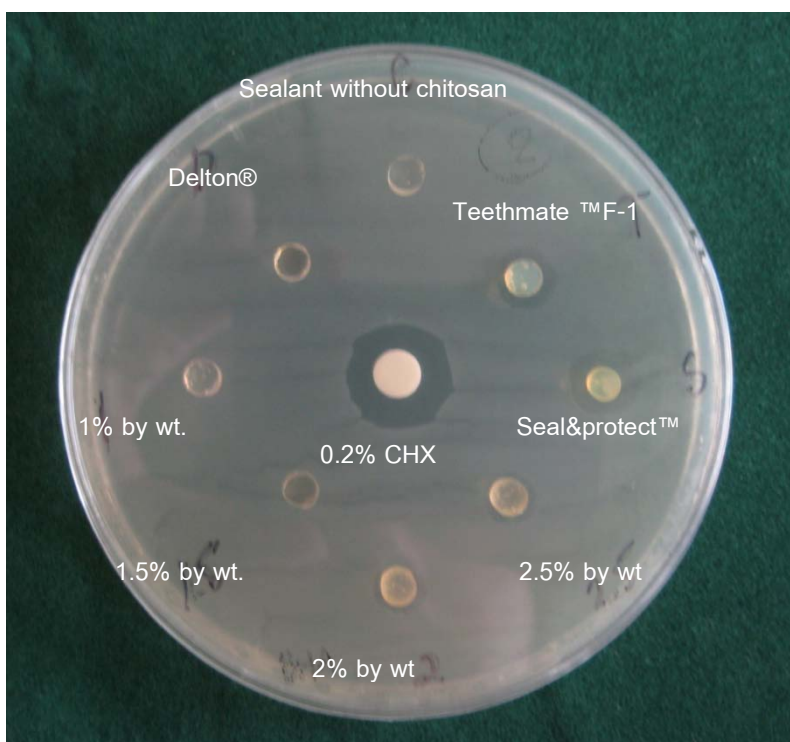


ภาพที่ 42 แสดงความขุ่นของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซีย

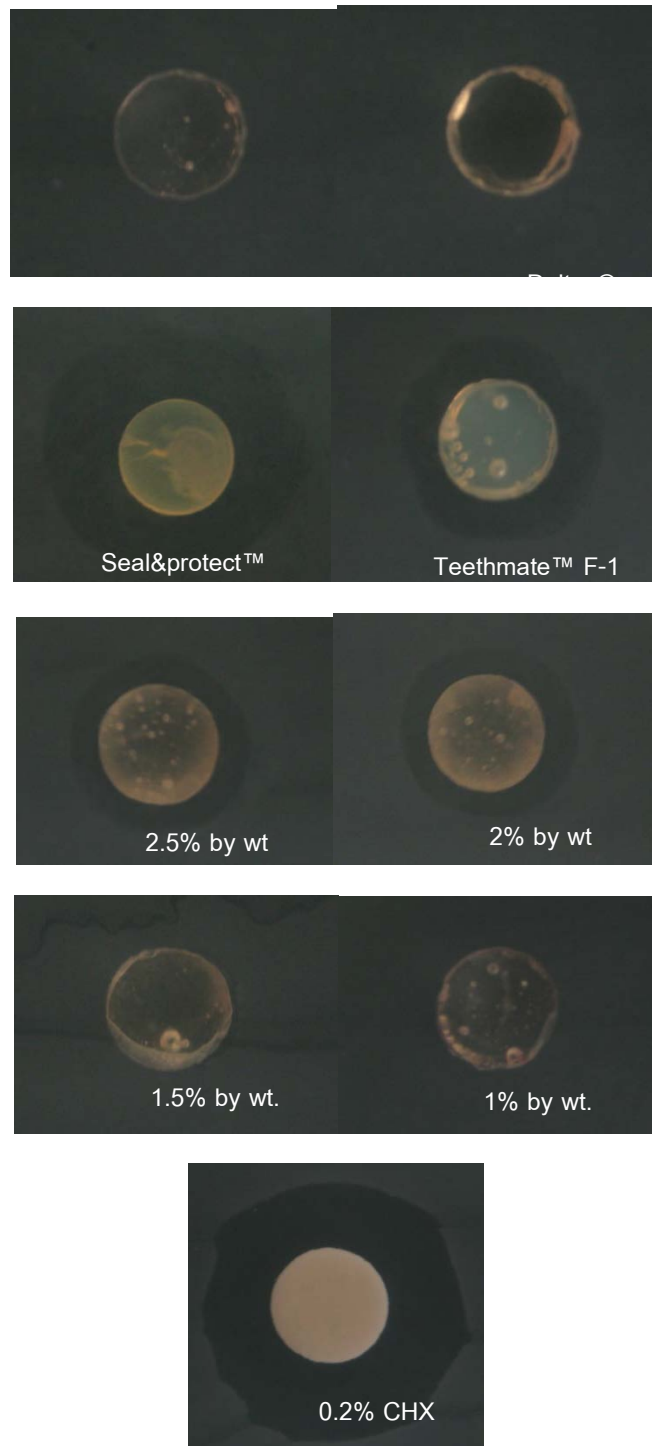


#### 2.4 ผลการทดสอบสมบัติต้านจุลชีพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคไโตซาน วีสเกอร์จากการสัมผัสด้วยวิธีการวัดความกว้างของแถบการยับยั้ง

ผลการศึกษาแถบการยับยั้งของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินเสริมโคไโตซานวีสเกอร์ต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์พบว่า สารบอนด์ยี่ห่อซีลแอนด์โพเททท์และวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห่อที่ซัทเมทเอฟ-วันมีความกว้างของแถบการยับยั้งโดยเฉลี่ย 3.52 และ 2.28 มิลลิเมตรตามลำดับ โดยที่วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคไโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2.5 และ 2 โดยน้ำหนักทำให้เกิดแถบการยับยั้งโดยรอบวัสดุขนาดกว้างเฉลี่ย 1.24 และ 1.15 มิลลิเมตรตามลำดับ ทั้งนี้วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคไโตซานวีสเกอร์ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคไโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 1.5 และ 1 โดยน้ำหนักและวัสดุยี่ห่อเดลดันไม่พบแถบการยับยั้งดังแสดงในภาพที่ 43 และ 44

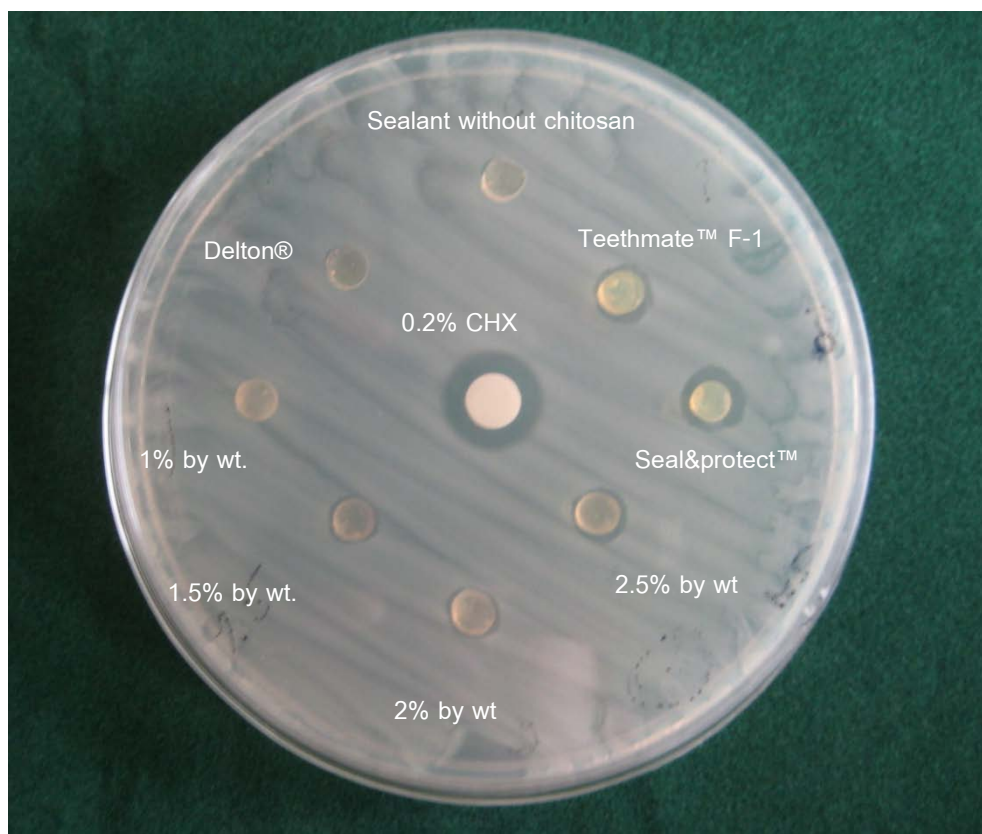


ภาพที่ 43 แสดงภาพรวมแถบการยับยั้งของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันกลุ่มทดสอบ กลุ่มควบคุมและกลุ่มเปรียบเทียบของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์

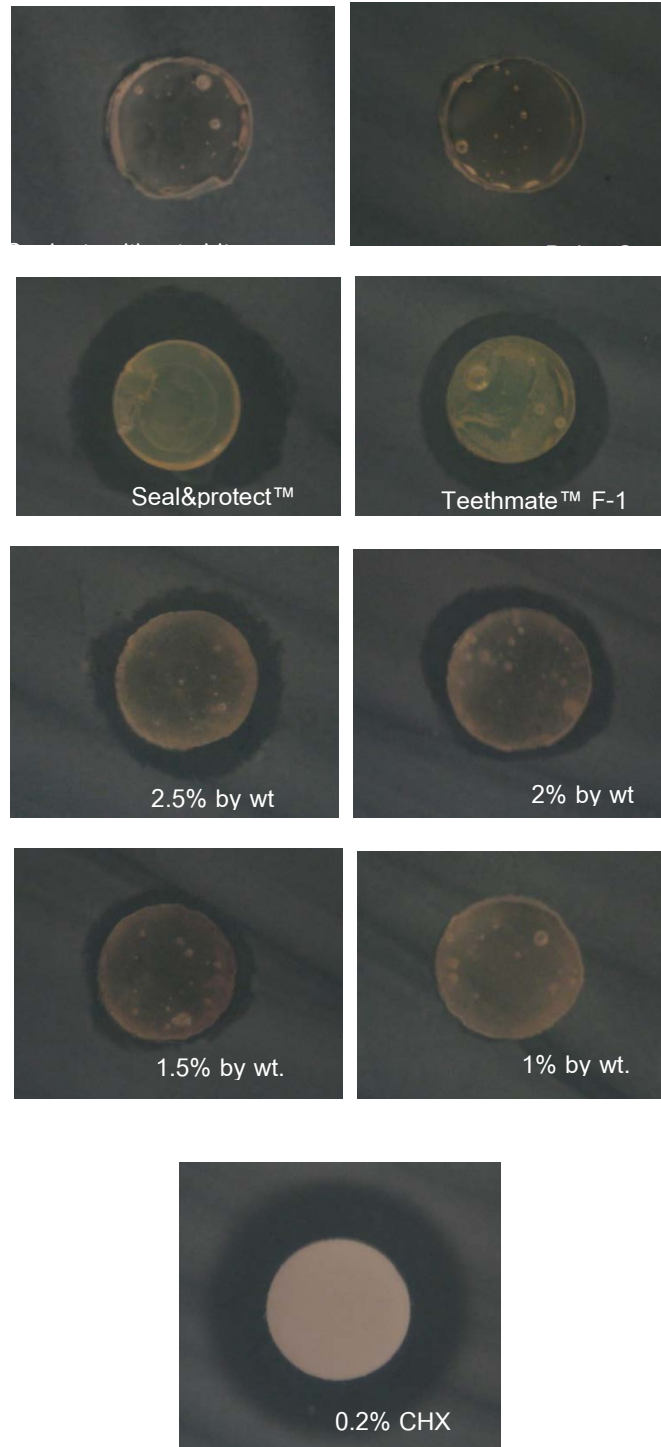


ภาพที่ 44 แสดงแถบการยับยั้งของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันแต่ละกลุ่มทดสอบ กลุ่มควบคุมและกลุ่มเปรียบเทียบของซีลแลนท์ไฮดรอกซีฟิลเลอร์ ไมวแทนด์

ผลการศึกษาระบบการยับยั้งของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินเสริมโคโตซาน วีสเกอร์ต่อเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอพิพบว่า สารบอนด์ยี่ห่อซีลแอนดีโพรเทกท์และวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห่อที่ซัทเมทเอฟ-วันมีความกว้างของแถบการยับยั้งโดยเฉลี่ย 2.96 และ 1.74 มิลลิเมตรตามลำดับโดยที่วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2.5, 2 และ 1.5 โดยน้ำหนักทำให้เกิดแถบการยับยั้งโดยรอบวัสดุขนาดกว้างเฉลี่ย 1.52, 1.47 และ 1.18 มิลลิเมตรตามลำดับ ทั้งนี้วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวีสเกอร์ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักและวัสดุยี่ห่อเดลดันไม่พบแถบการยับยั้งดังแสดงในภาพที่ 45 และ 46



ภาพที่ 45 แสดงภาพรวมแถบการยับยั้งของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันกลุ่มทดสอบ กลุ่มควบคุมและกลุ่มเปรียบเทียบของเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอ



ภาพที่ 46 แสดงแถบการยับยั้งของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันแต่ละกลุ่มทดสอบ กลุ่มควบคุมและกลุ่มเปรียบเทียบของซีแลคโตบาซิลลัส คาเซอี

2.5 ผลการทดสอบสมบัติต้านจุลชีพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซาน วิสเกอร์ด้วยวิธีการนับโคโลนีและการคำนวณอัตราการลดลงของเชื้อ

ผลการศึกษาอัตราการลดลงของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์ภายหลังการสัมผัสชิ้นงาน 12 ชั่วโมงพบว่า สารบอนด์ซีลแอนทีโพรเทกท์ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อที่ซิทเมทเอฟ-วัน วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2.5 และ 2 โดยน้ำหนักสามารถลดจำนวนโคโลนีของเชื้อได้ร้อยละ 83.09, 76.84, 75.97 และ 72.23 มากกว่าวัสดุกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยและความแตกต่างทางสถิติของอัตราการลดลงของเชื้อสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

	อัตราการลดลงของเชื้อ สเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์	13.7122 (2.9179) <sup>a</sup>
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน	25.8731 (3.7998) <sup>b</sup>
สารบอนด์ยี่ห้อซีลแอนทีโพรเทกท์	83.0893 (0.6953) <sup>e</sup>
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อที่ซิทเมทเอฟ-วัน	76.8449 (0.2528) <sup>e</sup>
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2.5	75.9705 (0.5481) <sup>d,e</sup>
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2	72.2256 (0.5474) <sup>d</sup>
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 1.5	39.2341 (3.6741) <sup>c</sup>
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 1	31.2200 (4.6558) <sup>b,c</sup>

\* อักษรตัวยกที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

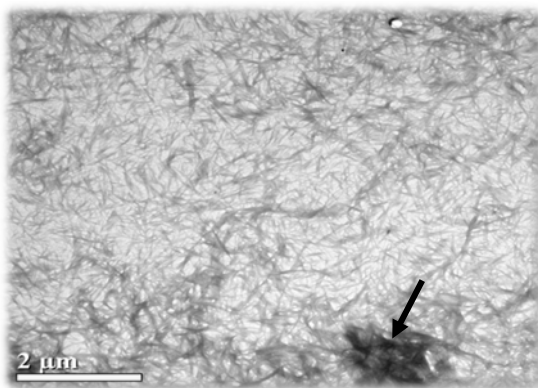
ผลการศึกษ้อัตราลดลงของเชื้อต่อเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอีภายหลังการสัมผัส  
ชิ้นงาน 12 ชั่วโมงพบว่าสารบอนด์ซีลแอนทีโพรเทกท์ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อที่ซัทเมทเอฟ-วัน  
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2.5, 2 และ 1.5 โดยน้ำหนักสามารถลดจำนวน  
โคโลนีของเชื้อได้ร้อยละ 90.38, 89.59, 87.71, 83.84 และ 78.63 มากกว่าวัสดุกลุ่มอื่นอย่างมี  
นัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยและความแตกต่างทางสถิติของอัตราการลดลงของเชื้อแลคโตบาซิลลัส คา  
เซอี

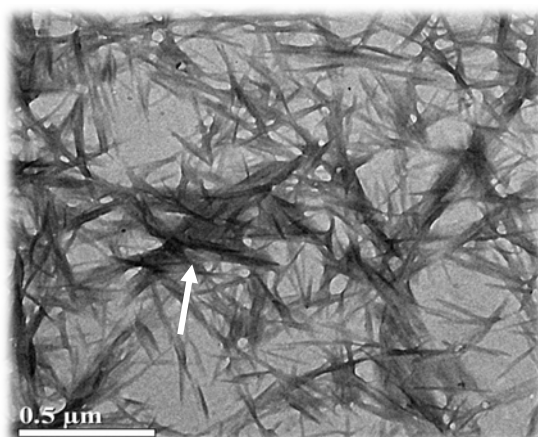
	อัตราการลดลงของเชื้อ แลคโตบาซิลลัส คาเซอี
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวีสเกอร์	23.6118 (1.9229) <sup>b</sup>
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลตัน	15.7044 (1.5027) <sup>a</sup>
สารบอนด์ยี่ห้อซีลแอนทีโพรเทกท์	90.3773 (1.6063) <sup>d</sup>
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อซัทเมทเอฟ-วัน	89.5879 (0.7175) <sup>d</sup>
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2.5	87.7078 (1.7841) <sup>d</sup>
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2	83.8386 (2.6849) <sup>c,d</sup>
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 1.5	78.6267 (3.5468) <sup>c</sup>
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 1	24.6319 (2.7974) <sup>b</sup>

\* อักษรตัวยกที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ภายหลังการศึกษาสมบัติด้านจุลชีพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซาน วิสเกอร์ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งสองที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้พบว่า โคโตซานวิสเกอร์อย่างน้อยร้อยละ 2 โดยน้ำหนักมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์โดยทำให้เกิดแถบการยับยั้งโดยรอบวัสดุและลดจำนวนเชื้อทั้งสองลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงเลือกวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักในการศึกษาการกระจายตัวของวิสเกอร์ในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันและทำการศึกษาในส่วนต่อไป โดยผลการศึกษาการกระจายในวัสดุพบว่า โคโตซานวิสเกอร์ยังคงมีรูปร่างกระสวยคล้ายคลึงรูปร่างเดิมก่อนที่จะผสมลงในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินโดยพบการเกาะกลุ่มและการกระจุกตัวของเส้นใยในบางตำแหน่ง (ลูกศรชี้) ดังแสดงในภาพที่ 47 และ 48



ภาพที่ 47 แสดงลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินที่กำลังขยาย 2,000 เท่า (ลูกศร แสดงการเกาะกลุ่มของวิสเกอร์)



ภาพที่ 48 แสดงลักษณะรูปร่างและการกระจายตัวของโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินที่กำลังขยาย 8,000 เท่า (ลูกศร แสดงการเกาะกลุ่มของวิสเกอร์)

### 3.1 ผลการศึกษาความลึกของการแข็งตัว

ผลการศึกษาพบว่า วัสดุทุกกลุ่มผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานสากล (มากกว่า 1.5 มิลลิเมตร) โดยวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก มีค่าเฉลี่ยความลึกของการแข็งตัว (5.8275 มิลลิเมตร) ต่ำกว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์ (5.9182 มิลลิเมตร) ทั้งนี้เมื่อทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยค่าสถิติแบบ อโนวาเปรียบเทียบกับวัสดุกลุ่มเปรียบเทียบยี่ห้ออื่นพบว่า วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักและวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่มีค่ามากกว่าวัสดุกลุ่มเปรียบเทียบยี่ห้อเดลดันและที่ซัทเมทเอฟ-วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (การทดสอบชนิดเซฟเฟ)

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความลึกของการแข็งตัว (จำนวน 10 ชิ้นตัวอย่างต่อกลุ่มทดสอบ)

	ค่าเฉลี่ย (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) (มิลลิเมตร)
วัสดุไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์	5.9182 <sup>a</sup> (0.0574)
วัสดุเสริมโคโตซานวิสเกอร์ ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก	5.8275 <sup>a</sup> (0.0881)
วัสดุยี่ห้อเดลดัน	3.8384 <sup>b</sup> (0.1027)
วัสดุยี่ห้อที่ซัทเมทเอฟ-วัน	4.4802 <sup>c</sup> (0.1760)

\* อักษรตัวยกที่ต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95



### 3.2 ผลการศึกษาการดูดซับน้ำและการละลายตัว

ผลการศึกษาการดูดซับน้ำของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2 จำนวน 4 ใน 5 ซึ่ในตัวอย่างมีค่าน้อยกว่า 50 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรซึ่งผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานสากล โดยมีค่าเฉลี่ยการดูดซับน้ำเท่ากับ 48.2569 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรมากกว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวีสเกอร์ที่มีค่าเท่ากับ 33.7784 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยค่าสถิติแบบอโนวาชนิดเซฟเฟ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันทุกกลุ่มพบว่า ค่าเฉลี่ยการดูดซับน้ำของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน และทีชท์เมทเอฟ-วันมีค่ามากกว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวีสเกอร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอโนวาชนิดเซฟเฟ

ผลการศึกษาการละลายตัวของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2 พบว่ามีเพียงจำนวน 1 ใน 5 ซึ่ในตัวอย่างที่มีค่าน้อยกว่า 7.5 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรซึ่งไม่ผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานสากล โดยมีค่าเฉลี่ยการละลายตัวสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานเล็กน้อย (น้อยกว่า 7.5 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวีสเกอร์และวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน แต่มีค่าสูงกว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อทีชท์เมทเอฟ-วันด้วยค่าสถิติแบบอโนวาชนิดเซฟเฟ

ตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าการดูดซับน้ำและการละลายตัว (จำนวน 5 ซึ่ในตัวอย่างต่อกลุ่มทดสอบ)

	ค่าเฉลี่ยการดูดซับน้ำ (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) (ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร)	ค่าเฉลี่ยการละลายตัว (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) (ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร)
วัสดุไม่เสริมโคโตซานวีสเกอร์	33.7784 <sup>a</sup> (2.4299)	7.3158 <sup>a</sup> (0.3588)
วัสดุเสริมโคโตซานวีสเกอร์ ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก	48.2569 <sup>b</sup> (3.6034)	7.5972 <sup>a</sup> (0.4976)
วัสดุยี่ห้อเดลดัน	44.0665 <sup>b</sup> (5.7029)	7.3210 <sup>a</sup> (0.8562)
วัสดุยี่ห้อทีชท์เมทเอฟ-วัน	44.3080 <sup>b</sup> (1.8513)	3.6569 <sup>b</sup> (0.5111)

\* อักษรตัวยกที่ต่างกัันแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

### 3.3 ผลการศึกษาความแข็งผิววิกเกอร์ส

ผลการศึกษาพบว่า วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก มีค่าเฉลี่ยความแข็งผิววิกเกอร์สต่ำที่สุด (15.3210) เมื่อเทียบกับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์ (18.2300) วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลตัน (16.8480) และทีชท์เมทเอฟ-วัน (17.1350) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธีการทางสถิติแบบบโนวาชนิดตามแผนสหพบว่า วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักมีค่าเฉลี่ยน้อยกว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันกลุ่มเปรียบเทียบยี่ห้ออื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความแข็งผิววิกเกอร์ส (จำนวน 10 ซีนตัวอย่างต่อกลุ่มทดสอบ)

	ค่าเฉลี่ย (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) (VHN)
วัสดุไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์	18.2300 <sup>a</sup> (0.8535)
วัสดุเสริมโคโนซานวิสเกอร์ ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก	15.3210 <sup>b</sup> (0.4461)
วัสดุยี่ห้อเดลตัน	16.8480 <sup>c</sup> (0.4372)
วัสดุยี่ห้อทีชท์เมทเอฟ-วัน	17.1350 <sup>c</sup> (0.3302)

\* อักษรตัวยกที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

### 3.4 ผลการศึกษาอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่

ผลการศึกษาพบว่า วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักมีค่าเฉลี่ยอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่เท่ากับ 57.60 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยค่าสถิติโนวาซนิตเซฟกับวัสดุกลุ่มอื่นพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวีสเกอร์โดยมีค่ามากกว่าวัสดุยี่ห้อที่ซัทเมทเอฟ-วันและน้อยกว่าวัสดุยี่ห้อเดลตันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ (จำนวน 5 คู่ขึ้นตัวอย่างต่อกลุ่มทดสอบ)

	ค่าเฉลี่ยอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ (ร้อยละ)
วัสดุไม่เสริมโคโตซานวีสเกอร์	60.27 <sup>a</sup> (1.8314)
วัสดุเสริมโคโตซานวีสเกอร์ ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก	57.60 <sup>a</sup> (1.7163)
วัสดุยี่ห้อเดลตัน	71.91 <sup>b</sup> (2.1587)
วัสดุยี่ห้อที่ซัทเมทเอฟ-วัน	46.63 <sup>c</sup> (1.5364)

\* อักษรตัวยกที่ต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

### 3.5 ผลการศึกษาความหนืด

ผลการศึกษาพบว่า วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก มีค่าเฉลี่ยความหนืดเท่ากับ 1216 เซนติปอยส์ โดยมีค่ามากกว่าค่าเฉลี่ยของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์ (358 เซนติปอยส์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธีการอินดิเพนเดนทีแซมเปิลที-เทส ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าความหนืด (เซนติปอยส์) (จำนวน 10 ซีนตัวอย่างต่อกลุ่มทดสอบ)

	ค่าเฉลี่ย (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) (เซนติปอยส์)
วัสดุไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์ชนิดใส	358 <sup>a</sup> (25.734)
วัสดุเสริมโคโนซานวิสเกอร์ ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก	1216 <sup>b</sup> (29.515s)

\* อักษรตัวยกที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

### 3.6 ผลการศึกษาในระดับการรับรู้ซ้ำตามขอบ

ผลการศึกษาในการจำแนกระดับการรับรู้ซ้ำตามขอบพบว่า วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันแต่ละชนิดมีการรับรู้ซ้ำในแต่ละระดับใกล้เคียงกันโดยวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์มีระดับการรับรู้ซ้ำส่วนใหญ่อยู่ในระดับ 1 สำหรับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์ส่วนใหญ่ไม่พบการรับรู้ซ้ำ (ระดับ 0) ใกล้เคียงกับการพบระดับการรับรู้ซ้ำมากที่สุด (ระดับ 3) เช่นกันดังแสดงในตารางที่ 11 เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธีการทางสถิติด้วยวิธีไคสแควร์พบว่า ระดับการรับรู้ซ้ำตามขอบไม่ขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน

สำหรับผลการศึกษาค่าเฉลี่ยระดับการรับรู้ซ้ำตามขอบของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันทั้งสองชนิดไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแบบแมน-วิทนีย์ ยู (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 11 แสดงคลอสแทป (crosstab) ระหว่างระดับการรับรู้ซ้ำตามขอบและชนิดของวัสดุ

		ระดับการรับรู้ซ้ำตามขอบ				รวม
		ระดับ 0	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3	
ชนิดวัสดุ	วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก	7 (21.9%)	12 (37.5%)	5 (15.6%)	8 (25.0%)	32
	วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์	14 (40.0%)	7 (20.0%)	2 (5.7%)	12 (34.3%)	35
รวม (ในกลุ่มชนิดวัสดุ)		21	19	7	20	67

ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับการรับรู้ซ้ำตามขอบด้วยสถิติวิธีแมน-วิทนีย์ ยู

	ค่าเฉลี่ยระดับการรับรู้ซ้ำตามขอบ
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก	1.44 <sup>a</sup>
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์	1.34 <sup>a</sup>

\* อักษรตัวยกที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

#### 4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แบบสัมผัสโดยตรง

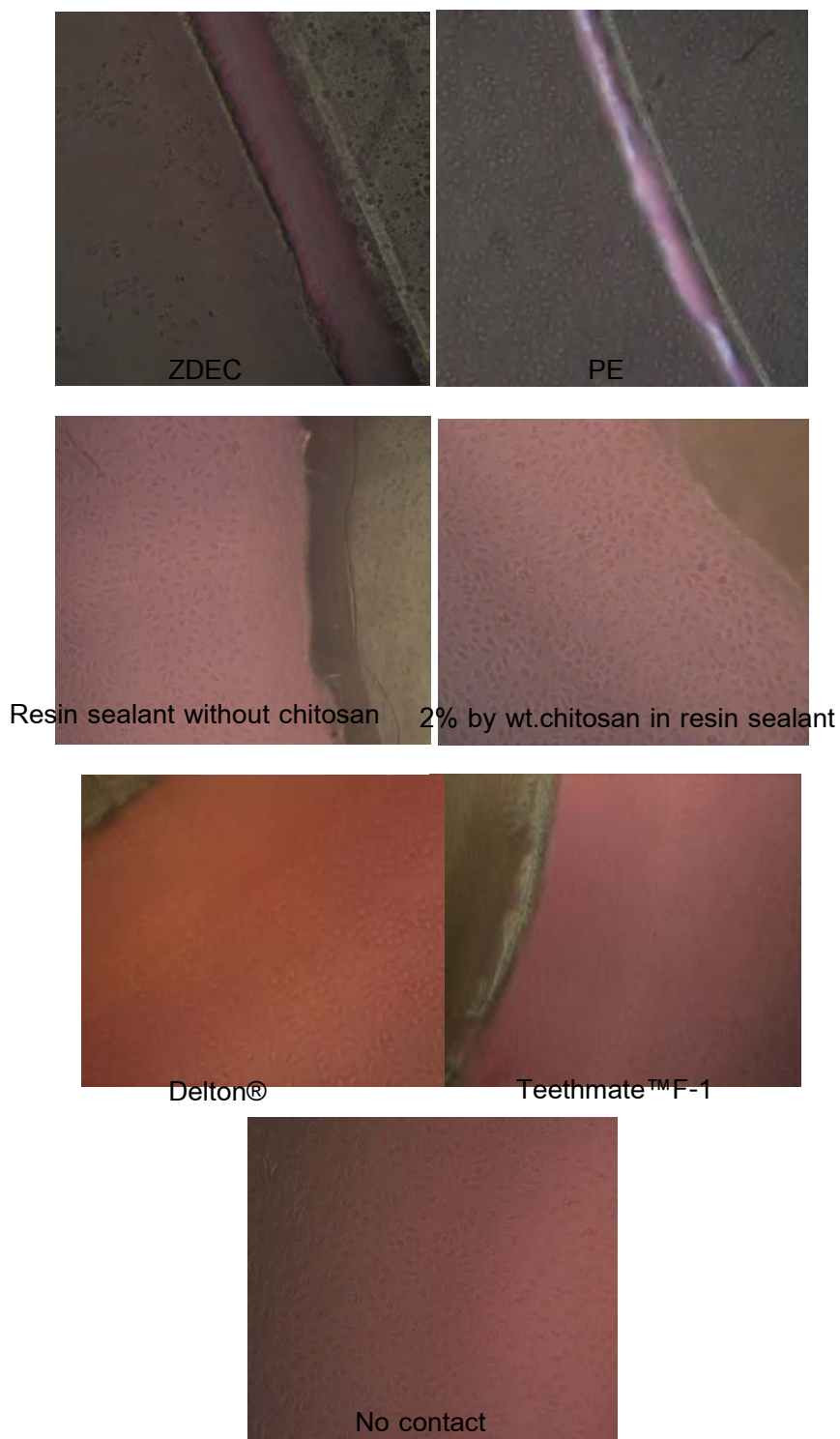
ผลการเปรียบเทียบอัตราการอยู่รอดของเซลล์พบว่า วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักมีอัตราการอยู่รอดสูงสุดคือร้อยละ 88.6490 ใกล้เคียงกับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์ที่ร้อยละ 84.5690

ตารางที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยร้อยละอัตราการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงภายหลังการสัมผัสโดยตรงกับชิ้นวัสดุทั้ง 4 กลุ่มเทียบกับวัสดุควบคุมด้วยการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดทามเฮนส์ (Tamhane's)

(จำนวน 9 ชิ้นตัวอย่างต่อกลุ่มทดสอบ)

	ค่าเฉลี่ย (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) (ร้อยละ)
วัสดุควบคุมทางบวก	6.4357 <sup>a</sup> (0.8340)
วัสดุควบคุมทางลบ	90.8023 <sup>c</sup> (0.1998)
วัสดุไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์	84.5560 <sup>c</sup> (1.2860)
วัสดุเสริมโคโตซานวิสเกอร์ ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก	88.6490 <sup>c</sup> (4.6801)
วัสดุยี่ห้อเดลตัน	48.5530 <sup>b</sup> (1.2512)
วัสดุยี่ห้อทีชท์เมทเอฟ-วัน	65.1673 <sup>b,c</sup> (10.3679)

\* อักษรตัวยกที่ต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพที่ 49 แสดงลักษณะทางกายภาพของเซลล์โดยรอบภายหลังการสัมผัสวัสดุทดสอบโดยตรงที่ กำลังขยาย 100 เท่า

ลักษณะทางกายภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่า ลักษณะของเซลล์เมื่อสัมผัสกับวัสดุควบคุมทางบวกมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปโดยพบแถบปฏิกิริยา (reactivity zone) รอบวัสดุซึ่งเป็นแถบรอบวัสดุที่ไม่พบเซลล์เลยแสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษอย่างสูงของวัสดุ ตรงข้ามกับวัสดุควบคุมทางลบที่พบว่าเซลล์ภายใต้วัสดุยังคงมีลักษณะรูปร่างปกติคล้ายกับเซลล์ในกลุ่มที่ไม่สัมผัสขึ้นทดสอบโดยมีร้อยละอัตราการรอดในระดับสูงแสดงถึงความเป็นพิษต่ำของวัสดุ การเปรียบเทียบในกลุ่มวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินพบว่า เซลล์โดยรอบวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดันและทีชท์เมทเอฟ-วันมีจำนวนและความหนาแน่นลดลงเมื่อเทียบกับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโคซานวีสเกอร์และเสริมวีสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักโดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ในวัสดุสองกลุ่มหลังแสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษในระดับต่ำของวัสดุทั้งสองชนิด (ภาพที่ 49)



#### 4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แบบสัมผัสโดยอ้อม

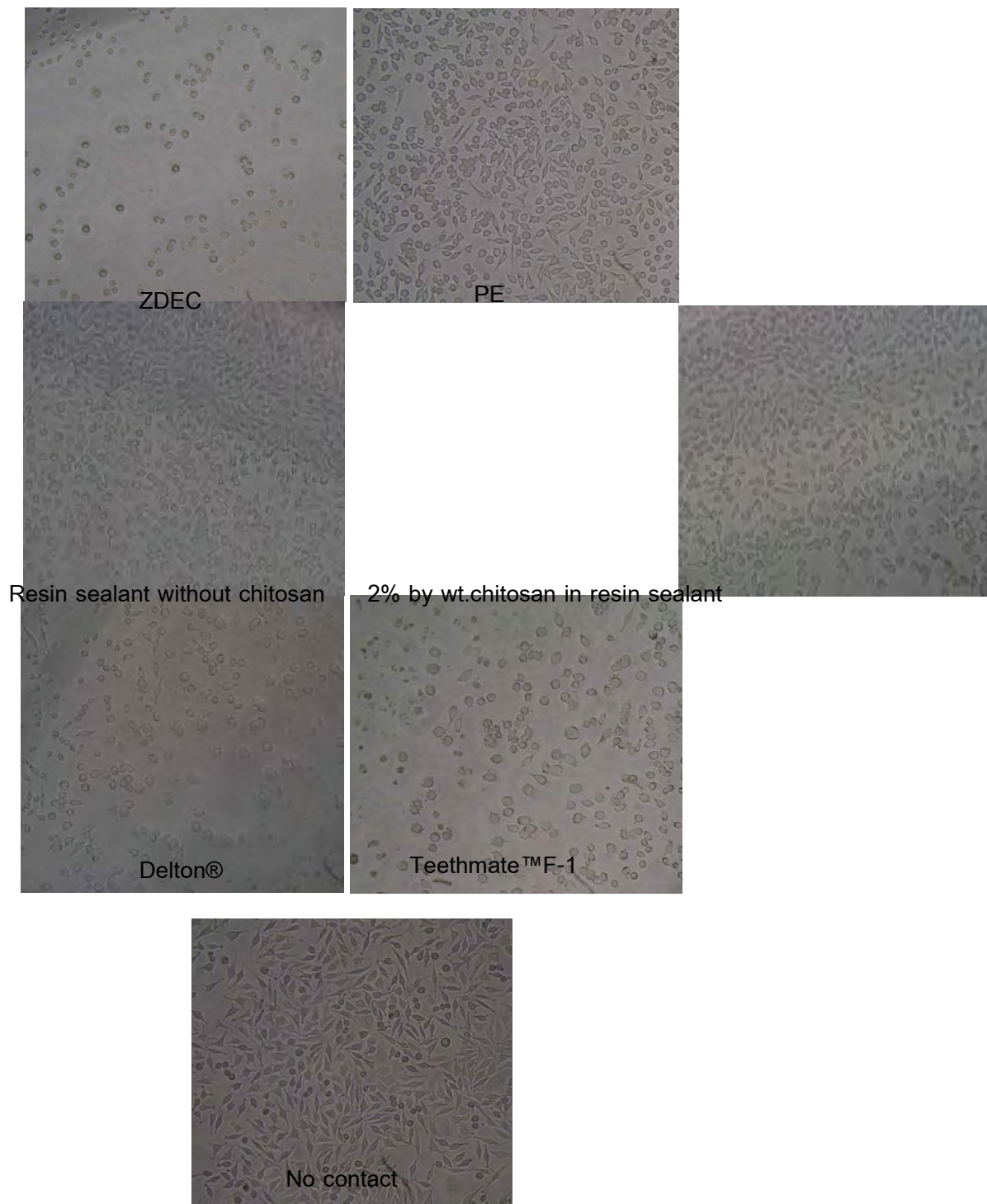
ผลการเปรียบเทียบร้อยละอัตราการอยู่รอดของเซลล์พบว่า วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์มีอัตราการอยู่รอดสูงสุดคือร้อยละ 95.7710 ใกล้เคียงกับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักที่ร้อยละ 94.0293 และมีค่ามากกว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดันและทีซิทเมทเอฟ-วัน

ตารางที่ 14 แสดงค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยร้อยละอัตราการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงภายหลังการสัมผัสอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการแช่วัสดุด้วยการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดทามเฮนส์ (Tamhane's)

(จำนวน 9 ซีนตัวอย่างต่อกลุ่มทดสอบ)

	ค่าเฉลี่ย (ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) (ร้อยละ)
วัสดุควบคุมทางบวก	4.3083 (0.5476) <sup>a</sup>
วัสดุควบคุมทางลบ	97.2220 (1.5210) <sup>c</sup>
วัสดุไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์	95.7710 (3.4652) <sup>c</sup>
วัสดุเสริมโคโตซานวิสเกอร์ ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก	94.0293 (4.4005) <sup>c</sup>
วัสดุยี่ห้อเดลดัน	73.8490 (8.0142) <sup>b</sup>
วัสดุยี่ห้อทีซิทเมทเอฟ-วัน	70.6643 (2.5595) <sup>b,c</sup>

\* อักษรตัวยกที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพที่ 50 แสดงลักษณะทางกายภาพของเซลล์ภายหลังการสัมผัสอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการแช่วัสดุทดสอบและวัสดุควบคุมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่กำลังขยาย 100 เท่า

ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ภายหลังการสัมผัสโดยอ้อมพบว่า เซลล์ในกลุ่มวัสดุควบคุมทางบวกลดจำนวนเซลล์ลงและมีรูปร่างกลมเกือบทั้งหมดโดยพบการบวมตัวและการแตกของเซลล์ส่วนใหญ่สอดคล้องกับร้อยละอัตราการอยู่รอดเพียงร้อยละ 4.31 ตรงข้ามกับวัสดุควบคุมทางลบที่พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่ยังมีรูปร่างปกติ มีการแผ่ออกของระยางค์เซลล์และยึดเกาะกับจานเพาะเลี้ยง ส่งผลให้มีค่าร้อยละอัตราการอยู่รอดสูงถึงร้อยละ 97.22 สำหรับการเปรียบเทียบในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินแต่ละกลุ่มพบว่า เซลล์ส่วนใหญ่ในกลุ่มวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันกลุ่มไม่เสริมโคโตซาน วิสเกอร์และวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักพบว่ามีความหนาแน่นของเซลล์ลดลงเล็กน้อย ต่างจากวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดันและทีซท์เมทเอฟ-วันที่พบเซลล์มีรูปร่างกลมและการแตกของเซลล์มากกว่ากลุ่มอื่น สอดคล้องกับค่าร้อยละอัตราการอยู่รอดของเซลล์ที่น้อยลง (ภาพที่ 49)

## บทที่ 5

### สรุปผล อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

##### 1. สมบัติด้านจุลชีพ

1.1 วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ปริมาณร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก มีผลทำให้เกิดอัตราการลดลงของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ไม่แตกต่างจากวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก สารบอนด์ซีลแอนด์โพรเทกท์และวัสดุยึ่หือ ทีชท์ทเมทเอฟ-วัน แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุยึ่หือเดลดัน วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ ร้อยละ 1.5 และ 1 โดยน้ำหนัก

1.2 วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ปริมาณร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนัก มีผลทำให้เกิดอัตราการลดลงของเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอีไม่แตกต่างจากวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2.5 และ 2 โดยน้ำหนัก สารบอนด์ซีลแอนด์โพรเทกท์และวัสดุยึ่หือ ทีชท์ทเมทเอฟ-วัน แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุยึ่หือเดลดัน วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก

##### 2. การทดสอบสมบัติกายภาพ

2.1 วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักมีค่าความลึกของการแข็งตัวผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานสากลและมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างจากวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์ โดยมีค่ามากกว่าวัสดุยึ่หือเดลดันและทีชท์ทเมทเอฟ-วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.2 วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักมีค่าการดูดซึมน้ำผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานสากลและมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างจากวัสดุยึ่หือเดลดันและทีชท์ทเมทเอฟ-วัน โดยมีค่าน้อยกว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.3 วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักมีค่าการละลายตัวสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานสากลและมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างจากวัสดุซี่หือเดลดันและวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์ โดยมีค่ามากกว่าวัสดุซี่หือที่ซัทเมทเอฟ-วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.4 วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักมีค่าความแข็งผิว้น้อยกว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์ วัสดุซี่หือเดลดันและวัสดุที่ซัทเมทเอฟ-วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.5 วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักมีอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ไม่แตกต่างจากวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์ โดยมีค่ามากกว่าวัสดุซี่หือที่ซัทเมทเอฟ-วันและน้อยกว่าวัสดุซี่หือเดลดันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.6 วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักมีค่าความเหน็ดมากกว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.7 ระดับการรั่วซึมตามขอบไม่ขึ้นอยู่กัชนิดของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน ทั้งนี้วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักมีค่าเฉลี่ยระดับการรั่วซึมตามขอบไม่แตกต่างจากวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์

### 3. การทดสอบสมบัติทางชีวภาพ

3.1 อัตราการอยู่รอดของเซลล์ภายหลังการสัมผัสโดยตรงของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักไม่แตกต่างจากวัสดุควบคุมทางลบ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์และวัสดุซี่หือที่ซัทเมทเอฟ-วัน โดยมีค่ามากกว่าวัสดุควบคุมทางบวกและวัสดุซี่หือเดลดัน

3.2 อัตราการอยู่รอดของเซลล์ภายหลังการสัมผัสโดยอ้อมของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักไม่แตกต่างจากวัสดุควบคุมทางลบ วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์และวัสดุซี่หือเดลดัน โดยมีค่ามากกว่าวัสดุควบคุมทางบวกและวัสดุซี่หือที่ซัทเมทเอฟ-วัน

## อภิปรายผลการวิจัย

การใช้วัสดุเคลือบบริเวณหลุมและร่องฟันในฟันที่มีความเสี่ยงต่อการผุเป็นแนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและได้รับการยอมรับมายาวนานในทางทันตกรรมป้องกัน ด้วยเหตุนี้จึงเป็นเหตุผลหนึ่งในการพัฒนาวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินยี่ห้อพีวีแควร์ของคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากผลการศึกษาวัสดุทั้งทางด้านกายภาพ ชีวภาพรวมถึงการติดตามผลหลังการนำไปใช้ในผู้ป่วยทำให้เชื่อได้ว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันพีวีแควร์เป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติดีในระดับหนึ่งทัดเทียมวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อนำเข้าจากต่างประเทศที่ได้มาตรฐานและการยอมรับ (สุภาภรณ์ จงวิศาล และคณะ, 2547; อนุชาติ ศรีจันบาล และคณะ, 2547) อย่างไรก็ตามหากจะมองถึงสาเหตุของการเกิดโรคฟันผุที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียแล้ว การเลือกใช้สารต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อโดยนำไปผสมลงในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินน่าจะมีประโยชน์มากขึ้น เพราะนอกจากวัสดุจะทำหน้าที่กีดขวางเชื้อโรคไม่ให้เกิดการเกาะติดแล้วยังมีผลยับยั้งหรือฆ่าทำลายเชื้อที่จะเกาะติดตามมาในภายหลังได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณรอยต่อวัสดุกับผิวเคลือบฟันที่มักเป็นจุดอ่อนของการใช้งานวัสดุ ทั้งนี้การผสมสารต้านจุลชีพผสมลงในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินไม่ควรทำให้คุณสมบัติเดิมของวัสดุเสียไปหรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อตัววัสดุน้อยที่สุด การศึกษาครั้งนี้มีแนวคิดในการนำสารโคโตซานที่มีการศึกษาถึงฤทธิ์ในการต้านจุลชีพมาผสมลงในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินโดยเริ่มตั้งแต่การสังเคราะห์โคโตซานในรูปแบบวิสเกอร์ที่มีขนาดเล็กในระดับนาโนเมตร ด้วยกระบวนการทางเคมีจากวัตถุดิบเปลือกกุ้ง ผ่านกระบวนการผสมลงในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินในปริมาณต่างๆกันและขึ้นรูปจนได้ชิ้นวัสดุเพื่อใช้ในการทดสอบคุณสมบัติต่อไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งสมบัติต้านจุลชีพทั้งจากโคโตซานวิสเกอร์เองและจากวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์เพื่อให้แน่ใจว่าโคโตซานมีประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพและยังคงอยู่ภายหลังจากการผสมลงในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันแล้ว นอกจากนี้ยังทำการทดสอบสมบัติทางด้านกายภาพและความเป็นพิษต่อเซลล์เพื่อทดสอบความสามารถของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ต่อการนำไปใช้งานในอนาคต

กระบวนการพิสูจน์เอกลักษณ์เป็นขั้นตอนสำคัญเพื่อตรวจสอบสารที่สังเคราะห์ได้ว่าตรงตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัยหรือไม่ การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโคโตซานวิสเกอร์หลังการสังเคราะห์ด้วยแถบอินฟราเรดสเปคตรัมนอกจากจะทำให้ทราบถึงการปรากฏอยู่ของหมู่ฟังก์ชันต่างๆของโคโตซานแล้ว ยังสามารถใช้แถบสเปคตรัมดังกล่าวในการคำนวณค่าดีกรีออฟดีอะซีเทิลชันที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะในการสังเคราะห์โคโตซานจากสารตั้งต้นไคติน (Sannan และคณะ, 1978; Baxter

และคณะ, 1992; Watthanaphanit และคณะ, 2010) เนื่องจากค่าดังกล่าวแสดงถึงปริมาณร้อยละของหน่วยย่อยดีอะเซทิลเลทกลูโคซามีน (deacetylated glucosamine) หรือโคโตซานบนโครงสร้างโคตินภายหลังผ่านกระบวนการกำจัดหมู่อะเซทิล การคำนวณค่าดีกรีออฟดีอะเซทิลเลชันในการศึกษาครั้งนี้ยึดตามแนวคิดและสมการของ Baxter และคณะในปี 1992 ซึ่งคำนวณเป็นสัดส่วนความสูงของแถบการดูดกลืนชนิดเอไมด์หนึ่งที่ 1655 ส่วนต่อเซนติเมตร (amide I;  $V_{C=O}$ ) ที่ลดลงเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงจากโคตินเป็นโคโตซานเทียบกับความสูงของแถบการดูดกลืนที่ไม่เปลี่ยนแปลงของหมู่ไฮดรอกซิลที่ 3450 ส่วนต่อเซนติเมตร ( $V_{OH}$ ) อย่างไรก็ตามการดัดหมู่อะเซทิลจากหน่วยย่อยกลูโคซามีนบนโครงสร้างโคตินจะเกิดได้ไม่สมบูรณ์และมักจะเกิดแบบสุ่ม (random) ทำให้ค่าดีกรีออฟดีอะเซทิลเลชันของโคโตซานที่ได้จากการคำนวณมักมีค่าอยู่ระหว่าง 50 ถึง 99 (Kasaai, 2009)

รายงานค่าดีกรีออฟดีอะเซทิลเลชันของโคตินและโคโตซานวิสเกอร์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 25 และ 73.58 ตามลำดับ สำหรับโคตินค่าที่ได้ใกล้เคียงกับค่าดีกรีออฟดีอะเซทิลเลชันของโคตินวิสเกอร์จากการสังเคราะห์จากเปลือกกุ้งสายพันธุ์ *Penaeus merquiensis* ที่มีค่าร้อยละ 20 (Wongpanit และคณะ, 2007) โดยค่าดีกรีออฟดีอะเซทิลเลชันของโคโตซานวิสเกอร์จากการศึกษาครั้งนี้ได้จากการผ่านกระบวนการดีอะเซทิลเลชันเพียงครั้งเดียว แม้ว่าการเพิ่มค่าดีกรีสามารถกระทำได้โดยการเพิ่มระยะเวลากระบวนการดีอะเซทิลเลชันให้นานขึ้นหรือเพิ่มจำนวนครั้งในการทำปฏิกิริยา (Mima และคณะ, 1983) เพราะค่าดีกรีที่สูงขึ้นจะช่วยเพิ่มความสามารถของโคโตซานในการยับยั้งแบคทีเรียเนื่องจากการมีประจุบวกของหมู่แอมโมเนียมไอออนเพิ่มขึ้นซึ่งส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้มากขึ้น (Shimojoh และคณะ, 1996; Jeon และคณะ, 2001; Gerasimenko และคณะ, 2004) แต่กลับพบว่าการเพิ่มระยะเวลาของกระบวนการอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของวิสเกอร์ได้ (Phongying และคณะ, 2007) การศึกษานำร่องในงานวิจัยครั้งนี้เพิ่มระยะเวลากระบวนการไฮโดรไลซิสของเกล็ดโคตินเพื่อให้ได้โคตินวิสเกอร์จาก 6 ชั่วโมงเป็น 9 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ พบว่าที่เวลา 9 ชั่วโมงขนาดของโคโตซานวิสเกอร์มีขนาด รูปร่างและค่าดีกรีออฟดีอะเซทิลเลชันเท่ากับ 78.87 ไม่แตกต่างกับที่เวลา 6 ชั่วโมงแต่หากเพิ่มระยะเวลากระบวนการจนถึง 12 ชั่วโมงพบว่า วิสเกอร์มีขนาดเล็กมากไม่สามารถเกิดเป็นสารคอลลอยด์ภายหลังการกรองผ่านเยื่อแผ่นกรองได้โดยซึ่งอาจมีสาเหตุจากสภาวะปฏิกิริยาเคมีที่รุนแรงและนานเกินไปทำให้สายพอลิเมอร์ถูกตัดจนมีขนาดเล็กมาก สอดคล้องกับการศึกษานำร่องกระบวนการดีอะเซทิลเลชันของโคตินวิสเกอร์เพื่อให้ได้โคโตซานในการทดลองนี้ที่ลดเวลาปฏิกิริยาเหลือเพียง 5 นาทีเนื่องจากการใช้เวลา 20 นาที (Watthanaphanit และคณะ, 2010) กลับไม่พบการเกิดเป็นสารคอลลอยด์โคโตซานวิสเกอร์ สำหรับ

การเตรียมตัวอย่างเพื่อการวัดค่าดีกรีออฟดีอะเซทิเลชันสำหรับการทดสอบครั้งนี้ใช้วิธีการขึ้นรูปโคตินและโคโตซานวิสเกอร์เป็นแผ่นฟิล์มบางด้วยการอบในตู้อบแห้งที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมงเพื่อให้แผ่นฟิล์มแห้งสนิทก่อนนำไปทดสอบ ซึ่งสามารถหลีกเลี่ยงความชื้นภายในขึ้นทดสอบที่มีผลต่อค่าดีกรีออฟดีอะเซทิเลชันจากการคำนวณโดยใช้การวัดความสูงของแถบการดูดกลืนบริเวณหมู่ไฮดรอกซิล (ช่วง 3480 ถึง 3488 ส่วนต่อเซนติเมตร) หากตัวอย่างทดสอบเกิดการปนเปื้อนด้วยโมเลกุลของน้ำหรือเกิดจากที่โมเลกุลพอลิเมอร์มีพันธะไฮโดรเจนภายในสายและระหว่างสายมากอาจส่งผลให้แถบการดูดกลืนมีความกว้างและความสูงมากเกินความเป็นจริง (Duarte และคณะ, 2002) นอกจากนี้การลากเส้นฐานซึ่งใช้เป็นเส้นอ้างอิงในการวัดจนถึงยอดกราฟและการคำนวณยังกระทำโดยผู้วิจัยเพียงคนเดียวเพื่อลดความผิดพลาดจากการลากเส้นและการคำนวณดังกล่าว (Miya และคณะ, 1980)

โคโตซานในรูปแบบวิสเกอร์ซึ่งสังเคราะห์จากกระบวนการดีอะเซทิเลชันของโคตินวิสเกอร์มีลักษณะความเป็นสารคอลลอยด์ได้เนื่องจากวิสเกอร์มีลักษณะกระจายตัว (disperse) อย่างสม่ำเสมอและมีขนาดอนุภาคอยู่ในระดับนาโนเมตรขึ้นไป วิสเกอร์ที่ได้จากการสังเคราะห์จะเกิดอยู่ภายในถุงเยื่อแผ่นกรองซึ่งเป็นสมบัติอีกประการหนึ่งของสารคอลลอยด์ที่ไม่สามารถผ่านออกจากเยื่อแผ่นกรองหรือกระดาษกรองได้ สารคอลลอยด์โคโตซานวิสเกอร์มีลักษณะชั้น ชุ่นและสามารถคงอยู่ในสภาพคอลลอยด์ได้นานนับเดือนในอุณหภูมิห้อง เนื่องจากการผลักระหว่างประจุบวกของหมู่ฟังก์ชันแอมโมเนียมไอออนที่เกิดภายหลังกระบวนการดีอะเซทิเลชันในสภาพที่มีความเป็นกรดเล็กน้อย (Marchessault และ Morehed, 1959) จากข้อมูลลักษณะทางกายภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านพบว่า โคโตซานวิสเกอร์ที่สังเคราะห์ได้มีขนาดในระดับนาโนเมตร โดยมีความยาวตั้งแต่ 328 ถึง 965 นาโนเมตร (ความยาวเฉลี่ย 648 นาโนเมตร) และความกว้างตั้งแต่ 20 ถึง 87 นาโนเมตร (ความกว้างเฉลี่ย 59 นาโนเมตร) เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนความยาวต่อความกว้าง (aspect ratio) พบว่ามีค่า 10.98 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการมีลักษณะเป็นเส้นใยที่มีความยาว (fiber) ของวิสเกอร์ที่สังเคราะห์ได้ โดยทั่วไปค่าสัดส่วนความยาวต่อความกว้างที่สูงขึ้นบ่งบอกถึงความสามารถที่มากขึ้นของเส้นใยในการรับและกระจายแรงไปตามความยาวของเส้นใย จากการศึกษาแผ่นฟิล์มนาโนคอมโพสิตเสริมโคตินวิสเกอร์พบว่า การเพิ่มปริมาณของวิสเกอร์มากขึ้นจะทำให้แผ่นฟิล์มมีความทนทานต่อแรงดึงสูงขึ้นและมีความสามารถในการยืดของวัสดุเพิ่มมากขึ้น (Sriupayo และคณะ, 2005) เมื่อพิจารณาในส่วนความยาวของวิสเกอร์โดยเฉลี่ยจากการการศึกษาครั้งนี้ (648 นาโนเมตร) พบว่ามีค่าน้อยกว่าวิสเกอร์ที่ได้จากการสกัดโดยใช้เปลือกกุ้งสายพันธุ์



*P.merquiensis* ที่มีความยาวเฉลี่ย 309 นาโนเมตร (Watthanaphanit และคณะ, 2010) ทั้งนี้อาจเกิดจากโคโคซานไวรัสเกอร์ใช้เวลาผ่านกระบวนการดีอะเซทิเลชันสั้นลงเหลือเพียง 5 นาทีที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสทำให้สารละลายต่างโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้าทำปฏิกิริยาบนสายพอลิเมอร์ได้ไม่มากนัก เส้นใยที่เกิดขึ้นจึงมีขนาดยาวกว่า นอกจากนี้อาจเกิดจากความแตกต่างของสายพันธุ์กึ่งที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์จึงเป็นข้อแนะนำในการศึกษาเพิ่มเติมถึงความแตกต่างของสายพันธุ์กึ่งที่เลือกใช้ต่อเอกลักษณ์ของโคโคซานในอนาคตเพื่อให้ได้โคโคซานไวรัสเกอร์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอเหมาะแก่การสังเคราะห์และผลิตในปริมาณมาก โดยทั่วไปกึ่งสายพันธุ์ *L.vannamei* มีชื่อสามัญว่า กึ่งขาว มีต้นกำเนิดในมหาสมุทรแปซิฟิกฝั่งตะวันออกแต่ถูกนำเข้ามาแพร่พันธุ์ในน่านน้ำอ่าวไทยจนแพร่หลายจนกลายเป็นกึ่งเลี้ยงที่ได้รับความนิยมเนื่องจากโตเร็ว ให้ผลผลิตสูงและเป็นที่ต้องการของตลาดโลก ทำให้เป็นหนึ่งในสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีบทบาทมากในน่านน้ำอ่าวไทย (Phongdara และคณะ, 2004) การศึกษาค้นคว้าเลือกใช้เปลือกกึ่งสายพันธุ์ดังกล่าวซึ่งหาได้ง่ายและได้จากส่วนเหลือในอุตสาหกรรมอาหารทะเล

แม้ว่าไวรัสเกอร์ที่ได้ส่วนใหญ่จะมีลักษณะกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอแต่จากการศึกษาภาพที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านยังพบเส้นใยบางส่วนเกิดการกระจุกตัวหรือรวมกลุ่มกัน ซึ่งเชื่อว่าจะจะเป็นผลมาจากอันตรกิริยาระหว่างโคโคซานไวรัสเกอร์กับสารละลายต่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่กระทำที่ระดับที่กระตุ้นให้เกิดการรวมกลุ่มและตกตะกอนของโคโคซานไวรัสเกอร์ (Okano และคณะ, 2009) สำหรับลักษณะเส้นใยโคโคซานไวรัสเกอร์หลังผ่านกระบวนการทำให้แห้งด้วยวิธีฟรีซดรายและผสมลงในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินพบว่า เส้นใยมีทั้งลักษณะกระจายตัวเป็นเส้นเดี่ยวคล้ายคลึงลักษณะการกระจายตัวก่อนการผสม โดยมีไวรัสเกอร์บางส่วนเกาะกันเป็นกลุ่มซึ่งเชื่อว่าจะเกิดจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างเส้นใยภายหลังการดึงโมเลกุลของน้ำออกทำให้โครงสร้างพอลิเมอร์เข้ามาใกล้ชิดกัน (Lamarque และคณะ, 2004) หรืออาจเกิดจากขั้นตอนการผสมด้วยเครื่องผสมแบบมือถือที่ทำให้เส้นใยบางส่วนกระจายตัวไม่ดีในมอนอเมอร์ เป็นต้น

สมบัติด้านจุลชีพของโคโคซานไวรัสเกอร์ แม้ว่าปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาใดที่บ่งชี้อย่างเด่นชัดถึงกลไกที่แท้จริงของโคโคซานในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่จากการศึกษาโคโคซานหรืออนุพันธ์ในรูปต่างๆ ต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและลบที่ผ่านมาในอดีตทำให้เชื่อได้ว่า หมู่ฟังก์ชันแอมโมเนียบนโครงสร้างของโคโคซานในสภาพประจุบวกมีบทบาทสำคัญต่อสมบัติด้านจุลชีพโดยส่งผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียทำให้เกิดการรั่วไหลขององค์ประกอบภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก (Rabea และคณะ, 2003; Decker และคณะ, 2005) การเปรียบเทียบผลการ

ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดแกรมบวกและลบพบว่า สารโคโตซานสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดแกรมบวกได้ดีกว่าชนิดแกรมลบโดยพบว่าค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดการยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) ในกลุ่มแกรมบวกมักมีค่าน้อยกว่าในกลุ่มแกรมลบ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบมีชั้นไลโปพอลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide layer) ปกคลุมอยู่ด้านนอกซึ่งกีดขวางการซึมผ่านและการทำงานของโคโตซานบนเยื่อหุ้มเซลล์ (Jeon และคณะ, 2001; No และคณะ, 2002; Gerasimenko และคณะ, 2004)

สำหรับแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้คือ แบคทีเรียกลุ่มสเตรปโตคอคคัสและแลคโตบาซิลลัสซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มแกรมบวกโดยเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในช่องปากและในกระบวนการเกิดโรคฟันผุ การศึกษาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำให้เกิดการยับยั้งแบคทีเรียของโคโตซานไวรัสเกอร์ต่อเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และแลคโตบาซิลลัส คาเซอียพบว่าค่าเท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ความแตกต่างของค่า MIC ของเชื้อทั้งสองชนิดอาจเกิดจากความจำเพาะของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่มีปริมาณองค์ประกอบโปรตีนบนผิวเซลล์แตกต่างกันไปทำให้มีปริมาณประจุลบบนผิวเซลล์ไม่เท่ากันและตอบสนองต่อสารโคโตซานแตกต่างกัน (Tsai และ Hwang, 2004) อย่างไรก็ตามก็ยังไม่มียางานใดระบุค่า MIC ที่แน่นอนของสารโคโตซานต่อเชื้อในกลุ่มแลคโคบาซิลลัสรวมถึงสายพันธุ์คาเซอีย สำหรับเชื้อในกลุ่มสเตรปโตคอคคัสมีรายงานถึงค่า MIC ของสารโคโตซานที่สกัดจากกระดองปูต่อเชื้อมิวแทนส์สายพันธุ์ว่ามีค่า 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Bae และคณะ, 2006)

ความเข้มข้นของสารโคโตซานเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อของสารโคโตซานโดยพบว่า อัตราการยับยั้งเชื้อจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของโคโตซานโดยที่ความเข้มข้นต่ำประจุบวกของโคโตซานจะเกิดการจับกับประจุลบบนผิวเซลล์แบคทีเรียทำให้โปรตีนผิวเซลล์สูญเสียสภาพ ในขณะที่ความเข้มข้นสูงประจุบวกบนพอลิเมอร์จะมีปริมาณมากพอที่จะก่อตัวเป็นชั้นฟิล์มบางรอบเซลล์ทำให้เซลล์ถูกตัดขาดจากสิ่งแวดล้อม ปัจจัยในเรื่องความเข้มข้นของโคโตซานไวรัสเกอร์ดังกล่าวสอดคล้องกับการสังเกตแถบการยับยั้งของสารโคโตซานไวรัสเกอร์ที่เกิดขึ้นโดยพบว่า แถบจะมีความกว้างมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคโตซานไวรัสเกอร์ (concentration dependent) (Sudarshan และคณะ, 1992; Rabea และคณะ, 2003)

การศึกษาสมบัติต้านจุลชีพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานไวรัสเกอร์ โดยใช้วิธีการสัมผัสโดยตรง (direct contact assay) ถูกเลือกมาใช้ในการศึกษาค้างนี้เนื่องจากโดยทั่วไปแล้ว

การใช้งานจริงของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันในช่องปากเกิดจากการทำให้ยึดติดในหลุมร่องฟันที่จะเกิดพื้นผิววัสดุสัมผัสกับแบคทีเรียโดยตรง อีกทั้งเป้าหมายในการศึกษาคั้งนี้คือการพัฒนาวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะที่เกาะอยู่โดยรอบวัสดุหรือหากมีการรั่วซึมจะเป็นที่มาของการฟุตามขอบในภายหลัง การเปรียบเทียบความกว้างแถบการยับยั้งในกลุ่มวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินเสริมโคโตซานวิสเกอร์ปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักต่าง ๆ กันพบว่า มีลักษณะคล้ายกับการศึกษาในโคโตซานวิสเกอร์ กล่าวคืออัตราการลดลงของเชื้อจะมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของวิสเกอร์ในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันโดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อมีปริมาณวิสเกอร์อย่างน้อยร้อยละ 2 ในวัสดุต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งสอง ทั้งนี้ปริมาณวิสเกอร์อย่างน้อยร้อยละ 2 และ 1.5 โดยน้ำหนักทำให้เริ่มเห็นแถบการยับยั้งอย่างเด่นชัดบนเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และแลคโตบาซิลลัส คาเซอิตาล์มลำดับ การเปรียบเทียบปริมาณดังกล่าวกับค่า MIC ของเชื้อทั้งสองที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้โดยการคำนวณพบว่า มีค่าเท่ากับ 20.82 มิลลิกรัมในเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และ 15.71 มิลลิกรัมในเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิตอ่อมอนอเมอร์ผสมปริมาตร 1 มิลลิลิตรซึ่งใกล้เคียงกับค่า MIC ของเชื้อทั้งสองที่มีค่าเท่ากับ 20 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ความสามารถของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ส่วนหนึ่งอาจเกิดจากความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของโคโตซานโดยตรง (Rabea และคณะ, 2003) หรืออาจเกิดจากการละลายตัวของโคโตซานวิสเกอร์ที่มีขนาดเล็กมากออกจากวัสดุโดยมีการศึกษาการปลดปล่อยโคโตซานวิสเกอร์ออกจากเส้นใยนาโนคอมโพสิตอัลจินेटโคโตซาน (alginate-chitosan whiskers nanoconposite fiber) พบว่า โคโตซานวิสเกอร์จะถูกปลดปล่อยออกจากผิววัสดุอย่างรวดเร็วในช่วง 2 ชั่วโมงแรกออกมามากและจะปลดปล่อยออกมาอย่างต่อเนื่องจนถึงจุดอิ่มตัวภายหลัง 30 ชั่วโมง การศึกษาดังกล่าวยังพบด้วยว่าการปลดปล่อยวิสเกอร์ออกจากวัสดุเกิดจากกระบวนการกัดกร่อนที่บริเวณผิวเส้นใย (surface erosion) ที่มีวิสเกอร์ฝังอยู่บนผิววัสดุโดยตรวจสอบจากการย้อมติดสีอะมิโดแบลคเทนบี (Amidoblack 10B) ซึ่งเป็นสีย้อมประจุลบชนิดหนึ่ง (anionic dye) ที่มีความจำเพาะต่อประจุบวกของหมู่แอมโมเนียมที่พบบนโครงสร้างของโคโตซานพอลิเมอร์ (Watthanaphanit และคณะ, 2010) จึงอาจเป็นข้อเสนอแนะในอนาคตเพื่อการศึกษาอย่างละเอียดถึงปริมาณและกลไกการปลดปล่อยของโคโตซานวิสเกอร์ออกจากวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินอย่างต่อเนื่องเพื่อเพิ่มความสามารถและประสิทธิภาพของวัสดุในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

อย่างไรก็ดีการทดสอบด้วยการวัดความกว้างแถบการยับยั้งเป็นเพียงการทดสอบในเบื้องต้นและเป็นการศึกษาเชิงคุณภาพ (qualitative measurement) จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบเชิง

ปริมาณ (quantitative measurement) เพื่อยืนยันประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ การศึกษาครั้งนี้เลือกใช้การวัดปริมาณเชื้อที่ลดลงภายหลังการสัมผัสชิ้นงานในช่วง 12 ชั่วโมง รายงานการศึกษาพบว่าอัตราการลดลงของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ยังขึ้นอยู่กับปริมาณวีสเกอร์ที่ใส่ลงในวัสดุ กล่าวคือ ปริมาณวีสเกอร์ที่เพิ่มขึ้นจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อให้มากขึ้นและพบว่าปริมาณร้อยละ 2 และ 1.5 โดยน้ำหนักเป็นปริมาณวีสเกอร์น้อยสุดที่เมื่อใส่ลงในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันแล้วทำให้แบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และแลคโตบาซิลลัส คาเซอลิงลดลงแตกต่างจากวัสดุกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทดสอบในสมบัติทางกายภาพและความเป็นพิษต่อเซลล์ในส่วนต่อไปจึงเลือกใช้วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักเป็นกลุ่มทดสอบเนื่องจากปริมาณโคโตซานวีสเกอร์ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ทั้งสองชนิดในการศึกษาครั้งนี้ การศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบสมบัติด้านจุลชีพภายหลังการสัมผัสวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเป็นเวลา 12 ชั่วโมงแต่หากพิจารณาในแง่การใช้งานของวัสดุที่หวังผลด้านจุลชีพเป็นระยะเวลานาน การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ในระยะยาวจึงเป็นข้อเสนอแนะในอนาคต ทั้งนี้มีการศึกษาพบว่า วัสดุบูรณะคอมโพเมอร์ที่มีองค์ประกอบของเรซินและฟลูออไรด์เป็นสารต้านจุลชีพจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ทันทีภายหลังการสัมผัสแต่ผลดังกล่าวจะลดลงจนใกล้เคียงกับวัสดุที่ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเมื่อเวลาผ่านไปอย่างน้อย 1 เดือน (Matalon และคณะ, 2003)

สำหรับการทดสอบวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเปรียบเทียบยี่ห้อที่ซัทเมทเอฟ-วันที่ถูกเลือกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เนื่องจากมีส่วนประกอบของฟลูออไรด์พบว่า วัสดุยี่ห้อที่ซัทเมทเอฟ-วันสามารถทำให้เกิดแถบการยับยั้งได้บนเชื้อทั้งสองและสามารถลดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และแลคโตบาซิลลัส คาเซอลิงได้ถึงร้อยละ 77.48 และ 90.67 ตามลำดับสอดคล้องกับการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และแลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลัส (*Lactobacillus acidophilus*) ของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินที่มีส่วนประกอบฟลูออไรด์ 3 ยี่ห้อคือ เฮลิโอซิล เฮลิโอซิล-เอฟและที่ซัทเมทเอฟ-วันซึ่งพบว่ามีเพียงวัสดุยี่ห้อที่ซัทเมทเอฟ-วันเพียงยี่ห้อเดียวที่สามารถทำให้เกิดแถบการยับยั้งโดยรอบวัสดุได้ (Menon Preetha และคณะ, 2007) ทั้งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างในรูปแบบของฟลูออไรด์ที่ผสมในวัสดุและความสามารถในการปลดปล่อยออกจากวัสดุโดยพบว่าฟลูออไรด์ในวัสดุยี่ห้อที่ซัทเมทเอฟ-วันจะถูกปลดปล่อยออกจากสารประกอบฟลูออไรด์อินทรีย์ (organic fluoride) ที่ยึดด้วยพันธะเคมีกับสารเรซินมอนอเมอร์ทำให้การปลดปล่อยฟลูออไรด์เกิดขึ้นอย่างช้าๆและซึมผ่านเข้าสู่ผิวฟันอย่างต่อเนื่องต่างจากวัสดุยี่ห้อเฮลิโอ

ซีล-เอฟที่อยู่ในรูปเกลือฟลูออไรด์ (fluoride salt) ที่สามารถละลายออกจากวัสดุและปลดปล่อยฟลูออไรด์ไอออนออกสู่ช่องปากอย่างรวดเร็วและคงอยู่ไม่นาน จึงอาจทำให้มีผลยับยั้งเชื้อโดยรอบวัสดุได้ไม่นาน (Morphis และคณะ, 2000) การศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาปริมาณฟลูออไรด์ที่ปลดปล่อยออกมาจากวัสดุทั้งสองโดยพบว่า วัสดุยี่ห้อที่ซัทเมทเอฟ-วันจะสามารถปลดปล่อยฟลูออไรด์ออกมาจากพื้นผิววัสดุได้มากกว่ายี่ห้อเฮลิโอซีล-เอฟอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Garcia-Godoy และคณะ, 1997) และเป็นวัสดุเพียงชนิดเดียวที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และซอโบรินัส (*S.sobrinus*) ได้ (Loyola-Rodriguez และ Garcia-Godoy, 1996) สำหรับสารบอนด์ยี่ห้อซีลแอนท์โพเรทกที่มีส่วนผสมของสารไตรโคซานพบว่าสามารถทำให้เกิดแถบการยับยั้งที่มีความกว้างมากที่สุดเมื่อเทียบกับวัสดุอื่น รวมทั้งมีอัตราการลดลงของเชื้อที่มากถึงร้อยละ 84 และ 91 ในเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์และแลคโตบาซิลลัส คาเซอิตาล์มลำดับสาเหตุอาจเกิดจากการเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรคได้มาก (strong antiseptic) แม้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ การศึกษาผลของความเข้มข้นของไตรโคซานที่ร้อยละ 0.01, 0.03, 0.1 และ 0.3 ต่อเชื้อกลุ่มสเตรปโตคอคคัสและแลคโตบาซิลลัสพบว่า สารไตรโคซานมีฤทธิ์ฆ่าเชื้ออย่างชัดเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ขึ้นไป (Ergucu และคณะ, 2005) ซึ่งแม้ว่าปริมาณสัดส่วนที่ถูกผสมลงไปในการบอนด์ยี่ห้อซีลแอนท์โพเรทกจะไม่ได้ถูกเปิดเผยจากบริษัทผู้ผลิตก็พอจะอนุมานได้ถึงปริมาณและความเข้มข้นของสารไตรโคซานที่มากพอที่จะทำให้เกิดผลการยับยั้งในการศึกษาครั้งนี้

การทดสอบสมบัติทางกายภาพ เป็นการทดสอบส่วนที่มีความสำคัญส่วนหนึ่งในการประเมินประสิทธิภาพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินก่อนการเริ่มนำไปใช้จริง การประเมินการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่เสริมด้วยโคโคซานวิสเกอร์จำเป็นต้องทำการทดสอบด้วยวิธีการทดสอบที่หลากหลายเนื่องจากวิธีการทดสอบทางกายภาพแต่ละวิธีมีผลเกี่ยวเนื่องและมีความสัมพันธ์กัน การทดสอบครั้งนี้ทำการทดสอบความลึกของการแข็งตัวซึ่งเป็นการทดสอบพื้นฐานขั้นแรกและถูกกำหนดไว้สำหรับการประเมินวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินตามมาตรฐานสากล ไอเอสโอร่วมกับสมบัติในด้านอื่นๆ เช่น ความแข็งผิว อัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ เป็นต้น การศึกษาในอดีตพบความสัมพันธ์ระหว่างค่าความลึกของการแข็งตัว ความแข็งผิวและอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ที่มีผลต่อคุณสมบัติของวัสดุประเภทเรซิน (Ferracane, 1985; Rueggeberg และ Craig, 1988) โดยพบว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่ตอบสนองต่อแสงได้ไม่เต็มอ้อมเกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวไม่สมบูรณ์ ส่งผลเสียต่อวัสดุในภาพรวมเช่น ความแข็งผิวลดลง วัสดุมีอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ต่ำทำให้โครงสร้างตาข่ายของพอลิเมอร์ที่ได้ไม่สมบูรณ์ เกิดการดูดซับน้ำเข้าไปในเนื้อพอลิ

เมอร์ที่มีรูปทรงสูงและมีการละลายตัวของมอนอเมอร์ที่ไม่เกิดปฏิกิริยาออกมามาก เป็นต้น (Yue และคณะ, 2009)

ความลึกของการแข็งตัวเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความสามารถของแสงในการทะลุผ่านวัสดุ เพื่อกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัว ค่าดังกล่าวมีความสำคัญในการประเมินวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินเนื่องจากแสงต้องเดินทางผ่านวัสดุเพื่อทำให้วัสดุเกิดการแข็งตัวได้ดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณรอยต่อระหว่างวัสดุกับผิวเคลือบฟัน วัสดุที่มีค่าความลึกของการแข็งตัวน้อยกว่าย่อมจะเกิดผลเสียต่อการยึดติดและความแข็งแรงพันธะที่ต่ำลง (Yue และคณะ, 2009) ค่าความลึกของการแข็งตัวตามมาตรฐานสากลไอเอสโอ 6874:2005 กำหนดไว้ว่าต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 1.5 มิลลิเมตร จากการศึกษาพบว่าค่าความลึกของการแข็งตัวของทั้งวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวีสเกอร์ และเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2 สูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ( $5.9498 \pm 0.0366$  และ  $5.8040 \pm 0.1180$  ตามลำดับ) เหตุผลดังกล่าวอาจเกิดจากวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2 แม้ว่าจะมีส่วนผสมของโคโตซานวีสเกอร์แต่เนื่องจากวีสเกอร์ดังกล่าวมีขนาดเล็กมากในระดับนาโนเมตรเทียบเท่ากับความยาวคลื่นของแสง แสงจึงสามารถส่องผ่านชั้นวัสดุได้เกือบหมดทำให้วัสดุมีความโปร่งแสงมากและคงความใสส่งผลให้ค่าความลึกของการแข็งตัวที่ได้ไม่แตกต่างจากวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซาน การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแข็งตัวของวัสดุบูรณะประเภทเรซินพบว่าความใสของวัสดุเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อค่าความลึกของการแข็งตัว (Shortall และคณะ, 1995) โดยทั่วไปพบว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดใสจะมีค่าความลึกของการแข็งตัวมากกว่าวัสดุชนิดทึบ (Ferracane และคณะ, 1986) นอกจากนี้ปัจจัยอื่นที่มีผลต่อค่าความลึกเช่น ชนิดของมอนอเมอร์ องค์ประกอบในวัสดุ ปัจจัยของแหล่งกำเนิดแสงได้แก่ความยาวคลื่นแสง ความเข้มแสงและระยะเวลาในการฉาย เป็นต้น

การทดสอบการดูดซับน้ำและการละลายตัวไม่ได้ถูกกำหนดไว้ในมาตรฐานสากลของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินแต่เลือกนำมาใช้ทดสอบในการศึกษาครั้งนี้เพื่อตรวจสอบแนวโน้มของวัสดุในกลุ่มนี้สำหรับการพัฒนาต่อไปในอนาคต วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินมักประกอบด้วยมอนอเมอร์คล้ายคลึงกับวัสดุบูรณะชนิดเรซินแต่มีความแตกต่างกันที่ชนิดและปริมาณสารยึดแทรกตามแต่ละบริษัทผู้ผลิต โดยทั่วไปวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินจะมีสารยึดแทรกในปริมาณที่น้อยกว่าร้อยละ 10 โดยน้ำหนักเพื่อให้เกิดการไหลแผ่ได้ง่ายกว่าลงไปในหลุมร่องฟัน สำหรับเกณฑ์ที่กำหนดไว้ตามมาตรฐานไอเอสโอ 4049:2000 คือต้องมีค่าการดูดซับน้ำน้อยกว่า 50 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตรและค่าการละลายตัวน้อยกว่า 7.5 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์มีค่าการดูดซับน้ำและละลายตัวผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานซึ่งก็มีค่ามากกว่าวัสดุบูรณะเรซินคอมโพสิต เนื่องจากการมีร้อยละของวัสดุอัดแทรกในปริมาณน้อยกว่าทำให้มีปริมาณมอนอเมอร์ที่สามารถละลายตัวออกมาได้มากกว่าสำหรับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักมีค่าการดูดซับน้ำผ่านตามเกณฑ์มาตรฐานแต่มีค่าการละลายตัวสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานซึ่งอาจเกิดจากประจุบนโครงสร้างของโคโตซานทำอันตรกิริยากับโมเลกุลของน้ำที่มีความเป็นประจุเหมือนกัน ดึงดูดโมเลกุลของน้ำเข้าไปภายในเนื้อพอลิเมอร์และแทรกซึมเข้าไปบริเวณรอยต่อระหว่างวิสเกอร์และพอลิเมอร์เมทริกซ์ทำให้เกิดการละลายตัวได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากมอนอเมอร์องค์ประกอบบางตัว เช่น การมีมอนอเมอร์ที่อีจีดีเอ็มเอเป็นองค์ประกอบเนื่องจากการมีศึกษาพบว่าการใช้มอนอเมอร์นี้จะช่วยให้โครงสร้างของพอลิเมอร์มีความยืดหยุ่น (flexible) มากขึ้นเนื่องจากโครงข่ายของพอลิเมอร์ผสมหลังการแข็งตัวจะเกาะกันอย่างหลวมๆ จึงสามารถดูดซับน้ำเข้าไปในช่องว่างระหว่างสายได้ง่ายขึ้น อีกทั้งการมีหมู่ไฮดรอกซิลและคาร์บอกซิลบนสายพอลิเมอร์โคโตซานซึ่งมีความสามารถในการจับกับโมเลกุลของน้ำได้ง่ายจึงอาจทำให้เกิดการละลายตัวและแยกสลายของพอลิเมอร์ได้ง่ายขึ้น (Ferracane, 2006; Malacarne และคณะ, 2006)

ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาการดูดซับน้ำและการละลายตัวของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์เพิ่มเติมในอนาคตอาจทำการทดสอบโดยอาจปรับเปลี่ยนสัดส่วนมอนอเมอร์องค์ประกอบในเรซินผสมซึ่งอาจช่วยลดการดูดซับน้ำรวมถึงการละลายตัวได้ (Sideridou และคณะ, 2002) สำหรับการทดสอบในกลุ่มทดสอบวัสดุยี่ห้อเดลดันและทีซท์เมทเอฟ-วันไม่พบความแตกต่างเมื่อเทียบกับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก ส่วนหนึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างขององค์ประกอบของมอนอเมอร์ในวัสดุโดยเฉพาะอย่างยิ่งในวัสดุยี่ห้อทีซท์เมทเอฟ-วันที่มีมอนอเมอร์หลายชนิดที่มีลักษณะชอบน้ำ (Hydrophilicity) เช่น ไฮดรอกซีเมทาคริเลท (Hydroxymethylmethacrylate; HEMA) หรือเมทาคริลอิลออกซีเดคิลไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Methacryloyldecyl dihydrogenphosphate; MDP) เป็นต้น การมีมอนอเมอร์ประเภทนี้อยู่ในโครงสร้างปริมาณมากอาจจะส่งผลเกิดการบวมตัวของโครงสร้างพอลิเมอร์โดยรวมและปลดปล่อยมอนอเมอร์ที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกมาได้เร็วและมาก (Ferracane และคณะ, 1998; Brazel และ Peppas, 1999)

การทดสอบความแข็งแรงเป็นการทดสอบเพื่อใช้ประเมินความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาการแข็งตัวของวัสดุซึ่งอาจไม่สมบูรณ์หากได้รับแสงที่มีปริมาณไม่เพียงพอ (Versluis และคณะ, 2004;

Santos และคณะ, 2007) การศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าความแข็งผิวของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวีสเกอร์มีค่าสูงสุด ( $18.2300 \pm 0.8535$ ) มากกว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ และวัสดุกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สาเหตุที่ค่าความแข็งผิวของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์มีค่าไม่สูงนักอาจเนื่องมาจากโคโตซานวีสเกอร์มีคุณสมบัติเป็นพอลิเมอร์ที่มีความอ่อนนิ่มเมื่อถูกนำไปผสมในพอลิเมอร์ที่มีความแข็งกว่าก็อาจทำให้ค่าความแข็งโดยรวมของวัสดุลดลงได้ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์พบว่าวีสเกอร์บางส่วนเกิดการเกาะกลุ่มกันจึงมีความเป็นไปได้ที่จะทำให้ความแข็งผิวลดลง โดยปกติวัสดุที่มีความแข็งกว่ามักจะมีอัตราการสึกที่ต่ำกว่าแต่หากพิจารณาถึงสภาพการใช้งานจริงของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่แทรกเข้าไปภายในหลุมและร่องฟัน ความแข็งผิวจึงอาจมิใช่ปัจจัยสำคัญสำหรับอัตราการคงอยู่และความสำเร็จในการใช้งานของวัสดุในหลุมร่องฟัน หากพิจารณาสมบัติเชิงกลของวัสดุในมุมกว้างที่แม้ว่าค่าความแข็งผิวอาจไม่สูงนักแต่เมื่อพิจารณาถึงค่าอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของโคโตซานวีสเกอร์ที่สังเคราะห์ได้จะพบว่ามีค่าเท่ากับ 10.98 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงสัดส่วนความยาวของเส้นใยที่สามารถรับแรงได้เป็นอย่างดีเมื่อวีสเกอร์ได้รับแรงจากการบดเคี้ยวจะทำให้เกิดการกระจายแรงไปตามเส้นใย ทำให้วัสดุมีความยืดหยุ่นมากขึ้นและทนทานต่อแรงบดเคี้ยวได้ดีขึ้นแม้ว่าจะมีความแข็งน้อยลง จึงเป็นข้อเสนอแนะในอนาคตถึงการทดสอบเพิ่มเติมเช่น การตรวจสอบค่ามอดูลัสความยืดหยุ่นเพื่อเป็นข้อมูลประกอบเพิ่มเติมถึงความสามารถของวีสเกอร์ที่เสริมในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซิน

การศึกษานี้ได้ศึกษาเฉพาะความแข็งผิวที่ได้จากเครื่องวัดความแข็งผิวระดับจุลภาคซึ่งไม่สามารถตรวจสอบค่ามอดูลัสความยืดหยุ่นของวัสดุเสริมเส้นใยโคโตซานวีสเกอร์ได้จากเครื่องวัด แม้ว่าจะเลือกใช้การทดสอบความแข็งผิวด้วยเครื่องทดสอบเชิงกลชนิดอื่นเช่น เครื่องทดสอบแรงกลชนิดลอยด์ (Lloyd machine) แต่ก็อาจพบข้อจำกัดในเรื่องการบดตัวอย่างมากของชิ้นงานที่เตรียมจากวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่มีส่วนผสมเป็นสารเรซิน ทำให้เกิดแรงเสียดทานระหว่างชิ้นงานกับฐานวางส่งผลให้ค่ามอดูลัสที่ได้มีความคลาดเคลื่อน การศึกษาด้วยเครื่องทดสอบความแข็งผิวในระดับนาโน (nanohardness tester) จึงมีความเป็นไปได้ในอนาคตหากต้องการตรวจสอบค่ามอดูลัสความยืดหยุ่นโดยเครื่องทดสอบชนิดนี้มีข้อดีคือ สามารถวัดค่าความแข็งผิวจากการวัดพื้นที่รอยกดจริงทุกขณะของการกดทั้งในขณะโหลดและอันโหลดอย่างต่อเนื่องรวมถึงการคำนวณค่ามอดูลัสยืดหยุ่นทุกขณะกดได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามการทดสอบความแข็งผิวในระดับนาโนยังมีข้อด้อยในเรื่องความยุ่งยากในการเตรียมชิ้นงานที่ต้องมีความเรียบมากและวางขนานในแนวระนาบให้มากที่สุด



เท่าที่จะทำได้ นอกจากนี้การสิ้นสະเทือนหรืออุณหภูมิโดยรอบขณะทำการวัดยังมีผลต่อความเที่ยงตรง (Fischer-Cripps, 2004)

คุณสมบัติที่มีความสำคัญประการหนึ่งสำหรับพอลิเมอร์คือ อัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่เนื่องจากเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาการแข็งตัวรวมถึงสมบัติเชิงกลในด้านต่างๆ นอกจากนี้ความไม่สมบูรณ์ของปฏิกิริยาอาจทำให้เกิดการปลดปล่อยมอนอเมอร์ที่ไม่เกิดปฏิกิริยาส่งผลต่อสมบัติทางชีวภาพได้และยังอาจส่งผลในแง่ความสวยงามทางคลินิกเช่น การเกิดออกซิเดชันหรือการย่อยสลายมอนอเมอร์ที่ไม่ทำปฏิกิริยาบนพื้นผิว ส่งผลในเรื่องของการเปลี่ยนสีหรือทำให้วัสดุเกิดการสีกรึเขียวขึ้น (Sideridou และคณะ, 2002) การศึกษาครั้งนี้พบว่า อัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวีสเกอร์และวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักใกล้เคียงกับวัสดุเรซินที่มีองค์ประกอบพื้นฐานจำพวกไดเมทาคริเลทโดยทั่วไปที่ร้อยละ 65 โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างวัสดุสองกลุ่มนี้ ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากวัสดุทั้งสองมีมอนอเมอร์องค์ประกอบชนิดเดียวกัน (Imazato และคณะ, 2001)

การไหลแผ่ที่ติของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเป็นคุณสมบัติที่ช่วยให้วัสดุใช้งานง่ายและมีประสิทธิภาพดีในการฉีกในหลุมร่องฟัน ลักษณะการไหลแผ่ของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่มีความเหมาะสมคือ ไม่เหลวเกินไปเพราะจะทำให้ไม่สามารถกำหนดขอบเขตของวัสดุได้หรือข้นจนเกินไปจนทำให้ไม่เกิดการไหลแผ่เข้าไปในหลุมร่องฟันได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยธรรมชาติของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินซึ่งเป็นของเหลวแบบนอน-นิวโทเนียนจะมีความหนืดต่ำ การกวนหรือเขย่าวัสดุอย่างเบามือจะทำให้มีลักษณะไหลแผ่ได้มากขึ้นเล็กน้อย การศึกษาครั้งนี้พบว่ากรรมผสมเส้นใยโคโตซานวีสเกอร์ซึ่งจัดเป็นวัสดุอัดแทรกประเภทหนึ่งลงในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินส่งผลให้วัสดุมีความหนืดเพิ่มขึ้น (Beun และคณะ, 2008) การศึกษานำร่องการเสริมเส้นใยโคโตซานวีสเกอร์ลงในวัสดุครั้งนี้พบว่า ปริมาณวีสเกอร์มากกว่าร้อยละ 2.5 ไม่สามารถผสมให้เข้ากันได้กับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินโดยพบว่าวัสดุภายหลังผสมมีความหนืดมากและวีสเกอร์รวมเป็นก้อนขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาปัจจัยของความหนืดที่อาจส่งผลต่อความสามารถในการแทรกซึมของวัสดุในหลุมร่องฟันเพื่อการพัฒนาวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเพื่อให้ใช้งานได้ดี อาจจำเป็นต้องศึกษาผลของความหนืดที่ต่างกันที่ส่งผลถึงความสามารถในการแทรกซึม

การประเมินการรั่วซึมตามขอบของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันในห้องปฏิบัติการ จำเป็นต้องอาศัยวิธีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของซินทอสอบ (thermo cycling) เนื่องจากเป็นวิธีการที่

ช่วยเร่งกระบวนการสะสมความเครียดโดยเลียนแบบความเครียดสะสมที่เกิดจากอุณหภูมิ (thermal stress) ในตัววัสดุในช่องปากที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตลอดเวลา สาเหตุที่ทำให้เกิดการรั่วซึมตามขอบจากอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงเชื่อว่าเกิดจากค่าสัมประสิทธิ์การขยายตัวทางความร้อน (thermal expansion coefficient) ของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน (26-60 ppm/°C) ที่มากกว่าผิวเคลือบฟัน (11.4 ppm/°C) ทำให้เกิดการหดและขยายตัวของวัสดุและผิวเคลือบฟันไม่เท่ากันส่งผลให้เกิดการหลุดลอกหรือร้าวบริเวณขอบเป็นจุดแรก (Versluis และคณะ, 1996; McCabe และ Walls, 1998) โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับคือ ช่วงอุณหภูมิที่ใช้ จำนวนรอบ (thermal cycles) และระยะเวลาในการแช่ขึ้นทดสอบ (immersion time) การศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ระยะเวลาในการแช่ขึ้นทดสอบ 30 วินาที โดยใช้ช่วงอุณหภูมิ 5 ถึง 55 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่มีความใกล้เคียงกับสภาพการใช้งานจริงทางคลินิก (Koyuturk และคณะ, 2008) การทดสอบจะกระทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจำนวน 10,000 รอบซึ่งเทียบเท่ากับระยะเวลาการใช้งานในช่องปากประมาณ 1 ปี (Gale และ Darvell, 1999; Koyuturk และคณะ, 2006)

การศึกษาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการรั่วซึมตามขอบพบว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักพบการรั่วซึมตามขอบมากกว่าวัสดุไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์เล็กน้อยโดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวัสดุทั้งสองกลุ่มมีระดับการรั่วซึมตามขอบเฉลี่ยอยู่ในระดับที่ 1 ซึ่งเป็นการรั่วซึมตามขอบเข้าไปในช่วงครึ่งบนของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน สอดคล้องกับการศึกษาวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่พบการรั่วซึมตามขอบบนผิวฟันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดแต่เพียงอย่างเดียว (Park และคณะ, 1993) เมื่อพิจารณาในแง่ปัจจัยความหนืดของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่มีผลต่อการรั่วซึมตามขอบพบว่า โดยทั่วไปวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่มีความหนืดมากจะไหลแผ่ได้ยากกว่าและทำให้เกิดความรั่วซึมตามขอบได้มากกว่าวัสดุที่มีความหนืดน้อยกว่า แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าความหนืดที่แตกต่างกันระหว่างวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมและไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์ไม่มีผลต่อการรั่วซึมตามขอบสอดคล้องกับการศึกษาวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินที่มีความหนืดต่างกัน 6 ชนิดที่มีระดับการรั่วซึมไม่แตกต่างกันโดยให้เหตุผลว่าปัจจัยที่น่าจะส่งผลต่อความแตกต่างของระดับการรั่วซึมตามขอบไม่น่าจะเกิดจากความหนืดที่ต่างกันแต่น่าจะเกิดจากปัจจัยที่มาจากผิวเคลือบฟัน

การปรับสภาพผิวเคลือบฟันด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การขัดด้วยหัวกรอหรือการใช้สารบอนด์ร่วมกับการใช้กรดฟอสฟอริก เป็นวิธีการที่ใช้ปรับเปลี่ยนปัจจัยของผิวเคลือบฟันที่อาจมีผลต่อการรั่วซึมตามขอบ วิธีการดังกล่าวเป็นการเพิ่มพลังงานผิว (surface energy) ให้มากขึ้นช่วยให้วัสดุ

เกิดการไหลแม่ได้มากขึ้น (Barnes และคณะ, 2000) ทั้งนี้มีการศึกษาที่แนะนำการใช้สารบอนด์ร่วมกับวัสดุที่มีความหนืดมากเพื่อช่วยเพิ่มการยึดติดกับผิวเคลือบฟันเนื่องจากสารบอนด์จะช่วยลดความตึงผิวหรือฟองอากาศที่มักเกิดขึ้นและช่วยเพิ่มความแนบสนิทตามขอบภายหลังการทาวด์เคลือบหลุมร่องฟันบนผิวฟันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดเพียงอย่างเดียว (Barnes และคณะ, 2000; Stavridakis และคณะ, 2003; Hannig และคณะ, 2004) ทั้งยังช่วยลดระดับการรั่วซึมตามขอบได้แม้วัสดุจะผ่านการแช่น้ำไว้นานถึง 4 ปี (Cehreli และ Gungor, 2008) หรือช่วยลดการรั่วซึมแม้ผิวฟันมีการปนเปื้อนจากน้ำลาย (Hebling และ Feigal, 2000) จึงอาจเป็นข้อแนะนำถึงการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตถึงปัจจัยในเรื่องความหนืดของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ที่มีต่อระดับการรั่วซึมตามขอบโดยเพิ่มขั้นตอนการใช้สารบอนด์เปรียบเทียบกับการใช้กรดในการปรับสภาพผิวฟันแต่เพียงอย่างเดียว

การทดสอบสมบัติทางชีวภาพเป็นการทดสอบที่มีความสำคัญและจำเป็นต่อการนำวัสดุไปใช้งานทางคลินิก การทดสอบครั้งนี้เลือกใช้การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงโดยเลือกใช้เซลล์สายพันธุ์ไฟโบรบลาสต์จากหนูชนิด L929 เนื่องจากเป็นเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงง่ายสามารถทำการศึกษาซ้ำได้ (reproducibility) เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดเป็นเซลล์สายพันธุ์จึงมีลักษณะรูปร่าง เมทาบอลิซึมและรูปแบบการเจริญเติบโตคล้ายคลึงกันแม้ว่าจะผ่านการเลี้ยงไปหลายรุ่น (Schmalz, 1994) ต่างจากเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อโดยตรงที่มักมีช่วงชีวิตสั้นและเกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานเมื่อผ่านการเลี้ยงไปหลายรุ่น (Thonemann และคณะ, 2002) อีกทั้งเป็นหนึ่งในเซลล์สายพันธุ์ที่ถูกกำหนดไว้ตามมาตรฐานตามการทดสอบมาตรฐานสากลไอเอสไอ 10993-5:2009 ซึ่งนำมาใช้เป็นต้นแบบวิธีการวิจัยในส่วนนี้ การศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบความเป็นพิษจากการสัมผัสชั้นทดสอบของเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งจากการสัมผัสโดยตรงและการสัมผัสมอนอเมอร์ที่ปลดปล่อยออกมาจากชั้นทดสอบ (leached monomer) ซึ่งวิธีการทดสอบดังกล่าวนอกจากจะถูกกำหนดไว้ในขั้นตอนการทดสอบตามมาตรฐานสากลแล้วยังมีประโยชน์ต่อการประเมินวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่ต้องมีการสัมผัสโดยตรงกับเซลล์ในช่องปากและสามารถปลดปล่อยมอนอเมอร์ที่หลงเหลือจากปฏิกิริยาออกสู่ช่องปากได้

ข้อมูลจากการศึกษาร้อยละอัตราการอยู่รอดของเซลล์ภายหลังการสัมผัสวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานร้อยละ 2 โดยน้ำหนักและไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วงร้อยละ 84 ถึง 88 จากการสัมผัสโดยตรงและ 94 ถึง 95 จากการสัมผัสอาหารเลี้ยงเซลล์ทดสอบซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับวัสดุควบคุมทางลบคือ 90 และ 97 ตามลำดับ ผลการทดสอบความ

เป็นพิษของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ที่อยู่ในระดับต่ำอาจเกิดจากการเตรียมชั้นทดสอบในการศึกษาในครั้งนี้ที่ใช้การฉายแสงผ่านกระจกสไลด์ที่ปิดอยู่บนผิวหน้าวัสดุที่ยังไม่แข็งตัว ซึ่งเป็นวิธีการที่ป้องกันไม่ให้เกิดผิวหน้าวัสดุเกิดการสัมผัสกับออกซิเจนในบรรยากาศขณะเกิดปฏิกิริยาแข็งตัวและไม่ทำให้เกิดชั้นออกซิเจนอินฮิบิเต็ด (oxygen inhibited layer) ที่มีปฏิกิริยาการแข็งตัวไม่สมบูรณ์ ซึ่งทดสอบที่ได้จึงมีปฏิกิริยาการแข็งตัวสมบูรณ์กว่าและพบมอนอเมอร์ที่หลงเหลือจากปฏิกิริยาน้อยกว่าบริเวณผิวหน้าซึ่งมีการศึกษาพบว่า มอนอเมอร์ที่ไม่เกิดปฏิกิริยาซึ่งหลงเหลือในชั้นนี้เป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Rueggeberg และคณะ, 1999; Al-Hiyasat และคณะ, 2005) เซลล์บางส่วนที่ถูกทำลายไปเป็นผลมาจากมอนอเมอร์อิสระที่หลงเหลือจากปฏิกิริยา (unreact monomer) ซึ่งถูกปลดปล่อยออกจากวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันสอดคล้องกับการศึกษาอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ของวัสดุทั้งสองก่อนหน้าที่พบอัตราการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 57 ถึง 60 ซึ่งอยู่ในช่วงปกติของเรซินประเภทไดเมทาคริเลต (Santerre และคณะ, 2001) จึงมีความเป็นไปได้ว่ามอนอเมอร์อิสระที่หลงเหลืออยู่จะถูกปลดปล่อยออกจากวัสดุได้ คำอธิบายดังกล่าวอาจสามารถใช้อธิบายวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อที่ซัทเมทเอฟ-วันได้เช่นกันเนื่องจากเป็นวัสดุที่มีอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ต่ำกว่าร้อยละ 50 จึงอาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์เพียงเล็กน้อยมากกว่าวัสดุกลุ่มอื่นสำหรับวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน แม้ว่าจะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ถึงร้อยละ 70 แต่พบร้อยละอัตราการคงอยู่ของเซลล์จากการสัมผัสโดยตรงและโดยอ้อมเพียงร้อยละ 48 และ 73 ตามลำดับ ส่วนหนึ่งน่าจะมาจากการมีมอนอเมอร์ องค์ประกอบอื่นในวัสดุที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยพบว่า วัสดุยี่ห้อเดลดันมีสารบิสฟีนอล-เอ ไดเมทาคริเลต (bisphenol-A dimethacrylate) ในสัดส่วนร้อยละ 2 โดยน้ำหนักมอนอเมอร์รวมซึ่งมีความเป็นพิษสูงกว่าสารบิสฟีเอมเอและทีอีจีดีเอมเอ (Nathanson และคณะ, 1997; Rueggeberg และคณะ, 1999) นอกจากนี้ยังมีมอนอเมอร์ทีอีจีดีเอมเอในปริมาณสูงถึงร้อยละ 50 ซึ่งมีรายงานความเป็นพิษอย่างสูงของมอนอเมอร์ชนิดนี้และอาจมีฤทธิ์เสริมกันของมอนอเมอร์องค์ประกอบแต่ละชนิด (synergistic effect) (Ratanasathien และคณะ, 1995; Schmalz, 1998; Geurtsen และ Leyhausen, 2001) อย่างไรก็ตามวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินมักประกอบด้วยมอนอเมอร์ หลายชนิดซึ่งมีรายงานความเป็นพิษของมอนอเมอร์แต่ละชนิดไม่เท่ากัน การตรวจหาปริมาณมอนอเมอร์องค์ประกอบแต่ละชนิดที่ปลดปล่อยออกมาในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันชนิดเรซินด้วยวิธีการโครมาโทกราฟีจึงเป็นสิ่งที่น่าศึกษาต่อไปในอนาคตเพื่อแสดงความจำเพาะของมอนอเมอร์แต่ละชนิดที่กระตุ้นให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์ (Uzunova และคณะ, 2008)

นอกจากนี้การศึกษาความเป็นพิษกับเซลล์ที่ได้จากในช่องปากจริง (primary cell) ยังเป็นสิ่งที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีรูปแบบการเจริญเติบโตต่างกับเซลล์สายพันธุ์และใกล้เคียงกับสภาพการใช้งานจริงของวัสดุโดยมีรายงานการศึกษาความเป็นพิษของมอนอเมอร์ ประเภทไดเมทาคริเลตต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือก (gingival fibroblast) ส่วนใหญ่พบว่า บิส-จีเอ็มเอ และทีอีจีดีเอ็มเอมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่ามอนอเมอร์ชนิดอื่น (Issa และคณะ, 2004; Moharamzadeh และคณะ, 2007)

การศึกษาความเป็นพิษของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ไม่พบความแตกต่างเมื่อเทียบกับวัสดุควบคุมทางลบทั้งจากการสัมผัสโดยตรงและโดยอ้อม ทั้งนี้อาจเกิดจากสมบัติความเข้ากันได้ทางชีวภาพของตัวเส้นใยโคโตซานวิสเกอร์เองที่เป็นสารสกัดจากพอลิเมอร์ธรรมชาติ สามารถย่อยสลายด้วยกลไกการย่อยสลายในร่างกายโดยไม่เกิดอันตรายทั้งในระดับร่างกายและเซลล์ (Kurita, 2006; Rinaudo, 2006) สอดคล้องกับการศึกษาที่นำสารโคโตซานและอนุพันธ์ของโคโตซานมาผสมลงในวัสดุอื่นๆ อาทิเช่น การศึกษาแผ่นฟิล์มพอลิเอทิลีนไกลคอลไดอะคริเลตเสริมสารโคโตซาน (chitosan/polyethylene glycol diacrylate films) ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยพบว่า เซลล์มีรูปร่างปกติและสามารถยึดเกาะได้บนแผ่นฟิล์ม (Zhang และคณะ, 2008) หรือการศึกษาความเป็นพิษของนาโนสแคฟโฟลด์ผสมระหว่างโคโตซานกับพอลิไวนิลอะซีเตตเสริมไฮดรอกซีอะพาไทต์ (chitosan/PVA with hydroxyapatite biocomposite nanoscaffolds) ที่ไม่พบความเสียหายของเซลล์และยังถูกแนะนำให้ใช้เพื่อเป็นโครงร่างของเซลล์ในร่างกายได้ (Yang และคณะ, 2008) เป็นต้น ทำให้จัดได้ว่าการเสริมโคโตซานในรูปแบบวิสเกอร์ลงในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันมีความปลอดภัยต่อร่างกาย

การศึกษานี้ได้บรรจุเป้าหมายในการพัฒนาวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเรซินที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยประสิทธิภาพของวัสดุในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้มาจากโคโตซานที่ผ่านการสังเคราะห์และเตรียมให้อยู่ในรูปแบบวิสเกอร์ขนาดนาโนเมตรด้วยวิธีการทางเคมีซึ่งน่าจะสามารรถซึมผ่านออกจากวัสดุและมีผลต่อแบคทีเรียที่สัมผัสในลักษณะแปรผันตรงกับความเข้มข้น ประสิทธิภาพดังกล่าวยังคงอยู่ภายหลังจากผสมลงวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน ในส่วนของสมบัติกายภาพการผสมโคโตซานวิสเกอร์ลงในวัสดุไม่ทำให้ความลึกของการแข็งตัว การดูดซับน้ำ อัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่และระดับการรั่วซึมตามขอบแตกต่างจากวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่ไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์มากนัก แม้ว่าจะมีค่าการละลายน้ำสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานเพียงเล็กน้อยก็ตาม อย่างไรก็ตามการเสริมวิสเกอร์ในวัสดุส่งผลให้วัสดุมีความเหนียวมากขึ้นและไม่ได้ช่วยให้วัสดุมีความ

แข็งเพิ่มขึ้นเท่าใดนักซึ่งอาจจะไม่ได้ส่งผลเสียต่อวัสดุในภาพรวมภายหลังจากการใช้งานโดยอาจทำให้วัสดุมีความเหนียวมากขึ้น ทนทานต่อแรงบิดเคี้ยวดีขึ้นจากโคโตซานวีสเกอร์ที่เสริมเข้าไปซึ่งเป็นข้อแนะนำสำหรับการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต สำหรับการศึกษาศสมบัติทางชีวภาพทำให้เชื่อได้ว่าวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์มีความปลอดภัยในการนำไปใช้งานทางคลินิกระดับหนึ่ง

### ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาการใช้สารไซเลนหรือสารลดแรงตึงผิวร่วมกับการเสริมวัสดุเพื่อช่วยส่งเสริมการกระจายตัวและช่วยให้วัสดุเกิดการเชื่อมต่อกับเรซินเมทริกซ์ดียิ่งขึ้น
2. การศึกษาสมบัติด้านจุลชีพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์เพิ่มเติมในแบคทีเรียอื่นที่มีบทบาทสำคัญในไบโอฟิล์ม (biofilm) บนผิวฟัน
3. การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในระยะยาวเพื่อเลียนแบบสภาพการใช้งานจริงในช่องปาก
4. การศึกษาสมบัติทางกายภาพเพิ่มเติมเช่น การตรวจสอบค่ามอดูลัสความยืดหยุ่น หรือความต้านทานการสึกบนผิวเคลือบฟันเพื่อทำนายความสามารถของวัสดุหลังการนำไปใช้ในช่องปาก เป็นต้น
5. การศึกษาความเป็นพิษของต่อเซลล์จากเนื้อเยื่อในช่องปากโดยตรงที่อาจตอบสนองแตกต่างเซลล์สายพันธุ์
6. การศึกษาในสัตว์ทดลอง
7. การศึกษาประสิทธิภาพการใช้งานทางคลินิกในระยะยาว เช่น การศึกษาอัตราการยึดอยู่ของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันภายหลังการใช้งาน เป็นต้น

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

สาธารณสุข, กระทรวง (2550). รายงานผลการสำรวจสภาวะทันตสุขภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 6 พ.ศ.2549-2550. กรุงเทพมหานคร, สามเจริญพานิชย์

สุชาติ พูลทอง, อนุชาติ ศรีจันบาล, มารศรี อุชชิน, ประสิทธิ์ ภาวสันต์, สุภาภรณ์ จงวิศาลและดารณี ตัณฑ์ไพโรจน์ (2547). การพัฒนาวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันสำหรับใช้ในประเทศ 1: การทดสอบสมบัติทางกายภาพ. วิทยาศาสตร์ทันตแพทยศาสตร์ 54(3): 141-147.

สุภาภรณ์ จงวิศาล, มนต์ชัย ซาลาประวรรตน์, วรพรรณ พึ่งรักเกียรติ, สุชาติ พูลทองและดารณี ตัณฑ์ไพโรจน์ (2547). การพัฒนาวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันสำหรับใช้ในประเทศ 4: การศึกษาทางคลินิกเมื่อติดตามผล 6 เดือน. วิทยาศาสตร์ทันตแพทยศาสตร์ 54(4): 224-234.

อนุชาติ ศรีจันบาล, ประสิทธิ์ ภาวสันต์, สุชาติ พูลทอง, มารศรี อุชชิน, สุภาภรณ์ จงวิศาลและดารณี ตัณฑ์ไพโรจน์ (2547). การพัฒนาวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันสำหรับใช้ในประเทศ 2 : ความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงและความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในสัตว์ทดลอง. วิทยาศาสตร์ทันตแพทยศาสตร์ 53(3): 149-155.

อสมมา ปาลเดชพงศ์ (2548). สมบัติทางกายภาพของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันที่เสริมเส้นใยวิสเกอร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาวิชาทันตกรรมหัตถการ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

### ภาษาอังกฤษ

Aiba, S. 1986. Studies on chitosan: 1. Determination of the degree of N-acetylation of chitosan by ultraviolet spectrophotometry and gel permeation chromatography. International Journal Biological Macromolecules 8: 173-176.

Al-Hiyasat, A. S., Darmani, H. and Milhem, M. M. 2005. Cytotoxicity evaluation of dental resin composites and their flowable derivatives. Clinical Oral Investigates 9(1): 21-5.



- Arcidiacono, S. and Kaplan, D. L. 1992. Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions. Biotechnology Bioengineering 39(3): 281-6.
- Atsumi, T., Murata, J., Kamiyanagi, I., Fujisawa, S. and Ueha, T. 1998. Cytotoxicity of photosensitizers camphorquinone and 9-fluorenone with visible light irradiation on a human submandibular-duct cell line in vitro. Archives of Oral Biology 43(1): 73-81.
- Bae, K., Jun, E. J., Lee, S. M., Paik, D. I. and Kim, J. B. 2006. Effect of water-soluble reduced chitosan on *Streptococcus mutans*, plaque regrowth and biofilm vitality. Clinical Oral Investigates 10(2): 102-7.
- Barnes, D. M., Kihn, P., von Fraunhofer, J. A. and Elsabach, A. 2000. Flow characteristics and sealing ability of fissure sealants. Operative Dentistry 25(4): 306-10.
- Barszczewska-Rybarek, I. M. 2009. Structure-property relationships in dimethacrylate networks based on Bis-GMA, UDMA and TEGDMA. Dental Materials 25(9): 1082-9.
- Baxter, A., Dillon, M., Taylor, K. D. and Roberts, G. A. 1992. Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. International Journal Biological Macromolecules 14(3): 166-9.
- Beirut, N., Frencken, J. E., van 't Hof, M. A. and van Palenstein Helder, W. H. 2006. Caries-preventive effect of resin-based and glass ionomer sealants over time: a systematic review. Community Dentistry and Oral Epidemiology 34(6): 403-9.
- Beun, S., Bailly, C., Devaux, J. and Leloup, G. 2008. Rheological properties of flowable resin composites and pit and fissure sealants. Dental Materials 24(4): 548-55.
- Borem, L. M. and Feigal, R. J. 1994. Reducing microleakage of sealants under salivary contamination: digital-image analysis evaluation. Quintessence International 25(4): 283-9.

- Bouillaguet, S., Shaw, L., Gonzalez, L., Wataha, J. C. and Krejci, I. 2002. Long-term cytotoxicity of resin-based dental restorative materials. Journal of Oral Rehabilitation 29(1): 7-13.
- Bowen, R. L. 1963. Properties of a silica-reinforced polymer for dental restorations. Journal of American Dental Association 66: 57-64.
- Boyer, H. E. 1987. Hardness testing. Metal Parks: ASM International.
- Brazel, C. S. and Peppas, N. A. 1999. Dimensionless analysis of swelling of hydrophilic glassy polymers with subsequent drug release from relaxing structures. Biomaterials 20(8): 721-32.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goyoolea, F. M., Arguelles-Monal, W., Desbrieres, J. and Rinaudo, M. 2001a. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. Polymer 42: 3569-3580.
- Buonocore, M. G. 1955. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. Journal of Dental Research 34(6): 849-53.
- Cehreli, Z. C. and Gungor, H. C. 2008. Quantitative microleakage evaluation of fissure sealants applied with or without a bonding agent: results after four-year water storage in vitro. Journal of Adhesive Dentistry 10(5): 379-84.
- Corrales, T., Catalina, F., Peinado, C. and Allen, N. S. 2003. Free radical macrophotopolymerization: an overview on recent advances. Journal of Photochemistry and Photobiology A:Chemistry 159: 103-114.
- Craig, R. G. and Powers, J. M. 2002. Restorative dental materials 11th, St. Louis: Mosby.
- Cueto, E. I. 1965. Adhesive sealing of pits and fissure for caries prevention. Journal of Dental Research 1965: 44-137.

- Cueto, E. I. 1967. Sealing of pits and fissure with an adhesive resin: its use in caries prevention. The Journal of American Dental Association 75: 121-128.
- Darmani, H., Al-Hiyasat, A. S. and Milhem, M. M. 2007. Cytotoxicity of dental composites and their leached components. Quintessence International 38(9): 789-95.
- Decker, E. M., von Ohle, C., Weiger, R., Wiech, I. and Brex, M. 2005. A synergistic chlorhexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies. Journal of Periodontal Research 40(5): 373-7.
- Dickens, S. H., Stansbury, J. W., Choi, K. M. and Floyd, C. J. E. 2003. Photopolymerization kinetics of methacrylate dental resins. Macromolecules 36: 6043-53.
- Domszy, J. G. and Roberts, G. A. F. 1985. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. Die Makromolekulare Chemie 186: 1671-1677.
- Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvao, M. R. and Rocha, J. 2002. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. International Journal Biological Macromolecules 31(1-3): 1-8.
- Elliott, J. E., Lovell, L. G. and Bowman, C. N. 2001. Primary cyclization in the polymerization of bis-GMA and TEGDMA: a modeling approach to understanding the cure of dental resins. Dental Materials 17(3): 221-9.
- Ergucu, Z., Hiller, K. A. and Schmalz, G. 2005. Influence of dentin on the effectiveness of antibacterial agents. Journal of Endodontics 31(2): 124-9.
- Ferracane, J. L. 1985. Correlation between hardness and degree of conversion during the setting reaction of unfilled dental restorative resins. Dental Materials 1(1): 11-4.
- Ferracane, J. L. 1994. Elution of leachable components from composites. Journal of Oral Rehabilitation 21(4): 441-52.

- Ferracane, J. L. 2006. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. Dental Materials 22(3): 211-22.
- Ferracane, J. L., Aday, P., Matsumoto, H. and Marker, V. A. 1986. Relationship between shade and depth of cure for light-activated dental composite resins. Dental Materials 2(2): 80-4.
- Ferracane, J. L., Berge, H. X. and Condon, J. R. 1998. In vitro aging of dental composites in water--effect of degree of conversion, filler volume, and filler/matrix coupling. Journal of Biomedical Materials Research 42(3): 465-72.
- Ferracane, J. L. and Greener, E. H. 1984. Fourier transform infrared analysis of degree of polymerization in unfilled resins--methods comparison. Journal of Dental Research 63(8): 1093-5.
- Ferracane, J. L., Moser, J. B. and Greener, E. H. 1981. Rheology of composite restoratives. Journal of Dental Research 60(9): 1678-85.
- Floyd, C. J. and Dickens, S. H. 2006. Network structure of Bis-GMA- and UDMA-based resin systems. Dental Materials 22(12): 1143-9.
- Franz, A., Konig, F., Skolka, A., Sperr, W., Bauer, P., Lucas, T., Watts, D. C. and Schedle, A. 2007. Cytotoxicity of resin composites as a function of interface area. Dental Materials 23(11): 1438-46.
- Freund, M. and Munksgaard, E. C. 1990. Enzymatic degradation of BISGMA/TEGDMA-polymers causing decreased microhardness and greater wear in vitro. Scandinavian Journal Dental Research 98(4): 351-5.
- Fujisawa, S., Kadoma, Y. and Komoda, Y. 1988. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipid liposomes as a model system for odontoblast membranes. Journal of Dental Research 67(11): 1438-41.

- Gaffar, A., Afflitto, J. and Nabi, N. 1997. Chemical agents for the control of plaque and plaque microflora: an overview. Eur J Oral Sci 105(5 Pt 2): 502-7.
- Gale, M. S. and Darvell, B. W. 1999. Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. Journal of Dentistry 27(2): 89-99.
- Garcia-Godoy, F., Abarzua, I., De Goes, M. F. and Chan, D. C. 1997. Fluoride release from fissure sealants. Journal of Clinical Pediatric Dentistry 22(1): 45-9.
- Gerasimenko, D. V., Avdienko, I. D., Bannikova, G. E., Zueva, O. and Varlamov, V. P. 2004. Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. Applied Biochemistry and Microbiology 40(3): 253-257.
- Geurtsen, W. 1998. Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. European Journal of Oral Science 106(2 Pt 2): 687-95.
- Geurtsen, W. 2000. Biocompatibility of resin-modified filling materials. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 11(3): 333-55.
- Geurtsen, W. 2000. Biocompatibility of resin-modified filling materials. Crit Rev Oral Biol Med 11(3): 333-55.
- Geurtsen, W. and Leyhausen, G. 2001. Chemical-Biological Interactions of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA). Journal Dental Research 80(12): 2046-50.
- Gopferich, A. 1996. Mechanisms of polymer degradation and erosion. Biomaterials 17(2): 103-14.
- Guinesi, L. S. and Cavalheiro, E. T. G. 2006. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. Thermochimica Acta 444: 128-133.

- Hanks, C. T., Strawn, S. E., Wataha, J. C. and Craig, R. G. 1991. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. Journal of Dental Research 70(11): 1450-5.
- Hannig, M., Grafe, A., Atalay, S. and Bott, B. 2004. Microleakage and SEM evaluation of fissure sealants placed by use of self-etching priming agents. Journal of Dentistry 32(1): 75-81.
- Hayashi, Y., Ohara, N., Ganno, T., Yamaguchi, K., Ishizaki, T., Nakamura, T. and Sato, M. 2007. Chewing chitosan-containing gum effectively inhibits the growth of cariogenic bacteria. Archives of Oral Biology 52(3): 290-4.
- Hebling, J. and Feigal, R. J. 2000. Use of one-bottle adhesive as an intermediate bonding layer to reduce sealant microleakage on saliva-contaminated enamel. American Journal of Dentistry 13(4): 187-91.
- Heigl, J. J., Bell, M. F. and White, J. N. 1947. Application of Infrared Spectroscopy to the analysis of Liquid Hydrocarbon. Analytical Chemistry 19: 293-298
- Hirai, A., Odani, H. and Nakajima, A. 1991. Determination of degree of deacetylation of chitosan by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. Polymer Bulletin. 26: 87-94
- Imazato, S., McCabe, J. F., Tarumi, H., Ehara, A. and Ebisu, S. 2001. Degree of conversion of composites measured by DTA and FTIR. Dental Materials 17(2): 178-83.
- Issa, Y., Watts, D. C., Brunton, P. A., Waters, C. M. and Duxbury, A. J. 2004. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblasts in vitro. Dental Materials 20(1): 12-20.
- Jakubiak, J., Allonas, X., Fouassier, J. P., Sionkowska, A., Andrzejewska, E., Linden, L. A. and Rabek, J. F. 2003. Camphorquinone-amine photoinitiating systems for the initiation of free radical polymerization. Polymer 44: 5219-5226.

- Janda, R., Roulet, J. F., Latta, M. and Ruttermann, S. 2007. Water sorption and solubility of contemporary resin-based filling materials. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 82(2): 545-51.
- Jeon, Y. J., Park, P. J. and Kim, S. K. 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. Carbohydrate Polymers 44: 71-76.
- Kaga, M., Ito, Y., Okabe, T., Oguchi, H. and Ota, M. 1990. [Quantitative evaluation by measuring affected area for cytotoxicity of dental materials]. Shika Zairyo Kikai 9(4): 591-9.
- Kasaai, M. R. 2008. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. Carbohydrate Polymer 71: 497-508
- Kasaai, M. R. 2009. Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review. Journal of Agricultural Food Chemistry.
- Koyuturk, A. E., Akca, T., Yucel, A. C. and Yesilyurt, C. 2006. Effect of thermal cycling on microleakage of a fissure sealant polymerized with different light sources. Dental Material Journal 25(4): 713-8.
- Koyuturk, A. E., Kusgoz, A., Ulker, M. and Yesilyurt, C. 2008. Effects of mechanical and thermal aging on microleakage of different fissure sealants. Dental Material Journal 27(6): 795-801.
- Kurita, K. 2006. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. Mar Biotechnol (NY) 8(3): 203-26.
- Lamarque, G., Viton, C. and Domard, A. 2004. Comparative study of the first heterogeneous deacetylation of alpha- and beta-chitins in a multistep process. Biomacromolecules 5(3): 992-1001.

- Lee, J. H., Um, C. M. and Lee, I. B. 2006. Rheological properties of resin composites according to variations in monomer and filler composition. Dent Mater 22(6): 515-26.
- Li, Y., Leung, P., Yao, L., Song, Q. W. and Newton, E. 2006. Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles. J Hosp Infect 62(1): 58-63.
- Liu, X. F., Guan, Y. L., Yang, D. Z., Li, Z. and Yao, K. D. 2000. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan Journal of Polymer Science 79(7): 1324-1335.
- Loyola-Rodriguez, J. P. and Garcia-Godoy, F. 1996. Antibacterial activity of fluoride release sealants on mutans streptococci. Journal of Clinical Pediatric Dentistry 20(2): 109-11.
- Macosko, C. W. 1994. Rheology: Principles, Measurements, and Applications: WILEY-VCH.
- Malacarne, J., Carvalho, R. M., de Goes, M. F., Svizero, N., Pashley, D. H., Tay, F. R., Yiu, C. K. and Carrilho, M. R. 2006. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. Dental Materials 22(10): 973-80.
- Marchessault, R. H. and Morehed, F. F. 1959. Liquid crystal systems from fibrillar polysaccharides. Nature 184: 632-633.
- Marsh, P. D. 1991. Dentifrices containing new agents for the control of plaque and gingivitis: microbiological aspects. J Clin Periodontol 18(6): 462-7.
- Matalon, S., Slutzky, H., Mazor, Y. and Weiss, E. I. 2003. Surface antibacterial properties of fissure sealants. Pediatric Dentistry 25(1): 43-8.
- McCabe, J. F. 1985. Cure performance of light-activated composites by differential thermal analysis (DTA). Dental Materials 1(6): 231-4.
- McCabe, J. F. and Walls, A. W. 1998. Properties used to characterize materials. 8th Oxford: Blackwell Science.



- Meister, A. 1994. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. Cancer Research 54(7 Suppl): 1969s-1975s.
- Menon Preetha, V., Shashikiran, N. D. and Reddy, V. V. 2007. Comparison of antibacterial properties of two fluoride-releasing and a nonfluoride-releasing pit and fissure sealants. Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry 25(3): 133-6.
- Mills, R. W., Jandt, K. D. and Ashworth, S. H. 1999. Dental composite depth of cure with halogen and blue light emitting diode technology. Br Dent J 186(8): 388-91.
- Mima, S., Miya, M., Iwamoto, R. and Yoshikawa, S. 1983. Highly deacetylated chitosan and its properties. Journal Applied Polymer Science 28: 1909-1917.
- Miya, M., Iwamoto, R., Yoshikawa, S. and Mima, S. 1980. IR spectroscopic determination of CONH content in highly deacetylated chitosan International Journal of Biological Macromolecules 2(5): 323-324.
- Moharamzadeh, K., Van Noort, R., Brook, I. M. and Scutt, A. M. 2007. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. Dental Materials 23(1): 40-4.
- Moore, B. K., Platt, J. A., Borges, G., Chu, T. M. and Katsilieri, I. 2008. Depth of cure of dental resin composites: ISO 4049 depth and microhardness of types of materials and shades. Operative Dentistry 33(4): 408-12.
- Morphis, T. L., Toumba, K. J. and Lygidakis, N. A. 2000. Fluoride pit and fissure sealants: a review. International Journal of Paediatric Dentistry 10(2): 90-8.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods 65(1-2): 55-63.

- Muzzarelli, R. A. and Peter, M. G. 1997. Chitin Handbook.
- Muzzarelli, R. A., Tanfani, F., Scarpini, G. and Laterza, G. 1980. The degree of acetylation of chitins by gas chromatography and infrared spectroscopy. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 2(5): 299-306.
- Nanjo, F., Katsumi, R. and Sakai, K. 1991. Enzymatic method for determination of the degree of deacetylation of chitosan. Analytical Biochemistry 193(2): 164-7.
- Nathanson, D., Lertpitayakun, P., Lamkin, M. S., Edalatpour, M. and Chou, L. L. 1997. In vitro elution of leachable components from dental sealants. Journal of American Dental Association 128(11): 1517-23.
- Niola, F., Basora, N., Chornet, E. and Vidal, P. F. 1993. A rapid method for the determination of the degree of N-acetylation of chitin-chitosan samples by acid hydrolysis and HPLC. Carbohydrate Research 238: 1-9.
- No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H. and Meyers, S. P. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. International Journal of Food Microbiology 74(1-2): 65-72.
- Okano, K., Minagawa, T., Yang, J., Shimojoh, M. and Kurita, K. 2009. Amorphous reprecipitated chitosan as a novel morphological form. Polymer Bulletin. 62: 119-126.
- Ottoy, M. H., Varum, K. M. and Smidsrod, O. 1996. Compositional heterogeneity of heterogeneously deacetylated chitosans. Carbohydrate Polymer 29(1): 17-24.
- Paillet, M. and Dufresne, A. 2001. Chitin whisker reinforced thermoplastic nanocomposite. Macromolecules 34: 6527-6530.

- Park, K., Georgescu, M., Scherer, W. and Schulman, A. 1993. Comparison of shear strength, fracture patterns, and microleakage among unfilled, filled, and fluoride-releasing sealants. Pediatric Dentistry 15(6): 418-21.
- Pearson, G. J. and Longman, C. M. 1989. Water sorption and solubility of resin-based materials following inadequate polymerization by a visible-light curing system. Journal of Oral Rehabilitation 16(1): 57-61.
- Phongdara, A., Hualkasin, W., Wanna, W., Chanumpai, A. and Chotigeat, W. 2004. Species identification of white shrimps *Litopenaeus vannamei* and other *Penaeus* sp. by using PCR-RFLP of Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) gene. Songklanakarinn Journal of Science and Technology 26(4): 467-478.
- Phongying, S., Aiba, S. and Chirachanchai, S. 2007. Direct chitosan nanoscaffold formation via chitin whiskers. Polymer 48: 393-400.
- Pillai, C. K. S., Paul, W. and Sharma, C. P. 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. Progress in polymer science 34: 641-678.
- Prashanth, K. V. H., Kittur, F. S. and Tharanathan, R. N. 2002. Solid state structure of chitosan prepared under different N-acetylating conditions. Carbohydrate Polymer 50: 27-33
- Pulgar, R., Olea-Serrano, M. F., Novillo-Fertrell, A., Rivas, A., Pazos, P., Pedraza, V., Navajas, J. M. and Olea, N. 2000. Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. Environmental Health Perspective 108(1): 21-7.
- Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J. and Du, Y. 2006. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. Carbohydrate Polymer 63: 367-374.

- Rabea, E. I., Badawy, M. E., Stevens, C. V., Smagghe, G. and Steurbaut, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules 4(6): 1457-65.
- Ratanasathien, S., Wataha, J. C., Hanks, C. T. and Dennison, J. B. 1995. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. Journal of Dental Research 74(9): 1602-6.
- Rathke, T. D. and Hudson, S. M. 1993. Determination of the degree of N-acetylation in chitin and chitosan as well as their monomer sugar ratios by near infrared spectroscopy. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry 31: 749-753
- Raymond, L., Morin, F. G. and Marchessault, R. H. 1993. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid state NMR. Carbohydrate Research 246: 331-336.
- Reichl, F. X., Durner, J., Hickel, R., Kunzelmann, K. H., Jewett, A., Wang, M. Y., Spahl, W., Kreppel, H., Moes, G. W., Kehe, K., Walther, U., Forth, W. and Hume, W. R. 2001. Distribution and excretion of TEGDMA in guinea pigs and mice. Journal of Dental Research 80(5): 1412-5.
- Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan : Properties and application. Progress in Polymer Science 31: 603-632.
- Rueggeberg, F. A. and Craig, R. G. 1988. Correlation of parameters used to estimate monomer conversion in a light-cured composite. Journal of Dental Research 67(6): 932-7.
- Rueggeberg, F. A., Dlugokinski, M. and Ergle, J. W. 1999. Minimizing patients' exposure to uncured components in a dental sealant. Journal of American Dental Association 130(12): 1751-7.

- Rueggeberg, F. A., Hashinger, D. T. and Fairhurst, C. W. 1990. Calibration of FTIR conversion analysis of contemporary dental resin composites. Dental Materials 6(4): 241-9.
- Ruyter, I. E. 1995. Physical and chemical aspects related to substances released from polymer materials from polymer materials in an aqueous environment. Advanced in Dental Research 9: 344-347
- Ruyter, I. E. and Gyorosi, P. P. 1976. An infrared spectroscopic study of sealants. Scandinavian Journal of Dental Research 84(6): 396-400.
- Ruyter, I. E. and Svendsen, S. A. 1978. Remaining methacrylate groups in composite restorative materials. Acta Odontologica Scandinavica 36(2): 75-82.
- Sabnis, S. and Block, L. H. 1997. Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-acetylation of chitosan. Polymer Bulletin. 39(67-71).
- Sannan, T., Kurita, K. and Iwakura, Y. 1975. Studies on chitin (1). Die Makromolekulare Chemie 176: 1191-1195
- Sannan, T., Kurita, K. and Iwakura, Y. 1976. Studies on chitin. (2) Effect of deacetylation on solubility. Macromolecular Chemistry 177: 3589-3600.
- Sannan, T., Kurita, K., Ogura, K. and Iwakura, Y. 1978. Studies on chitin:(7) IR spectroscopic determination of degree of deacetylation. Polymer 19: 458-459.
- Santerre, J. P., Shajji, L. and Leung, B. W. 2001. Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 12(2): 136-51.
- Santos, G. B., Medeiros, I. S., Fellows, C. E., Muench, A. and Braga, R. R. 2007. Composite depth of cure obtained with QTH and LED units assessed by microhardness and micro-Raman spectroscopy. Operative Dentistry 32(1): 79-83.

- Schmalz, G. 1994. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. Journal of Dentistry 22 Suppl 2: S6-11.
- Schmalz, G. 1998. The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. European Journal of Oral Science 106(2 Pt 2): 696-706.
- Schweikl, H. and Schmalz, G. 1996. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. European Journal of Oral Science 104(3): 292-9.
- Schweikl, H. and Schmalz, G. 1999. Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells. Mutation Research 438(1): 71-8.
- Sekiya, K., Okamoto, A., Fukushima, M. and Iwaku, M. 1993. In vivo wear pattern of experimental composite resins based on different resin monomers. Dental Material Journal 12(2): 145-58.
- Shimahara, S. and Takigushi, Y. 1988. Biomass, Part B: Lignin, pectin, and chitin., NY: Newyork.
- Shimojoh, M., Masaki, K., Kurita, K. and Fukushima, K. 1996. Bactericidal effects of chitosan from squid pens on oral streptococci. Journal of Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry 70(7): 787-792.
- Shortall, A. C., Wilson, H. J. and Harrington, E. 1995. Depth of cure of radiation-activated composite restoratives--influence of shade and opacity. Journal of Oral Rehabilitation 22(5): 337-42.
- Sideridou, I., Tserki, V. and Papanastasiou, G. 2002. Effect of chemical structure on degree of conversion in light-cured dimethacrylate-based dental resins. Biomaterials 23(8): 1819-29.

- Sideridou, I., Tserki, V. and Papanastasiou, G. 2003. Study of water sorption, solubility and modulus of elasticity of light-cured dimethacrylate-based dental resins. Biomaterials 24(4): 655-65.
- Simonsen, R. J. 2002. Pit and fissure sealant: review of the literature. Pediatric Dentistry 24(5): 393-414.
- Spahl, W., Budzikiewicz, H. and Geurtsen, W. 1998. Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. Journal of Dentistry 26(2): 137-45.
- Sriupayo, J., Supapol, P. and Rujiravanit, R. 2005. Preparation and characterization of alpha-chitin whisker-reinforced chitosan nanocomposite films with or without heat treatment. Carbohydrate Polymer 62: 130-136.
- Stansbury, J. W. 2000. Curing dental resins and composites by photopolymerization. Journal of Esthetic Dentistry 12(6): 300-8.
- Stavridakis, M. M., Favez, V., Campos, E. A. and Krejci, I. 2003. Marginal integrity of pit and fissure sealants. Qualitative and quantitative evaluation of the marginal adaptation before and after in vitro thermal and mechanical stressing. Operative Dentistry 28(4): 403-14.
- Sudarshan, N. R., Hoover, D. G. and Knorr, D. 1992. Antibacterial action of chitosan. . Food Biotechnology 6(3): 257-272.
- Tan, S. C., Khor, E., Tan, T. K. and Wong, S. M. 1998. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. Talanta 45(4): 713-9.
- Tanoue, N., Matsumura, H. and Atsuta, M. 1998. Curing depth of a composite veneering material polymerized with seven different laboratory photo-curing units. J Oral Rehabil 25(3): 199-203.

- Tarsi, R., Muzzarelli, R. A., Guzman, C. A. and Pruzzo, C. 1997. Inhibition of Streptococcus mutans adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. Journal of Dental Research 76(2): 665-72.
- Teshima, W., Nomura, Y., Tanaka, N., Urabe, H., Okazaki, M. and Nahara, Y. 2003. ESR study of camphorquinone/amine photoinitiator systems using blue light-emitting diodes. Biomaterials 24(12): 2097-103.
- Theilig, C., Tegtmeier, Y., Leyhausen, G. and Geurtsen, W. 2000. Effects of BisGMA and TEGDMA on proliferation, migration, and tenascin expression of human fibroblasts and keratinocytes. Journal of Biomedical Materials Research 53(6): 632-9.
- Thomson, J. L., Main, C., Gillespie, F. C. and Stephen, K. W. 1981. The effect of salivary contamination on fissure sealant--enamel bond strength. Journal of Oral Rehabilitation 8(1): 11-8.
- Thonemann, B., Schmalz, G., Hiller, K. A. and Schweikl, H. 2002. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. Dental Materials 18(4): 318-23.
- Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., Alagui, A., Vincendon, M. and Vottero, P. 2000. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. Polymer 41: 2463-2469.
- Toledano, M., Osorio, R., Osorio, E., Fuentes, V., Prati, C. and Garcia-Godoy, F. 2003. Sorption and solubility of resin-based restorative dental materials. Journal of Dentistry 31(1): 43-50.
- Tsai, G. J. and Hwang, S. P. 2004. In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. Fisheries sciences 70: 675-681.
- Uzunova, Y., Lukanov, L., Filipov, I. and Vladimirov, S. 2008. High-performance liquid chromatographic determination of unreacted monomers and other residues



- contained in dental composites. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 70(6): 883-8.
- Venhoven, B. A., de Gee, A. J. and Davidson, C. L. 1996. Light initiation of dental resins: dynamics of the polymerization. Biomaterials 17(24): 2313-8.
- Versluis, A., Douglas, W. H. and Sakaguchi, R. L. 1996. Thermal expansion coefficient of dental composites measured with strain gauges. Dental Materials 12(5): 290-4.
- Versluis, A., Tantbirojn, D. and Douglas, W. H. 2004. Distribution of transient properties during polymerization of a light-initiated restorative composite. Dental Materials 20(6): 543-53.
- Volpe, A. R., Petrone, M. E., DeVizio, W. and Davies, R. M. 1993. A review of plaque, gingivitis, calculus and caries clinical efficacy studies with a dentifrice containing triclosan and PVM/MA Copolymer. J Clin Dent 4 Spec No: 31-41.
- Watthanaphanit, A., Supaphol, P., Tamura, H., Tokura, S. and Rujiravanit, R. 2010. Wet-spun alginate/chitosan whiskers nanocomposite fibers: Preparation, characterization and release characteristic of the whiskers. Carbohydrate Polymers 79: 738-746.
- Watts, D. C. 2005. Reaction kinetics and mechanics in photo-polymerised networks. Dental Materials 21(1): 27-35.
- Willems, G., Celis, J. P., Lambrechts, P., Braem, M. and Vanherle, G. 1993. Hardness and Young's modulus determined by nanoindentation technique of filler particles of dental restorative materials compared with human enamel. J Biomed Mater Res 27(6): 747-55.
- Wongpanit, P., Sanchavanakit, N., Pavasant, P., Bunaprasert, T., Tabata, Y. and Rujiravanit, R. 2007. Preparation and characterization of chitin whisker-reinforced silk fibroin nanocomposite sponges. European Polymer Journal 43: 4123-4135.

- Yang, D., Jin, Y., Ma, G., Chen, X., Lu, F. and Nie, J. 2008. Fabrication and characterization of chitosan/PVA with hydroxyapatite biocomposite nanoscaffolds. Journal of Applied Polymer Science 110(6): 3328 - 3335.
- Yoshida, K. and Greener, E. H. 1993. Effects of two amine reducing agents on the degree of conversion and physical properties of an unfilled light-cured resin. Dental Materials 9(4): 246-51.
- Yoshida, K. and Greener, E. H. 1994. Effect of photoinitiator on degree of conversion of unfilled light-cured resin. Journal of Dentistry 22(5): 296-9.
- Yue, C., Tantbirojn, D., Grothe, R. L., Versluis, A., Hodges, J. S. and Feigal, R. J. 2009. The depth of cure of clear versus opaque sealants as influenced by curing regimens. Journal of American Dental Association 140(3): 331-8.
- Zhang, X., Yang, D. and Nie, J. 2008. Chitosan/polyethylene glycol diacrylate films as potential wound dressing material. International Journal of Biological Macromolecules 43(5): 456-62.
- Zheng, L. Y. and Zhu, J. F. 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. Carbohydrate Polymer 54: 527-530.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลดิบของค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีเชื้อสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ก่อนและหลังการสัมผัสวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน

วัสดุ	จำนวนโคโลนี	จำนวนโคโลนี
	ก่อนการสัมผัส	หลังการสัมผัส
	(ค่าเฉลี่ย)	(ค่าเฉลี่ย)
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์	77.0	66.3
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน	90.3	67.0
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อซีลแอนท์โพรเทกท์	80.3	11.0
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อทีชท์เมทเอฟ-วัน	82.7	14.7
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2.5	66.7	16.3
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2	63.7	17.3
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 1.5	80.0	57.0
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 1	72.3	61.3

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดสอบชิ้นงานจำนวน 3 ชิ้นต่อกลุ่ม จำนวน 3 ครั้ง

ตารางที่ 2 แสดงการวิเคราะห์การกระจายของข้อมูลอัตราการลดลงของแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันทั้ง 8 กลุ่ม

	BRR ( <i>S.mutans</i> )	
	Kolmogorov-Smirnov Z	Sig.
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์	0.419	0.995
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน	0.432	0.992
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อซีลแอนท์โพรเทกท์	0.515	0.953
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อทีชท์เมทเอฟ-วัน	0.499	0.964
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2.5	0.396	0.998
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2	0.392	0.998
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 1.5	0.474	0.978
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 1	0.592	0.875

จากการวิเคราะห์ด้วยสถิติชนิดวันแซมเพิลโคลโมโกรอฟ-สเมอนอฟ ซี (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Z Test) ซึ่งเป็นสถิติที่ใช้วิเคราะห์การกระจายของข้อมูลพบว่า ข้อมูลทุกกลุ่ม

ในการทดสอบอัตราการลดลงของแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ มีรูปแบบการกระจายตัวปกติที่  $p < 0.05$

ตารางที่ 3 แสดงการวิเคราะห์ความเหมือนของความแปรปรวน (Homogeneity of variances) ในกลุ่มข้อมูลที่ทำการวัดอัตราการลดลงของแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์

	Levene Statistics	df1	df2	Sig.
BRR	4.244	7	16	0.008

ตารางที่ 4 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการลดลงของแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์ของวัสดุทั้ง 8 กลุ่ม

	Sum of squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15930.895	7	2275.814	307.148	0.000
Within Groups	118.552	16	7.409		
Total	16049.247	23			

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบในการวัดอัตราการลดลงของแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส มิวแทนส์จึงมีความจำเป็นต้องทำการทดสอบยืนยันภาวะเท่ากันของค่าเฉลี่ย (Robust Test of Equality of Means) โดยใช้วิธี Brown-Forsythe

ตารางที่ 5 แสดงการวิเคราะห์ชนิดบราวน์ ฟอไซท์ (Brown-Forsythe) เพื่อยืนยันภาวะเท่ากันของค่าเฉลี่ย

Brown-Forsythe	Statistic	df1	df2	Sig.
BRR-mutans	307.148	3	7.528	0.000

ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดทามเฮนส์ (Tamhane's) ระหว่างกลุ่มของค่าเฉลี่ยอัตราการลดลงของแบคทีเรียสเตร็ปโตคอคคัส มิวแทนส์

(I) sealant	(J) sealant	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	2.5%CS	-62.25836 <sup>*</sup>	1.71413	.014
	2%CS	-58.51343 <sup>*</sup>	1.71405	.016
	1.5%CS	-25.52198 <sup>*</sup>	2.70882	.025
	1%CS	-17.50788	3.17234	.215
	delton	-12.16093	2.76605	.317
	seal&protect	-69.37711 <sup>*</sup>	1.73184	.009
	teethmate F-1	-63.13276 <sup>*</sup>	1.69097	.018
2.5%CS	control	62.25836 <sup>*</sup>	1.71413	.014
	2%CS	3.74493 <sup>*</sup>	.44721	.031
	1.5%CS	36.73638	2.14469	.075
	1%CS	44.75047	2.70661	.087
	delton	50.09742 <sup>*</sup>	2.21654	.044
	seal&protect	-7.11875 <sup>*</sup>	.51116	.006
	teethmate F-1	-.87441	.34840	.934
2%CS	control	58.51343 <sup>*</sup>	1.71405	.016
	2.5%CS	-3.74493 <sup>*</sup>	.44721	.031
	1.5%CS	32.99145	2.14463	.093
	1%CS	41.00554	2.70656	.103
	delton	46.35249	2.21649	.051
	seal&protect	-10.86368 <sup>*</sup>	.51092	.001
	teethmate F-1	-4.61933 <sup>*</sup>	.34805	.035
1.5%CS	control	25.52198 <sup>*</sup>	2.70882	.025
	2.5%CS	-36.73638	2.14469	.075
	2%CS	-32.99145	2.14463	.093
	1%CS	8.01409	3.42421	.911
	delton	13.36104	3.05164	.285
	seal&protect	-43.85513 <sup>*</sup>	2.15888	.047
	teethmate F-1	-37.61078	2.12623	.082
1%CS	control	17.50788	3.17234	.215

	2.5%CS	-44.75047	2.70661	.087
	2%CS	-41.00554	2.70656	.103
	1.5%CS	-8.01409	3.42421	.911
	delton	5.34695	3.46966	.998
	seal&protect	-51.86922	2.71786	.061
	teethmate F-1	-45.62488	2.69200	.090
delton	control	12.16093	2.76605	.317
	2.5%CS	-50.09742 <sup>*</sup>	2.21654	.044
	2%CS	-46.35249	2.21649	.051
	1.5%CS	-13.36104	3.05164	.285
	1%CS	-5.34695	3.46966	.998
	seal&protect	-57.21617 <sup>*</sup>	2.23027	.030
	teethmate F-1	-50.97183 <sup>*</sup>	2.19868	.049
seal&protect	control	69.37711 <sup>*</sup>	1.73184	.009
	2.5%CS	7.11875 <sup>*</sup>	.51116	.006
	2%CS	10.86368 <sup>*</sup>	.51092	.001
	1.5%CS	43.85513 <sup>*</sup>	2.15888	.047
	1%CS	51.86922	2.71786	.061
	delton	57.21617 <sup>*</sup>	2.23027	.030
	teethmate F-1	6.24435 <sup>*</sup>	.42712	.046
teethmate F-1	control	63.13276 <sup>*</sup>	1.69097	.018
	2.5%CS	.87441	.34840	.934
	2%CS	4.61933 <sup>*</sup>	.34805	.035
	1.5%CS	37.61078	2.12623	.082
	1%CS	45.62488	2.69200	.090
	delton	50.97183 <sup>*</sup>	2.19868	.049
	seal&protect	-6.24435 <sup>*</sup>	.42712	.046

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลดิบของค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีเชื้อแลคโตบาซิลลัส คาเซอิก่อนและหลังการสัมผัสวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน

วัสดุ	จำนวนโคโลนี	จำนวนโคโลนี
	ก่อนการสัมผัส	หลังการสัมผัส
	(ค่าเฉลี่ย)	(ค่าเฉลี่ย)
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์	60.7	46.3
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน	59.3	50.0
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อซิลแอนท์โพรเทกท์	58.7	5.7
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อซีทเมทเอฟ-วัน	64.0	6.7
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2.5	63.0	7.7
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2	60.0	9.7
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 1.5	67.3	14.3
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 1	65.0	49.0

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ซินต่อกลุ่ม จำนวน 3 ครั้ง

ตารางที่ 8 แสดงการวิเคราะห์การกระจายของข้อมูลอัตราการลดลงของแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส คาเซอิกของวัสดุทั้ง 8 กลุ่ม

	BRR ( <i>L.casei</i> )	
	Kolmogorov-Smirnov Z	Sig.
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์	0.570	0.902
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน	0.481	0.975
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อซิลแอนท์โพรเทกท์	0.638	0.810
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อซีทเมทเอฟ-วัน	0.323	1.000
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2.5	0.504	0.961
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2	0.546	0.926
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 1.5	0.511	0.956
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 1	0.470	0.980

จากการวิเคราะห์ด้วยสถิติชนิดวันแซมเพิลโคลโมโกรอฟ-สเมอนอฟ ซี (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Z Test) ซึ่งเป็นสถิติที่ใช้วิเคราะห์การกระจายของข้อมูลพบว่า ข้อมูลทุกกลุ่ม



ในการทดสอบอัตราการลดลงของแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส คาเซอิมิรูปแบบการกระจายตัวปกติที่  $p < 0.05$

ตารางที่ 9 แสดงการวิเคราะห์ความเหมือนของความแปรปรวน (Homogeneity of variances) ในกลุ่มข้อมูลที่ทำการวัดอัตราการลดลงของแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส คาเซอิมิของวัสดุทั้ง 8 กลุ่ม

	Levene Statistics	df1	df2	Sig.
BRR	1.724	7	16	0.174

ตารางที่ 10 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอัตราการลดลงของแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส คาเซอิมิของวัสดุทั้ง 8 กลุ่ม

	Sum of squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23980.405	7	3425.772	687.767	.000
Within Groups	79.696	16	4.981		
Total	24060.101	23			

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบในการวัดอัตราการลดลงของแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส คาเซอิมิ

ตารางที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดเซฟเฟ (Scheffe) ระหว่างกลุ่มของค่าเฉลี่ยอัตราการลดลงของแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส คาเซอิมิ

(I) sealant	(J) sealant	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	2.5%CS	-62.25836*	1.71413	.014
	2%CS	-58.51343*	1.71405	.016
	1.5%CS	-25.52198*	2.70882	.025
	1%CS	-17.50788	3.17234	.215

	delton	-12.16093	2.76605	.317
	seal&protect	-69.37711*	1.73184	.009
	teethmate F-1	-63.13276*	1.69097	.018
2.5%CS	control	62.25836*	1.71413	.014
	2%CS	3.74493*	.44721	.031
	1.5%CS	36.73638	2.14469	.075
	1%CS	44.75047	2.70661	.087
	delton	50.09742*	2.21654	.044
	seal&protect	-7.11875*	.51116	.006
	teethmate F-1	-.87441	.34840	.934
2%CS	control	58.51343*	1.71405	.016
	2.5%CS	-3.74493*	.44721	.031
	1.5%CS	32.99145	2.14463	.093
	1%CS	41.00554	2.70656	.103
	delton	46.35249	2.21649	.051
	seal&protect	-10.86368*	.51092	.001
	teethmate F-1	-4.61933*	.34805	.035
1.5%CS	control	25.52198*	2.70882	.025
	2.5%CS	-36.73638	2.14469	.075
	2%CS	-32.99145	2.14463	.093
	1%CS	8.01409	3.42421	.911
	delton	13.36104	3.05164	.285
	seal&protect	-43.85513*	2.15888	.047
	teethmate F-1	-37.61078	2.12623	.082
1%CS	control	17.50788	3.17234	.215
	2.5%CS	-44.75047	2.70661	.087
	2%CS	-41.00554	2.70656	.103
	1.5%CS	-8.01409	3.42421	.911
	delton	5.34695	3.46966	.998
	seal&protect	-51.86922	2.71786	.061
	teethmate F-1	-45.62488	2.69200	.090
delton	control	12.16093	2.76605	.317
	2.5%CS	-50.09742*	2.21654	.044
	2%CS	-46.35249	2.21649	.051

	1.5%CS	-13.36104	3.05164	.285
	1%CS	-5.34695	3.46966	.998
	seal&protect	-57.21617*	2.23027	.030
	teethmate F-1	-50.97183*	2.19868	.049
seal&protect	control	69.37711*	1.73184	.009
	2.5%CS	7.11875*	.51116	.006
	2%CS	10.86368*	.51092	.001
	1.5%CS	43.85513*	2.15888	.047
	1%CS	51.86922	2.71786	.061
	delton	57.21617*	2.23027	.030
	teethmate F-1	6.24435*	.42712	.046
teethmate F-1	control	63.13276*	1.69097	.018
	2.5%CS	.87441	.34840	.934
	2%CS	4.61933*	.34805	.035
	1.5%CS	37.61078	2.12623	.082
	1%CS	45.62488	2.69200	.090
	delton	50.97183*	2.19868	.049
	seal&protect	-6.24435*	.42712	.046

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 12 แสดงข้อมูลดิบค่าความลึกของการแข็งตัวของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันทั้ง 4 กลุ่ม

	ชั้นที่ 1	ชั้นที่ 2	ชั้นที่ 3	ชั้นที่ 4	ชั้นที่ 5
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซาน	5.898	5.950	5.934	5.975	5.992
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซาน	5.790	5.980	5.720	5.680	5.850
วีสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก					
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน	3.898	3.970	3.634	3.925	3.792
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อที่ซัทเมทเอฟ-วัน	4.498	4.195	4.345	4.275	4.792

	ชั้นที่ 6	ชั้นที่ 7	ชั้นที่ 8	ชั้นที่ 9	ชั้นที่ 10
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซาน	5.818	5.900	5.834	5.961	5.920
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซาน	5.790	5.855	5.840	5.850	5.920
วีสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก					
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน	3.892	3.872	3.784	3.725	3.892
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อที่ซัทเมทเอฟ-วัน	4.565	4.456	4.534	4.650	4.492

ตารางที่ 13 แสดงการวิเคราะห์การกระจายของข้อมูลค่าความลึกของการแข็งตัวของวัสดุทั้ง 4 กลุ่ม

	Depth of Cure	
	KolmogorovSmirnov Z	Sig.
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซาน	0.514	0.955
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก	0.561	0.911
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน	0.722	0.675
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อที่ซัทเมทเอฟ-วัน	0.460	0.984

จากการวิเคราะห์ด้วยสถิติชนิดวันแซมเพิลโคลโมโกรฟ-สเมอนอฟ ซี (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Z Test) ซึ่งเป็นสถิติที่ใช้วิเคราะห์การกระจายของข้อมูลพบว่า ข้อมูลทุกกลุ่มในการทดสอบความลึกของการแข็งตัว มีรูปแบบการกระจายตัวปกติที่  $p < 0.05$

ตารางที่ 14 แสดงการวิเคราะห์ความเหมือนของความแปรปรวน (Homogeneity of variances) ในกลุ่มข้อมูลความลึกของการแข็งตัว

	Levene Statistics	df1	df2	Sig.
depth of cure	2.777	3	36	0.055

ตารางที่ 15 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวของความลึกของการแข็งตัว

depth of cure	Sum of squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31.463	3	10.488	797.546	0.000
Within Groups	0.473	36	0.013		
Total	31.937	39			

จากข้อมูลไม่พบความแตกต่างกันของความแปรปรวน จึงใช้การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยสถิติโนวาซนิตเซฟเฟ

ตารางที่ 16 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มในการทดสอบความลึกของการแข็งตัว

(I) sealant	(J) sealant	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	2%CS	.090700	.051284	.385
	delton	2.079800*	.051284	.000
	teethmate	1.438000*	.051284	.000
2%CS	control	-.090700	.051284	.385
	delton	1.989100*	.051284	.000
	teethmate	1.347300*	.051284	.000
delton	control	-2.079800*	.051284	.000
	2%CS	-1.989100*	.051284	.000
	teethmate	-.641800*	.051284	.000
teethmate	control	-1.438000*	.051284	.000
	2%CS	-1.347300*	.051284	.000
	delton	.641800*	.051284	.000

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 17 แสดงข้อมูลดิบแสดงค่า  $m_1, m_2, m_3, d_1, d_2$  (เส้นผ่านศูนย์กลางตำแหน่งที่ 1 และ 2),  $r$  (รัศมี),  $t$ -center (ความหนากลางชิ้นงาน),  $t_1, t_2, t_3$  และ  $t_4$  (ความหนาตำแหน่งที่ 1,2,3 และ 4 ตามลำดับ) ในการทดสอบเรื่องการดูดซับน้ำและการละลายตัวของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโคโตซานวีสเกอร์

วัสดุเคลือบหลุม ร่องฟันไม่เสริม โคโคโตซานวีสเกอร์	$m_1$	$m_2$	$m_3$	$d_1$	$d_2$	mean	$r$
ชิ้นตัวอย่างที่ 1	84000	85800	83500	14.906	14.905	14.9055	7.453
ชิ้นตัวอย่างที่ 2	80900	82500	80400	14.845	14.854	14.8495	7.425
ชิ้นตัวอย่างที่ 3	89800	91900	89200	14.899	14.902	14.9005	7.450
ชิ้นตัวอย่างที่ 4	81200	83200	80700	14.895	14.927	14.9110	7.456
ชิ้นตัวอย่างที่ 5	81100	83000	80600	14.914	14.935	14.9250	7.462

วัสดุเคลือบหลุม ร่องฟันไม่เสริม โคโคโตซานวีสเกอร์	$t$ -center	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$t_4$	$t$ -mean	$V$
ชิ้นตัวอย่างที่ 1	0.422	0.420	0.418	0.421	0.422	0.4206	73.4221
ชิ้นตัวอย่างที่ 2	0.394	0.390	0.390	0.390	0.389	0.3906	67.6738
ชิ้นตัวอย่างที่ 3	0.441	0.439	0.439	0.440	0.441	0.4400	76.7572
ชิ้นตัวอย่างที่ 4	0.394	0.395	0.398	0.389	0.393	0.3938	68.7945
ชิ้นตัวอย่างที่ 5	0.392	0.391	0.392	0.391	0.392	0.3916	68.5341

ตารางที่ 18 แสดงข้อมูลดิบแสดงค่า  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$ ,  $d_1$ ,  $d_2$  (เส้นผ่านศูนย์กลางตำแหน่งที่ 1 และ 2),  $r$  (รัศมี),  $t$ -center (ความหนากลางชิ้นงาน),  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$  และ  $t_4$  (ความหนาตำแหน่งที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ) ในการทดสอบเรื่องการดูดซับน้ำและการละลายตัวของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก

วัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน เสริมโคโตซานวีสเกอร์ ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก	$m_1$	$m_2$	$m_3$	$d_1$	$d_2$	mean	$r$
ชิ้นตัวอย่างที่ 1	84700	88000	84100	14.842	14.835	14.8385	7.4193
ชิ้นตัวอย่างที่ 2	85900	88700	85400	14.809	14.867	14.8330	7.4190
ชิ้นตัวอย่างที่ 3	90900	94200	90300	14.859	14.907	14.8830	7.4415
ชิ้นตัวอย่างที่ 4	91900	95000	91300	14.791	14.836	14.8135	7.4068
ชิ้นตัวอย่างที่ 5	93600	96600	93000	14.846	14.875	14.8605	7.4303

วัสดุเคลือบหลุมร่อง ฟันเสริมโคโตซาน วีสเกอร์ร้อยละ 2 โดย น้ำหนัก	$t$ -center	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$t_4$	$t$ -mean	$V$
ชิ้นตัวอย่างที่ 1	0.419	0.419	0.419	0.418	0.419	0.4188	72.45216
ชิ้นตัวอย่างที่ 2	0.420	0.420	0.422	0.412	0.426	0.4200	72.65486
ชิ้นตัวอย่างที่ 3	0.451	0.453	0.449	0.449	0.453	0.4510	78.49141
ชิ้นตัวอย่างที่ 4	0.458	0.458	0.453	0.453	0.451	0.4546	78.38076
ชิ้นตัวอย่างที่ 5	0.462	0.460	0.459	0.459	0.458	0.4596	79.74648

ตารางที่ 19 แสดงข้อมูลดิบแสดงค่า  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$ ,  $d_1$ ,  $d_2$  (เส้นผ่านศูนย์กลางตำแหน่งที่ 1 และ 2),  $r$  (รัศมี),  $t$ -center (ความหนากลางชิ้นงาน),  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$  และ  $t_4$  (ความหนาตำแหน่งที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ) ในการทดสอบเรื่องการดูดซับน้ำและการละลายตัวของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลตัน

วัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน ยี่ห้อเดลตัน	$m_1$	$m_2$	$m_3$	$d_1$	$d_2$	mean	$r$
ชิ้นตัวอย่างที่ 1	89500	92400	89000	14.900	14.904	14.9020	7.451
ชิ้นตัวอย่างที่ 2	81500	84500	80900	14.910	14.920	14.9150	7.458
ชิ้นตัวอย่างที่ 3	83500	86100	83000	14.910	14.915	14.9125	7.456
ชิ้นตัวอย่างที่ 4	80900	83500	80400	14.898	14.914	14.9060	7.453
ชิ้นตัวอย่างที่ 5	81500	83500	81000	14.878	14.869	14.8735	7.437

วัสดุเคลือบหลุมร่อง ฟันยี่ห้อเดลตัน	$t$ -center	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$t_4$	$t$ -mean	$V$
ชิ้นตัวอย่างที่ 1	0.441	0.440	0.439	0.440	0.441	0.4402	76.8075
ชิ้นตัวอย่างที่ 2	0.392	0.395	0.396	0.391	0.392	0.3932	68.7266
ชิ้นตัวอย่างที่ 3	0.423	0.420	0.420	0.423	0.422	0.4216	73.6658
ชิ้นตัวอย่างที่ 4	0.397	0.395	0.398	0.390	0.392	0.3944	68.8531
ชิ้นตัวอย่างที่ 5	0.397	0.395	0.394	0.391	0.389	0.3932	68.3446

ตารางที่ 20 แสดงข้อมูลดิบแสดงค่า  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$ ,  $d_1$ ,  $d_2$  (เส้นผ่านศูนย์กลางตำแหน่งที่ 1 และ 2),  $r$  (รัศมี),  $t$ -center (ความหนากลางชิ้นงาน),  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$  และ  $t_4$  (ความหนาตำแหน่งที่ 1, 2, 3 และ 4



ตามลำดับ) ในการทดสอบเรื่องการดูดซับน้ำและการละลายตัวของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อ ทีซี  
ทเมทเอฟ-วัน

วัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน ยี่ห้อทีซีทเมทเอฟ-วัน	m1	m2	m3	d1	d2	mean	r
ชิ้นตัวอย่างที่ 1	84400	87500	84100	14.840	14.838	14.8390	7.4195
ชิ้นตัวอย่างที่ 2	92800	95900	92500	14.854	14.885	14.8695	7.4348
ชิ้นตัวอย่างที่ 3	85300	88400	85100	14.812	14.877	14.8445	7.4223
ชิ้นตัวอย่างที่ 4	91500	94700	91200	14.804	14.824	14.8140	7.4070
ชิ้นตัวอย่างที่ 5	90200	93200	89900	14.873	14.917	14.8950	7.4475

วัสดุเคลือบหลุมร่อง ฟันยี่ห้อทีซีทเมท เอฟ-วัน	t-center	t1	t2	t3	t4	t-mean	V
ชิ้นตัวอย่างที่ 1	0.423	0.424	0.424	0.422	0.424	0.4234	73.25289
ชิ้นตัวอย่างที่ 2	0.462	0.460	0.459	0.459	0.462	0.4604	79.98208
ชิ้นตัวอย่างที่ 3	0.415	0.417	0.417	0.418	0.416	0.4166	72.12986
ชิ้นตัวอย่างที่ 4	0.458	0.458	0.453	0.454	0.456	0.4558	78.59296
ชิ้นตัวอย่างที่ 5	0.445	0.446	0.449	0.449	0.447	0.4472	77.95563

ตารางที่ 21 แสดงการวิเคราะห์การกระจายข้อมูลค่าการดูดซับน้ำและการละลายตัวของวัสดุทั้ง 4 กลุ่ม

	Kolmogorov-Smirnov Z	Sig.
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซาน	0.660	0.776
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก	0.480	0.975
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน	0.522	0.948
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อที่ซัทเมทเอฟ-วัน	0.524	0.946

	Water Solubility	
	Kolmogorov-Smirnov Z	Sig.
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซาน	0.552	0.920
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก	0.568	0.904
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน	0.676	0.750
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อที่ซัทเมทเอฟ-วัน	0.834	0.490

จากการวิเคราะห์ด้วยสถิติชนิดวันแซมเพิลโคลโมโกรอฟ-สเมอนอฟ ซี (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Z Test) ซึ่งเป็นสถิติที่ใช้วิเคราะห์การกระจายของข้อมูลพบว่า ข้อมูลทุกกลุ่มในการทดสอบค่าการดูดน้ำและการละลายตัวมีรูปแบบการกระจายตัวปกติที่  $p < 0.05$

ตารางที่ 22 แสดงการวิเคราะห์ความเหมือนของความแปรปรวน (Homogeneity of variances)

	Levene Statistics	df1	df2	Sig.
Wsp	1.027	3	16	0.407
Wsl	0.642	3	16	0.599

ตารางที่ 23 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) ของเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการดูดซับน้ำและการละลายตัวของวัสดุทั้ง 4 กลุ่ม

Wsp	Sum of squares	df	Mean Square	F	Sig.
-----	----------------	----	-------------	---	------

Between Groups	574.412	3	191.471	13.968	0.000
Within Groups	219.322	16	13.708		
Total	793.734	19			

Wsl	Sum of squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	53.119	3	17.706	51.671	0.000
Within Groups	5.483	16	0.343		
Total	58.601	19			

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนพบว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบในการวัดการดูดซับน้ำและการละลายตัว

ตารางที่ 24 แสดงการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดเซฟเฟ (Scheffe) ของข้อมูลค่าการดูดซึมน้ำ

(I) sealant	(J) sealant	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	2%CS	-14.4779000*	2.3415931	.000
	delton	-10.2881400*	2.3415931	.005
	teethmate F-1	-10.5296000*	2.3415931	.004
2%CS	control	14.4779000*	2.3415931	.000
	delton	4.1897600	2.3415931	.391
	teethmate F-1	3.9483000	2.3415931	.441
delton	control	10.2881400*	2.3415931	.005
	2%CS	-4.1897600	2.3415931	.391
	teethmate F-1	-.2414600	2.3415931	1.000
teethmate F-1	control	10.5296000*	2.3415931	.004
	2%CS	-3.9483000	2.3415931	.441
	delton	.2414600	2.3415931	1.000

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 25 แสดงการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดเซฟเฟ (Scheffe) ของข้อมูลค่าการละลายตัว

(I) sealant	(J) sealant	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	2%CS	-.2814400	.3702277	.900
	delton	-.0052600	.3702277	1.000
	teethmate F-1	3.6588800*	.3702277	.000
2%CS	control	.2814400	.3702277	.900
	delton	.2761800	.3702277	.905
	teethmate F-1	3.9403200*	.3702277	.000
delton	control	.0052600	.3702277	1.000
	2%CS	-.2761800	.3702277	.905
	teethmate F-1	3.6641400*	.3702277	.000
teethmate F-1	control	-3.6588800*	.3702277	.000
	2%CS	-3.9403200*	.3702277	.000
	delton	-3.6641400*	.3702277	.000

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 26 แสดงข้อมูลดิบค่าความแข็งวิกเกอร์สของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน 4 กลุ่ม

	วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซาน วิสเกอร์	วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซาน วิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก	วัสดุเคลือบฟัน	วัสดุทีชท์เมทเอฟ-วัน
ชั้นที่ 1	19.55	15.33	17.06	17.73
ชั้นที่ 2	18.57	15.08	17.52	17.90
ชั้นที่ 3	19.35	14.98	16.39	16.79
ชั้นที่ 4	17.15	14.49	16.89	17.23
ชั้นที่ 5	17.82	14.86	16.75	16.85
ชั้นที่ 6	18.49	15.68	16.36	17.20
ชั้นที่ 7	17.37	15.77	17.62	17.14
ชั้นที่ 8	18.83	15.79	16.76	16.86
ชั้นที่ 9	17.35	15.59	16.58	17.10
ชั้นที่ 10	17.82	15.73	16.86	16.91

ตารางที่ 27 แสดงการวิเคราะห์การกระจายของข้อมูลความแข็งวิกเกอร์สของวัสดุ 4 กลุ่ม

	Vickers Hardness	
	Kolmogoro-Smirnov Z	Sig.
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซาน	0.583	0.855
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก	0.717	0.683

วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน	0.568	0.903
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อที่ซัทเมทเอฟ-วัน	0.591	0.876

จากการวิเคราะห์ด้วยสถิติชนิดวันแซมเพิลโคลโมโกรอฟ-สเมอนอฟ ซี (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Z Test) ซึ่งเป็นสถิติที่ใช้วิเคราะห์การกระจายของข้อมูลพบว่า ข้อมูลทุกกลุ่มในการทดสอบความแข็งวิกเกอร์ส มีรูปแบบการกระจายตัวปกติที่  $p < 0.05$

ตารางที่ 28 แสดงการวิเคราะห์ความเหมือนของความแปรปรวน (Homogeneity of variances) ในกลุ่มข้อมูลที่ทำกรวัดความแข็งวิกเกอร์ส

	Levene Statistics	df1	df2	Sig.
VHN	6.267	3	36	0.002

พบว่าข้อมูลความแข็งวิกเกอร์สมีความแตกต่างกันของความแปรปรวน ดังนั้นจำเป็นต้องนำค่าความแปรปรวนมาใช้ในการคำนวณการเปรียบเทียบเชิงซ้อน

ตารางที่ 29 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวของความแข็งวิกเกอร์ส

VHN	Sum of squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	43.190	3	14.397	46.905	0.000
Within Groups	11.049	36	0.307		
Total	54.239	39			

จากการที่ข้อมูลความแข็งวิกเกอร์สมีความแตกต่างกันของความแปรปรวน จึงมีความจำเป็นต้องทำการทดสอบยืนยันภาวะเท่ากันของค่าเฉลี่ย (Robust Test of Equality of Means) โดยใช้วิธี Brown-Forsythe

ตารางที่ 30 แสดงการวิเคราะห์ห้ชนิดบราวน์ ฟอไซท์ (Brown-Forsythe) เพื่อยืนยันภาวะเท่ากันของค่าเฉลี่ยค่าความแข็งวิกเกอร์ส

Brown-Forsythe	Statistic	df1	df2	Sig.
VHN	46.905	3	21.924	0.000

ตารางที่ 31 แสดงการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดทามเฮน (Tamhane's) ระหว่างกลุ่มในการทดสอบความแข็งวิกเกอร์ส

(I) sealant	(J) sealant	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	2%CS	2.90900*	.30456	.000
	delton	1.38200*	.30326	.003
	teethmate F-1	1.09500*	.28941	.016
2%CS	control	-2.90900*	.30456	.000
	delton	-1.52700*	.19752	.000
	teethmate F-1	-1.81400*	.17552	.000
delton	control	-1.38200*	.30326	.003
	2%CS	1.52700*	.19752	.000
	teethmate F-1	-.28700	.17326	.524
teethmate F-1	control	-1.09500*	.28941	.016
	2%CS	1.81400*	.17552	.000
	delton	.28700	.17326	.524

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 32 แสดงข้อมูลดิบร้อยละอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน 4 กลุ่ม

	ชั้นที่ 1	ชั้นที่ 2	ชั้นที่ 3	ชั้นที่ 4	ชั้นที่ 5
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซาน	59.06	61.58	57.85	62.35	60.50
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์	58.76	56.34	55.67	59.85	57.35
ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก					
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน	75.28	71.95	69.57	72.16	70.59
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อที่ซัทเมท เอฟ-วัน	48.45	46.85	45.78	47.56	44.51

ตารางที่ 33 แสดงการวิเคราะห์การกระจายของข้อมูลร้อยละอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่

	Double Bond Conversion	
	Kolmogorov-Smirnov Z	Sig.
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซาน	0.365	0.999
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์	0.375	0.999
ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก		
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน	0.568	0.904
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อที่ซัทเมท เอฟ-วัน	0.351	1.000

จากการวิเคราะห์ด้วยสถิติชนิดวันแซมเพิลโคลโมโกรอฟ-สเมอนอฟ ซี (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Z Test) ซึ่งเป็นสถิติที่ใช้วิเคราะห์การกระจายของข้อมูลพบว่า ข้อมูลทุกกลุ่มในการทดสอบความถี่ของการแข็งตัว มีรูปแบบการกระจายตัวปกติที่  $p < 0.05$

ตารางที่ 34 แสดงการวิเคราะห์ความเหมือนของความแปรปรวน (Homogeneity of variances) ในกลุ่มข้อมูลที่ทำกรวัดร้อยละอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่

	Levene Statistics	df1	df2	Sig.
DOC	0.083	3	16	0.969



ตารางที่ 35 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ของวัสดุ 4 กลุ่ม

	Sum of squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1616.146	3	538.715	161.775	0.000
Within Groups	53.280	16	3.330		
Total	1669.427	19			

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนพบว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบในการวัดร้อยละอัตราการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่

ตารางที่ 36 แสดงการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดเซฟเฟ (Scheffe) ระหว่างกลุ่ม

(I) sealant	(J) sealant	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	2%CS	2.67400	1.15413	.190
	delton	-11.64200*	1.15413	.000
	teethmate F-1	13.63800*	1.15413	.000
2%CS	control	-2.67400	1.15413	.190
	delton	-14.31600*	1.15413	.000
	teethmate F-1	10.96400*	1.15413	.000
delton	control	11.64200*	1.15413	.000
	2%CS	14.31600*	1.15413	.000
	teethmate F-1	25.28000*	1.15413	.000
teethmate F-1	control	-13.63800*	1.15413	.000
	2%CS	-10.96400*	1.15413	.000
	delton	-25.28000*	1.15413	.000

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 37 แสดงข้อมูลดิบความหนืดของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์และวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก

ความหนืด (centi Poises)	วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซาน	วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก
ชั้นทดสอบที่ 1	380	1220
ชั้นทดสอบที่ 2	340	1200
ชั้นทดสอบที่ 3	400	1220
ชั้นทดสอบที่ 4	340	1260
ชั้นทดสอบที่ 5	380	1240
ชั้นทดสอบที่ 6	360	1180
ชั้นทดสอบที่ 7	340	1160
ชั้นทดสอบที่ 8	320	1220
ชั้นทดสอบที่ 9	340	1220
ชั้นทดสอบที่ 10	380	1240

ตารางที่ 38 แสดงการวิเคราะห์การกระจายของข้อมูลความหนืดของวัสดุ 2 กลุ่ม

	Viscosity	
	Kolmogorov-Smirnov Z	Sig.
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซาน	0.815	0.519
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก	0.803	0.539

จากการวิเคราะห์ด้วยสถิติชนิดวันแซมเพิลโคลโมโกรอฟ-สเมอนอฟ ซี (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Z Test) ซึ่งเป็นสถิติที่ใช้วิเคราะห์การกระจายของข้อมูลพบว่า ข้อมูลทุกกลุ่มในการทดสอบความหนืด มีรูปแบบการกระจายตัวปกติที่  $p < 0.05$

ตารางที่ 39 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความหนืดของวัสดุทั้ง 2 กลุ่มโดยวิธีอินดิเพนเดนท์ แซมเพิลทีเทส (Independent Sample T-test)

	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Viscosity	-69.290	18	.000	-858.000	-884.015	-831.985

ตารางที่ 40 แสดงคลอสแทบ (Crosstab) เปรียบเทียบระดับการรั่วซึมตามขอบกับชนิดของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันโดยวิธีไคสแควร์ (Chi-square)

**sealant \* Penetrate Crosstabulation**

			Penetrate				Total
			no penetrate	top half	bottom half	completely penetrate	
sealant control	Count		14	7	2	12	35
	% within sealant		40.0%	20.0%	5.7%	34.3%	100.0%
2%CS	Count		7	12	5	8	32
	% within sealant		21.9%	37.5%	15.6%	25.0%	100.0%
Total	Count		21	19	7	20	67
	% within sealant		31.3%	28.4%	10.4%	29.9%	100.0%

ตารางที่ 41 แสดงการเปรียบเทียบระดับการรั่วซึมตามขอบและชนิดของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันด้วยสถิติไคสแควร์ (Chi-square) ด้วยวิธีเพียร์สัน (Pearson) และการทดสอบเพื่อยืนยันด้วยวิธีเอกซกท์ (Exact)

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	5.612 <sup>a</sup>	3	.132	.136		
Likelihood Ratio	5.709	3	.127	.143		
Fisher's Exact Test	5.452			.138		
Linear-by-Linear Association	.101 <sup>b</sup>	1	.751	.765	.414	.076
N of Valid Cases	67					

a. 2 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.34.

b. The standardized statistic is -.318.

ตารางที่ 42 แสดงการวิเคราะห์การกระจายของข้อมูลค่าเฉลี่ยระดับการรั่วซึมตามขอบของวัสดุ

	ค่าเฉลี่ย ระดับการรั่วซึม	Marginal leakage	
		Kolmogorov-Smirnov Z	Sig.
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซาน	1.34	0.610	0.851
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซาน	1.44	0.530	0.941
วีลเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก			

จากการวิเคราะห์ด้วยสถิติชนิดวันแซมเพิลโคลโมโกรอฟ-สเมอนอฟ ซี (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Z Test) ซึ่งเป็นสถิติที่ใช้วิเคราะห์การกระจายของข้อมูลพบว่า ข้อมูลทุกกลุ่มในการทดสอบมีรูปแบบการกระจายตัวไม่เป็นปกติที่  $p < 0.05$

ตารางที่ 43 แสดงการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับการรั่วซึมตามขอบระหว่างวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวีลเกอร์และวัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีลเกอร์ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักด้วยสถิติแมน-วิทนีเยอ

sealant	N	Mean Rank	Sum of Ranks
level control	35	32.83	1149.00
2%CS	32	35.28	1129.00
Total	67		

	level
Mann-Whitney U	519.000
Wilcoxon W	1149.000
Z	-.537
Asymp. Sig. (2-tailed)	.591

a. Grouping Variable: sealant

ตารางที่ 44 แสดงการวิเคราะห์การกระจายข้อมูลอัตราการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงภายหลังการสัมผัสโดยตรงของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน

Viability percentage (direct)

	Kolmogorov-Smirnov Z	Sig.
วัสดุควบคุมทางบวก (positive control)	0.454	0.986
วัสดุควบคุมทางลบ (negative control)	0.466	0.982
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวิสเกอร์	0.558	0.914
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวิสเกอร์ร้อยละ 2	0.590	0.877
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเดลดัน	0.350	1.000
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อซีทเมทเอฟ-วัน	0.616	0.843

จากการวิเคราะห์ด้วยสถิติชนิดวันแซมเพิลโคลโมโกรอฟ-สเมอนอฟ ซี (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Z Test) ซึ่งเป็นสถิติที่ใช้วิเคราะห์การกระจายของข้อมูลพบว่า ข้อมูลทุกกลุ่มในการทดสอบความแข็งวิกเกอร์ส มีรูปแบบการกระจายตัวปกติที่  $p < 0.05$

ตารางที่ 45 แสดงการวิเคราะห์ความเหมือนของความแปรปรวน (Homogeneity of variances)

	Levene Statistics	df1	df2	Sig.
direct contact	6.209	5	12	0.005

พบว่าข้อมูลมีความแตกต่างกันของความแปรปรวน ดังนั้นจำเป็นต้องนำค่าความแปรปรวนมาใช้ในการคำนวณการเปรียบเทียบเชิงซ้อน

ตารางที่ 46 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวของร้อยละอัตราการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงภายหลังการสัมผัสโดยตรง

direct contact	Sum of squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15907.381	5	3181.476	103.208	0.000
Within Groups	369.912	12	30.826		
Total	16277.293	17			

จากการที่ข้อมูลมีความแตกต่างกันของความแปรปรวน จึงมีความจำเป็นต้องทำการทดสอบยืนยันภาวะเท่ากันของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี Brown-Forsythe

ตารางที่ 47 แสดงการวิเคราะห์ชนิดบราวน์ ฟอไซท์ (Brown-Forsythe) เพื่อยืนยันภาวะเท่ากัน

Brown-Forsythe	Statistic	df1	df2	Sig.
direct contact	103.208	5	4.646	0.000

ตารางที่ 48 แสดงการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดตามเฮนส์ (Tamhane's) ระหว่างกลุ่ม

(I) sealant	(J) sealant	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
noCS	2%CS	-4.09333	2.79069	.990
	delton	36.00267*	1.00437	.000
	teethmate F-1	19.37933	6.02645	.721
	PE	-6.24667	4.21499	.991
	ZDEC	78.12300*	.84780	.000
2%CS	noCS	4.09333	2.79069	.990
	delton	40.09600*	2.79694	.041
	teethmate F-1	23.47267	6.56751	.477
	PE	-2.15333	4.95785	1.000
	ZDEC	82.21633*	2.74461	.012
delton	noCS	-36.00267*	1.00437	.000
	2%CS	-40.09600*	2.79694	.041
	teethmate F-1	-16.62333	6.02934	.816
	PE	-42.24933	4.21913	.114
	ZDEC	42.12033*	.86815	.000
teethmate F-1	noCS	-19.37933	6.02645	.721
	2%CS	-23.47267	6.56751	.477
	delton	16.62333	6.02934	.816
	PE	-25.62600	7.28769	.363
	ZDEC	58.74367	6.00525	.138
PE	noCS	6.24667	4.21499	.991
	2%CS	2.15333	4.95785	1.000
	delton	42.24933	4.21913	.114
	teethmate F-1	25.62600	7.28769	.363
	ZDEC	84.36967*	4.18462	.032
ZDEC	noCS	-78.12300*	.84780	.000
	2%CS	-82.21633*	2.74461	.012
	delton	-42.12033*	.86815	.000
	teethmate F-1	-58.74367	6.00525	.138
	PE	-84.36967*	4.18462	.032

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตารางที่ 49 แสดงการวิเคราะห์การกระจายข้อมูลอัตราการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงภายหลังการสัมผัสโดยอ้อมของวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน

	Viability percentage (indirect)	
	Kolmogorov-Smirnov Z	Sig.
วัสดุควบคุมทางบวก (positive control)	0.308	1.000
วัสดุควบคุมทางลบ (negative control)	0.303	1.000
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันไม่เสริมโคโตซานวีสเกอร์	0.531	0.940
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันเสริมโคโตซานวีสเกอร์ร้อยละ 2	0.401	0.997
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อเคลตัน	0.593	0.874
วัสดุเคลือบหลุมร่องฟันยี่ห้อซีทเมทเอฟ-วัน	0.623	0.832

จากการวิเคราะห์ด้วยสถิติชนิดวันแซมเพิลโคลโมโกรอฟ-สเมอนอฟ ซี (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Z Test) ซึ่งเป็นสถิติที่ใช้วิเคราะห์การกระจายของข้อมูลพบว่า ข้อมูลทุกกลุ่มมีรูปแบบการกระจายตัวปกติที่  $p < 0.05$

ตารางที่ 50 แสดงการวิเคราะห์ความเหมือนของความแปรปรวน (Homogeneity of variances)

	Levene Statistics	df1	df2	Sig.
indirect contact	9.262	5	12	0.001

พบว่าข้อมูลความแตกต่างกันของความแปรปรวน ดังนั้นจำเป็นต้องนำค่าความแปรปรวนมาใช้ในการคำนวณการเปรียบเทียบเชิงซ้อน

ตารางที่ 51 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียวของร้อยละอัตราการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงภายหลังการสัมผัสโดยอ้อม

indirect contact	Sum of squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18814.209	5	3762.842	61.723	.000
Within Groups	731.558	12	60.963		
Total	19545.767	17			

จากการที่ข้อมูลมีความแตกต่างกันของความแปรปรวน จึงมีความจำเป็นต้องทำการทดสอบยืนยันภาวะเท่ากันของค่าเฉลี่ย (Robust Test of Equality of Means) โดยใช้วิธี Brown-Forsythe



ตารางที่ 52 แสดงการวิเคราะห์ห้ชนิดบราวน์ ฟอไซท์ (Brown-Forsythe) เพื่อยืนยันภาวะเท่ากัน

Brown-Forsythe	Statistic	df1	df2	Sig.
indirect contact	61.723	5	2.527	0.007

ตารางที่ 53 แสดงการเปรียบเทียบเชิงซ้อนชนิดทามเฮน (Tamhane's) ระหว่างกลุ่ม

(I) sealant	(J) sealant	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
noCS	2%CS	1.74167	3.23374	1.000
	delton	21.92200	10.59115	.934
	teethmate F-1	25.10667 <sup>*</sup>	2.53586	.012
	PE	-1.45100	2.18486	1.000
	ZDEC	91.46267 <sup>*</sup>	2.02544	.005
2%CS	noCS	-1.74167	3.23374	1.000
	delton	20.18033	10.70629	.955
	teethmate F-1	23.36500 <sup>*</sup>	2.98040	.044
	PE	-3.19267	2.68808	.998
	ZDEC	89.72100 <sup>*</sup>	2.56020	.010
delton	noCS	-21.92200	10.59115	.934
	2%CS	-20.18033	10.70629	.955
	teethmate F-1	3.18467	10.51656	1.000
	PE	-23.37300	10.43749	.917
	ZDEC	69.54067	10.40528	.279
teethmate F-1	noCS	-25.10667 <sup>*</sup>	2.53586	.012
	2%CS	-23.36500 <sup>*</sup>	2.98040	.044
	delton	-3.18467	10.51656	1.000
	PE	-26.55767 <sup>*</sup>	1.78865	.008
	ZDEC	66.35600 <sup>*</sup>	1.58999	.005
PE	noCS	1.45100	2.18486	1.000
	2%CS	3.19267	2.68808	.998
	delton	23.37300	10.43749	.917
	teethmate F-1	26.55767 <sup>*</sup>	1.78865	.008
	ZDEC	92.91367 <sup>*</sup>	.93334	.000
ZDEC	noCS	-91.46267 <sup>*</sup>	2.02544	.005
	2%CS	-89.72100 <sup>*</sup>	2.56020	.010
	delton	-69.54067	10.40528	.279
	teethmate F-1	-66.35600 <sup>*</sup>	1.58999	.005
	PE	-92.91367 <sup>*</sup>	.93334	.000

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายเอกมน มหาโศคา เกิดเมื่อวันที่ 6 มีนาคม พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนเทพศิรินทร์ และเข้าศึกษาต่อในชั้นอุดมศึกษาที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540 โดยจบการศึกษาทันตแพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยม) ในปี พ.ศ. 2546 ภายหลังจากจบการศึกษาได้เข้าทำงานในตำแหน่งอาจารย์ที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นเวลาหนึ่งปี ก่อนลาศึกษาต่อในหลักสูตรประกาศนียบัตรการแพทย์คลินิก สาขาทันตกรรมหัตถการ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปี 2547 คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย