

บทที่ 3

ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 การศึกษาคุณสมบัติของคลออร์เฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเอง

การเตรียมกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคลออร์เฮ็กซีดีนกับพื้นที่ tracing จากโครมาโตกราฟ ตอนที่ 1

เตรียมกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคลออร์เฮ็กซีดีนกับพื้นที่ tracing จากสารละลายคลออร์เฮ็กซีดีนที่ทราบความเข้มข้นทุกครั้งที่ทำการวัดปริมาณคลออร์เฮ็กซีดีนที่ปลดปล่อยออกมาจากคลออร์เฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซแต่ละความเข้มข้น โดยสมการและค่าสถิติที่ได้จากความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของคลออร์เฮ็กซีดีนกับพื้นที่ tracing แต่ละความเข้มข้นแสดงดังตาราง 2 ซึ่งได้ความสัมพันธ์เป็น สมการเส้นตรงที่มีค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.97 – 0.99 และมี relative error เมื่อเทียบกับ regression model เท่ากับ 0.23 - 2.43 %

ตาราง 2 ค่าสถิติที่ได้จากความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของคลออร์เฮ็กซีดีนกับพื้นที่ tracing จากโครมาโตแกรม

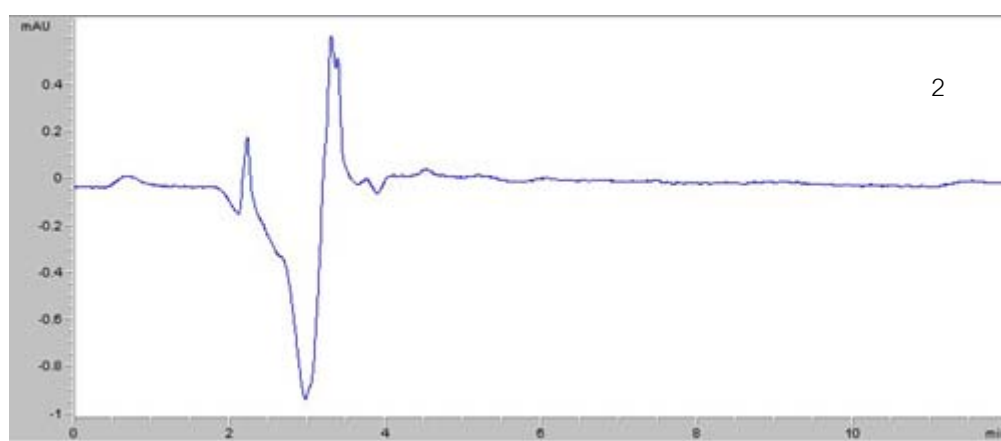
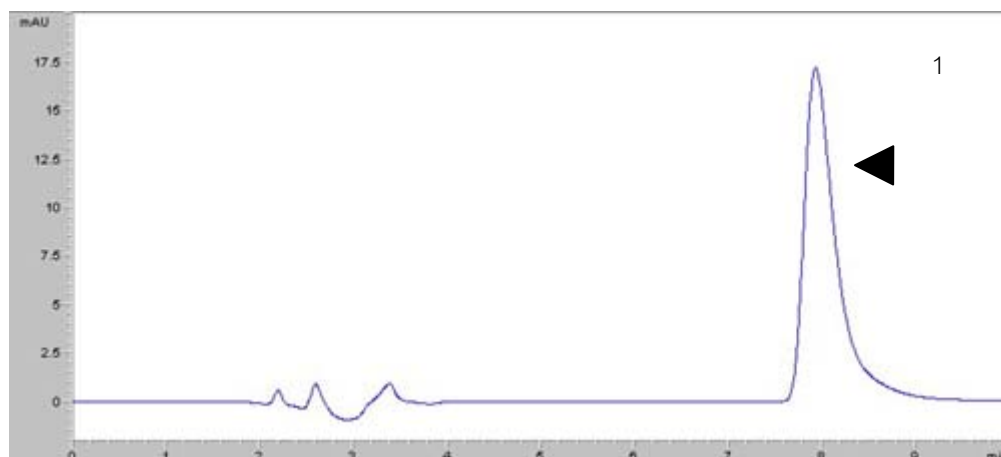
คลออร์เฮ็กซีดีนวานิช ความเข้มข้นร้อยละ	สมการ		R^2	Relative error *
	จุดตัดแกน Y (Y-intercept)	ความชัน (slope)		
5	+ 1.3247	56.007	0.9757	2.43
10	- 16.653	119.61	0.9837	1.63
20	- 108.3	148.86	0.9947	0.53
40	- 78779	66540	0.9977	0.23

หมายเหตุ Y คือ พื้นที่ของ tracing X คือ ความเข้มข้นของคลออร์เฮ็กซีดีน

* relative error เมื่อเทียบกับ regression model = $(MSE/MST) \times 100$

1.1 การปลดปล่อยคลอโรเฮ็กซีดีนจากคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควาณิชที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาการปลดปล่อยคลอโรเฮ็กซีดีนจากคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควาณิชที่เตรียมขึ้นเอง โดยการวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรเฮ็กซีดีนจากตัวอย่างสารละลายที่เก็บได้ในแต่ละชั่วโมง ด้วย HPLC พบว่าตัวอย่างสารละลายที่ได้จากคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควาณิชความเข้มข้นร้อยละ 5, 10, 20 และ 40 แสดง tracing ของคลอโรเฮ็กซีดีนที่ระยะเวลา (retention time) เดียวกับโครมาโตแกรมของคลอโรเฮ็กซีดีนมาตรฐานที่เวลา 7-10 นาที แต่แซนดาแรควาณิชไม่มี tracing ดังกล่าว ดังภาพประกอบ 11 ดังนั้นคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควาณิชความเข้มข้นร้อยละ 5, 10, 20 และ 40 สามารถปลดปล่อยคลอโรเฮ็กซีดีนดังแสดงในตาราง 3 โดยคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควาณิชความเข้มข้นร้อยละ 40 ปลดปล่อยคลอโรเฮ็กซีดีนได้สูงสุดที่ ชั่วโมงที่ 4 ตรวจพบคลอโรเฮ็กซีดีนเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 28.79 ± 3.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควาณิชความเข้มข้นร้อยละ 5, 10 และ 20 ปลดปล่อยคลอโรเฮ็กซีดีนได้สูงสุด ที่ชั่วโมงที่ 2 ตรวจพบคลอโรเฮ็กซีดีนเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.10 ± 0.01 , 0.75 ± 0.38 และ 4.72 ± 1.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับรายละเอียดดังตาราง 4 เมื่อเขียนกราฟของความสัมพันธ์ระหว่างเวลา กับ ปริมาณคลอโรเฮ็กซีดีนสะสมที่ถูกปลดปล่อยออกมาในช่วง 24 ชั่วโมง ดังภาพประกอบ 12-15 และ กราฟเวลากับความเข้มข้นของคลอโรเฮ็กซีดีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาแต่ละช่วงเวลา ดังภาพประกอบ 16-19 พบว่าปริมาณคลอโรเฮ็กซีดีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควาณิชความเข้มข้นร้อยละ 40 มากกว่า 20, 10 และ 5 ตามลำดับ และมีรูปแบบ (pattern) การปลดปล่อยที่เหมือนกันคือ ปลดปล่อยออกมามากในช่วง 2-4 ชั่วโมงแรกและค่อยๆ ปลดปล่อยออกมาปริมาณน้อยลงและคงที่ในช่วงหลัง โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงคลอโรเฮ็กซีดีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควาณิชความเข้มข้นร้อยละ 5, 10, 20 และ 40 สามารถปลดปล่อยคลอโรเฮ็กซีดีน 0.01 , 0.14 , 0.74 และ 2.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ



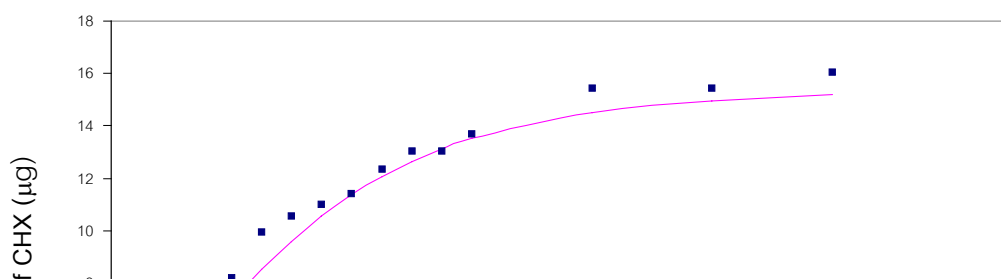
ภาพประกอบ 11 โครมาโตแกรมจาก 1) คลอร์เฮ็กซีนมาตรฐาน ($5 \mu\text{g/ml}$) มี tracing ของคลอร์เฮ็กซีนที่เวลา 7.92 – 9.00 นาที 2) แชนดาแควนิน ไม่ปรากฏ tracing ของคลอร์เฮ็กซีน 3) คลอร์เฮ็กซีนแชนดาแควนินร้อยละ 20 สามารถปลดปล่อยยาออกมาได้ และแสดง tracing ของคลอร์เฮ็กซีน ที่เวลาเดียวกับ 1)

ตาราง 3 การปลดปล่อยคลอโรเฮ็กซีดีนสะสมใน 24 ชั่วโมงจากคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซ ความเข้มข้นต่างๆ (ความเข้มข้นละ 6 ตัวอย่าง)

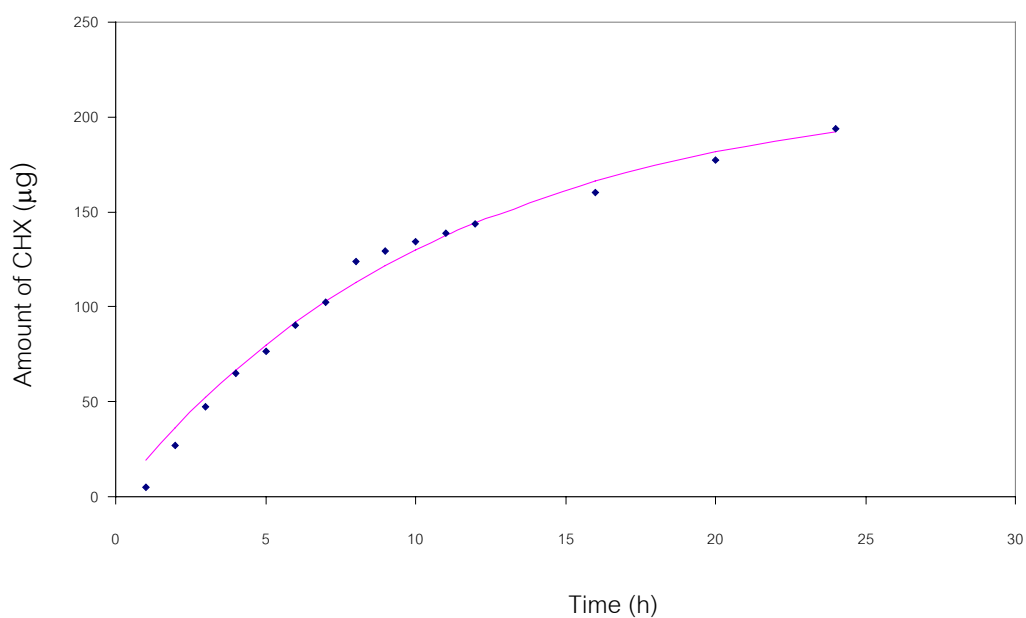
คลอโรเฮ็กซีดีนใน แซนดาแรควานิซ ความเข้มข้นร้อยละ	คลอโรเฮ็กซีดีน ที่ปลดปล่อย ทั้งหมดใน 24 ชั่วโมง (ไมโครกรัม)
0 (แซนดาแรควานิซ)	0.00 ± 0.00
5	16.07 ± 0.22
10	194.00 ± 1.69
20	717.98 ± 10.19
40	4410.30 ± 60.62

ตาราง 4 การปลดปล่อยคลอโรเฮ็กซีดีนสูงสุดจากคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซ ความเข้มข้นต่างๆ (ความเข้มข้นละ 6 ตัวอย่าง)

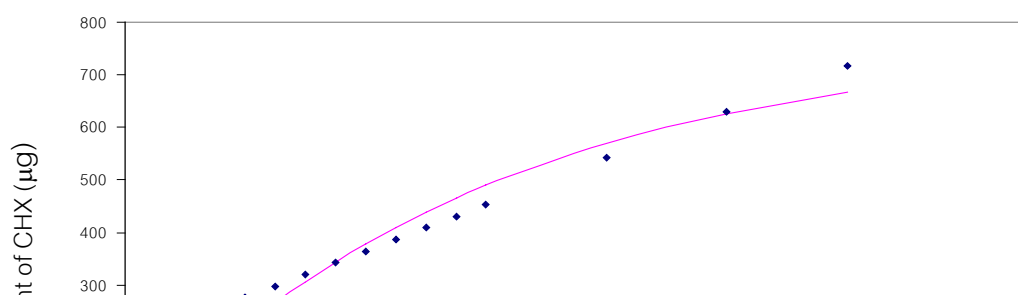
คลอโรเฮ็กซีดีนใน แซนดาแรควานิซ ความเข้มข้นร้อยละ	ชั่วโมงที่ปลดปล่อย คลอโรเฮ็กซีดีน สูงสุด	ความเข้มข้นคลอโรเฮ็กซีดีน สูงสุด (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
0 (แซนดาแรควานิซ)	-	0.00 ± 0.00
5	2	0.10 ± 0.01
10	2	0.75 ± 0.38
20	2	4.72 ± 1.42
40	4	28.79 ± 3.94



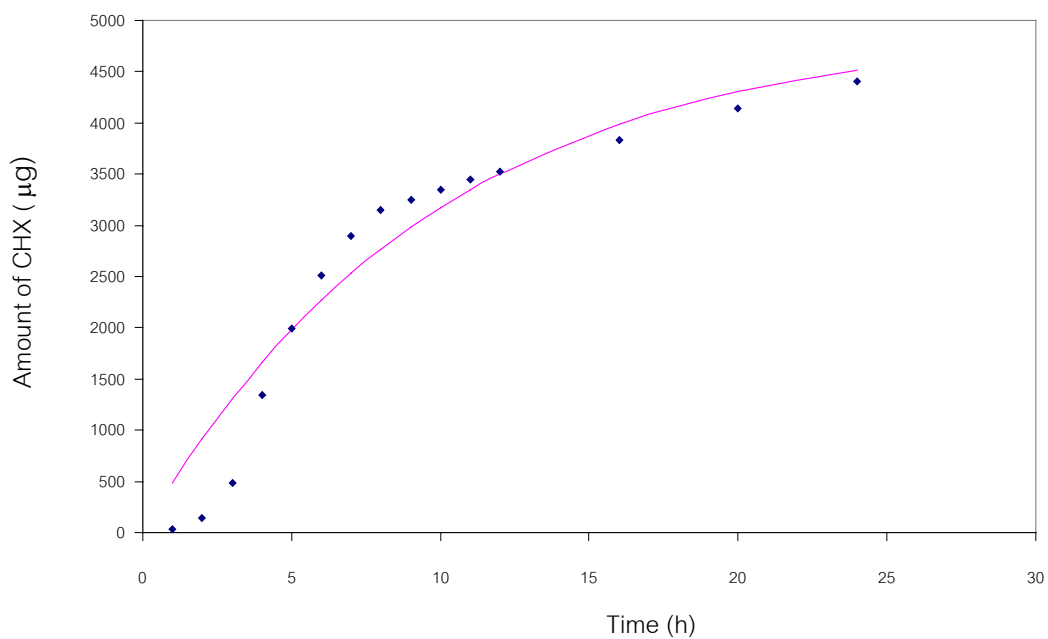
ภาพประกอบ 12 การปลดปล่อยคลอริเอ็กซีตินสะสมใน 24 ชั่วโมง จาก
คลอริเอ็กซีตินแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 5



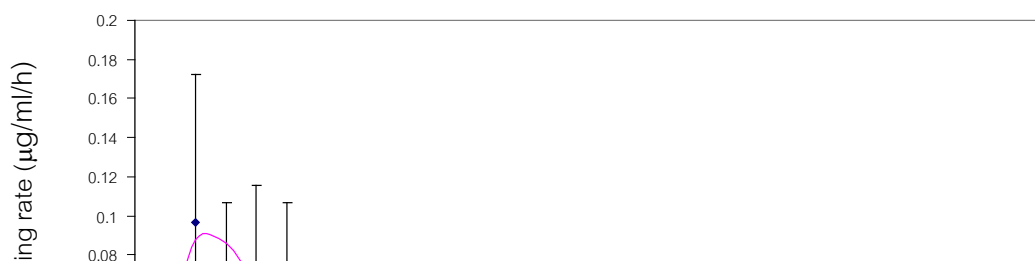
ภาพประกอบ 13 การปลดปล่อยคลอริเอ็กซีตินสะสมใน 24 ชั่วโมง จาก
คลอริเอ็กซีตินแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 10



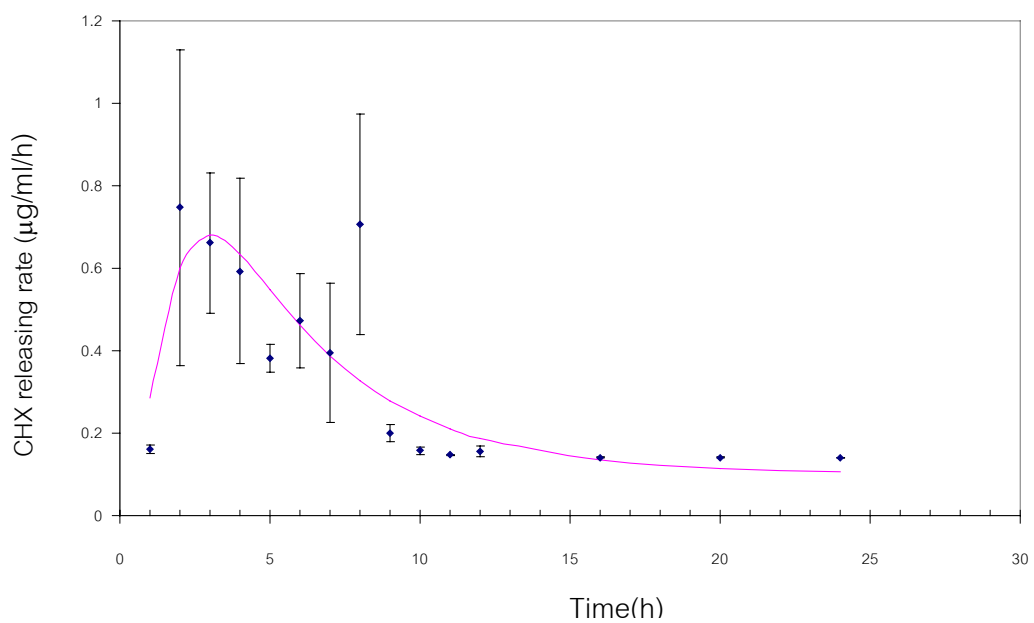
ภาพประกอบ 14 การปลดปล่อยคลอริเอ็กซีตินสะสมใน 24 ชั่วโมง จาก
คลอริเอ็กซีตินแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20



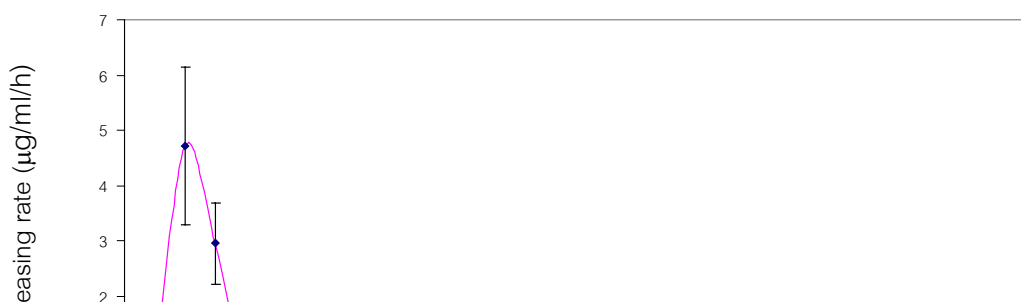
ภาพประกอบ 15 การปลดปล่อยคลอริเอ็กซีตินสะสมใน 24 ชั่วโมง จาก
คลอริเอ็กซีตินแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 40



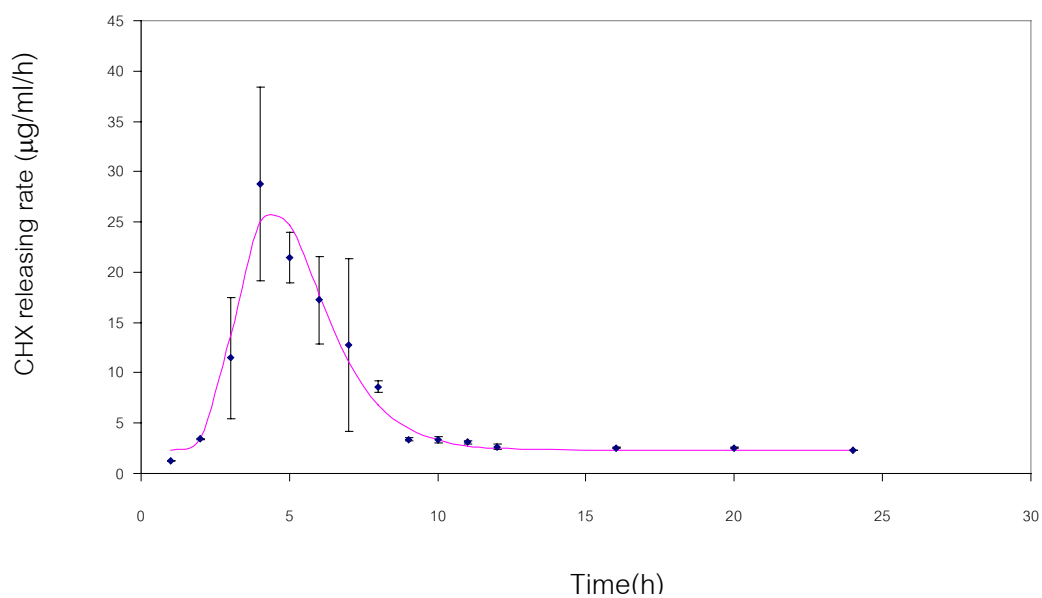
ภาพประกอบ 16 อัตราการปลดปล่อยคลอร์เฮกซิดีนจากคลอร์เฮกซิดีนแซนดาแรควานิช
ความเข้มข้นร้อยละ 5



ภาพประกอบ 17 อัตราการปลดปล่อยคลอร์เฮกซิดีนจากคลอร์เฮกซิดีนแซนดาแรควานิช
ความเข้มข้นร้อยละ 10



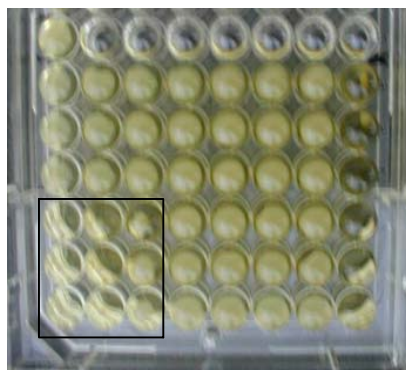
ภาพประกอบ 18 อัตราการปลดปล่อยคลอร์เฮกซิดีนจากคลอร์เฮกซิดีนแซนดาแรควานิช
ความเข้มข้นร้อยละ 20



ภาพประกอบ 19 อัตราการปลดปล่อยคลอร์เฮกซิดีนจากคลอร์เฮกซิดีนแซนดาแรควานิช
ความเข้มข้นร้อยละ 40

1.2 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ของ
คลอร์เฮกซิดีนแซนดาแรควานิชที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ

การศึกษานี้หาค่า MIC และ MBC ของคลอริเอ็กซีดีนต่อ *S. mutans* ATCC 25175 โดยวิธี two fold microdilution พบว่าความเข้มข้นที่เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (ไม่ขุ่น) คือ 1.50, 3.00 และ 6.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรดังภาพประกอบ 20 ดังนั้นค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) เท่ากับ 1.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำสารผสมของหลุมที่ 1.50, 3.00 และ 6.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าที่ 3.00 และ 6.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อดังภาพประกอบ 21 ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เชื้อตาย (MBC) เท่ากับ 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำ 2 ครั้งได้ค่าเท่ากัน จากปริมาณของคลอริเอ็กซีดีนสูงสุดที่ปลดปล่อยออกมาจากวานิชแต่ละความเข้มข้นข้างต้น พบว่าปริมาณของคลอริเอ็กซีดีนสูงสุดที่ปลดปล่อยออกมาจากคลอริเอ็กซีดีนในแกนดาแรควานิชความเข้มข้นร้อยละ 20 (4.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ ร้อยละ 40 (28.79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สูงกว่าค่า MIC และ MBC ของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175



กลุ่มควบคุมบวก	+							
↑	+	+	+	+	+	+	+	-
↓	+	+	+	+	+	+	+	-
↑	+	+	+	+	+	+	+	-
↓	-	-	-	+	+	+	+	-
↑	-	-	-	+	+	+	+	-
↓	-	-	-	+	+	+	+	-
ความเข้มข้นของ คลอโรเฮกซีดีน	6	3	1.5	0.75	0.32	0.16	0.08	ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร

- ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ + มีการเจริญเติบโตของเชื้อ

ภาพประกอบ 20 ผลการหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของคลอโรเฮกซีดีนที่ยับยั้งการเจริญเติบโตต่อ *S. mutans* ATCC 25175 (MIC) = 1.50 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร



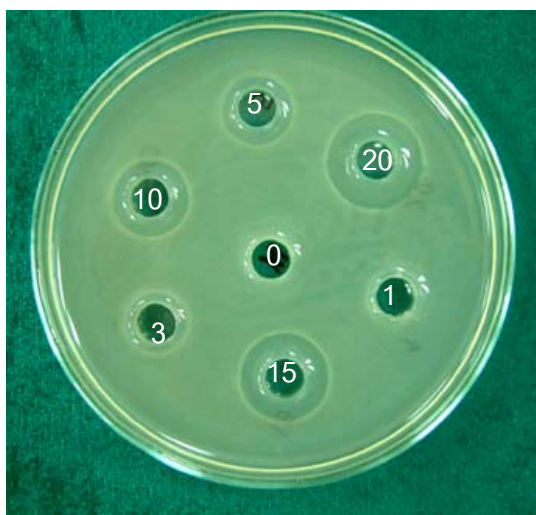
ภาพประกอบ 21 ผลการหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของคลอร์เฮกซิดีนที่ฆ่า
S. mutans ATCC 25175 (MBC) = 3.00 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร

เมื่อนำคลอริเฮ็กซีดีนมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1.00, 3.00, 5.00, 10.00, 15.00 และ 20.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. mutans* ด้วยวิธี agar diffusion พบว่าทุกความเข้มข้นเกิดวงใสรอบหลุม (inhibition zone) ขนาดต่างๆ ดังตาราง 5 และ ภาพประกอบ 22 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคลอริเฮ็กซีดีนกับเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสพบว่าได้ความสัมพันธ์ตามสมการเส้นตรง $Y = 0.4854X + 9.2981$ และ $R^2 = 0.9881$ โดย Y คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส และ X คือ ความเข้มข้นของคลอริเฮ็กซีดีน เมื่อนำตัวอย่างสารละลายจากการทดสอบการปลดปล่อยคลอริเฮ็กซีดีนสูงสุดออกมาจากวานิชของแต่ละความเข้มข้นมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. mutans* ด้วยวิธี agar diffusion พบว่าคลอริเฮ็กซีดีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากคลอริเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 0 และ 5 ไม่เกิดวงใส ในขณะที่ตัวอย่างที่ได้จากคลอริเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 10, 20 และ 40 เกิดบริเวณที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (วงใส) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5, 17.5 และ 22.5 มิลลิเมตรตามลำดับ โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของคลอริเฮ็กซีดีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากคลอริเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 40 มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (แอลกอฮอล์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $\alpha = 0.05$ โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way analysis of variance; ANOVA) ด้วยวิธี Tukey ดังตาราง 6 และภาพประกอบ 23 ดังนั้นคลอริเฮ็กซีดีนในแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 40 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. mutans* ได้ดี นอกจากนั้นเมื่อนำคลอริเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน พบว่าทุกความเข้มข้นเกิดบริเวณที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ รวมทั้งแซนดาแรควานิซ (ตาราง 7 และภาพประกอบ 24) แสดงว่าแซนดาแรควานิซมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อ *S. mutans* ส่วนแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นส่วนผสมของวานิชไม่เกิดวงใสรอบๆหลุม (ตาราง 5 และภาพประกอบ 22) แสดงว่าแอลกอฮอล์ความเข้มข้นที่ใช้ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. mutans*

ตาราง 5 เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 จากคลอรัเอ็กซีดินมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ (ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง)

คลอรัเอ็กซีดิน (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
0 (แอดกอสฮอลล์)	0.0 \pm 0.0
1.00	9.5 \pm 0.7
3.00	10.5 \pm 0.7
5.00	12.5 \pm 0.7
10.00	14.0 \pm 0.0
15.00	16.5 \pm 0.7
20.00	19.0 \pm 0.0

หมายเหตุ เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่ได้รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม (8 มิลลิเมตร)



ภาพประกอบ 22 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ของคลอรัเอ็กซีดินมาตรฐานความเข้มข้น 1.00, 3.00, 5.00, 10.00, 15.00 และ 20.00 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตาราง 6 เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175

จากคลอโรเฮ็กซีดีนความเข้มข้นสูงสุดที่ปลดปล่อยออกมา (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

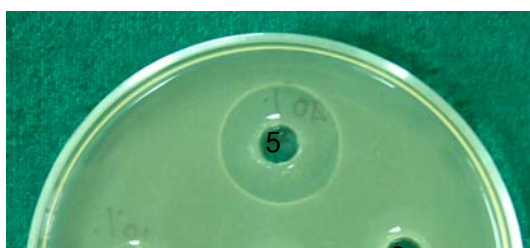
ความเข้มข้นสูงสุดของคลอโรเฮ็กซีดีน ที่ปลดปล่อยจากคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซ	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
แอลกอฮอล์	0.0(8.0) \pm 0.0
0.00	0.0(8.0) \pm 0.0
0.10	0.0(8.0) \pm 0.0
0.75	9.5 \pm 0.7
4.72	17.5 \pm 0.7*
28.79	22.5 \pm 0.7 *

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม (แอลกอฮอล์) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
หมายเหตุ เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่ได้รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม (8 มิลลิเมตร)

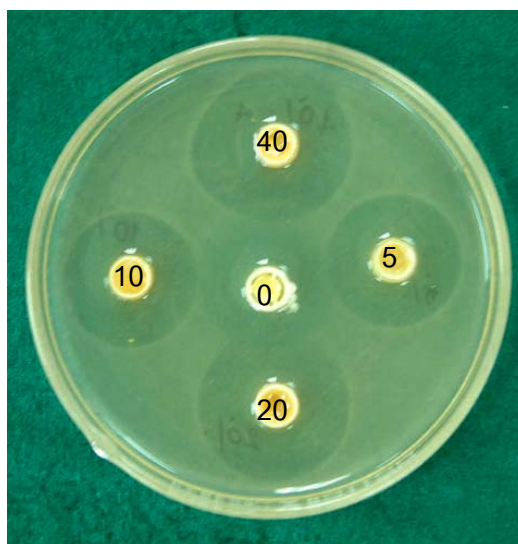
ตาราง 7 เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175
จากคลอโรเฮ็กซีดีนวานิช (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

คลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซ ความเข้มข้นร้อยละ	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
แอลกอฮอล์	0.0(8.0) \pm 0.0
0	20.0 \pm 0.0*
5	20.0 \pm 0.0*
10	25.5 \pm 0.7*
20	29.5 \pm 0.7*
40	30.0 \pm 1.4*

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม (แอลกอฮอล์) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
หมายเหตุ เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่ได้รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม (8 มิลลิเมตร)



ภาพประกอบ 23 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ของสารละลายตัวอย่างคลออร์ไฮ้กซิดีนสูงสุดความเข้มข้น 1) 0 2) 0.10 3) 0.75 4) 4.72 และ 5) 28.79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ปลดปล่อยออกมาจากคลออร์ไฮ้กซิดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นต่างๆ



ภาพประกอบ 24 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ของแซนดาแรควานิซ (0) และคลออร์ไฮ้กซิดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 5, 10, 20 และ 40

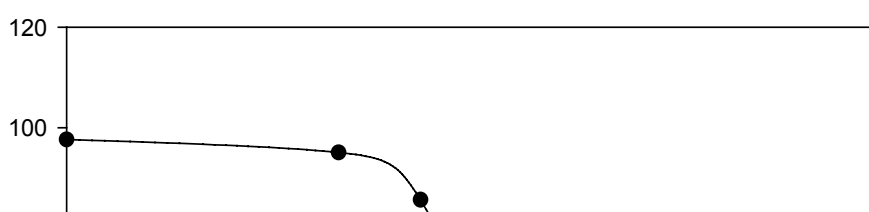
1.3 การศึกษาความเป็นพิษของคลออร์ไฮ้กซิดีนแซนดาแรควานิซต่อไฟโบรบลาสต์

Balb/C 3T3

ศึกษาความเป็นพิษของคลอโรเฮกซิดีนแซนดาแรควาณิชโดยการนำความเข้มข้นสูงสุดของคลอโรเฮกซิดีนที่ปลดปล่อยออกมาจากคลอโรเฮกซิดีนแซนดาแรควาณิชแต่ละความเข้มข้นเปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นของคลอโรเฮกซิดีนที่ทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/C 3T3 มีชีวิตร้อยละ 50 เมื่อสัมผัสสารนาน 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของคลอโรเฮกซิดีนที่ทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/C 3T3 รอดชีวิตร้อยละ 50 เท่ากับ 4.62 ± 1.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้จากค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ครั้ง ดังภาพประกอบ 25

ปริมาณคลอโรเฮกซิดีนสูงสุดที่ปลดปล่อยออกมาจากคลอโรเฮกซิดีนแซนดาแรควาณิชความเข้มข้นร้อยละ 5 (0.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 10 (0.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นของคลอโรเฮกซิดีนที่ทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/C 3T3 มีชีวิตร้อยละ 50 แต่ปริมาณคลอโรเฮกซิดีนที่ได้จากคลอโรเฮกซิดีนแซนดาแรควาณิชความเข้มข้นร้อยละ 20 (4.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 40 (28.79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สูงกว่าความเข้มข้นของคลอโรเฮกซิดีนที่ทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/C 3T3 มีชีวิตร้อยละ 50

เมื่อทดสอบความเป็นพิษของคลอโรเฮกซิดีนแซนดาแรควาณิชที่เตรียมขึ้นเองทุกความเข้มข้น พบว่าแต่ละความเข้มข้นมีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ดังตาราง 8 โดยคลอโรเฮกซิดีนแซนดาแรควาณิชความเข้มข้นร้อยละ 5, 10 และ 20 มีร้อยละการมีชีวิต 96.78, 96.16 และ 88.56 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าร้อยละ 50 และไม่มีแตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่คลอโรเฮกซิดีนแซนดาแรควาณิชความเข้มข้นร้อยละ 40 มีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ 55.31 ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way analysis of variance; ANOVA) ด้วยวิธี Tukey นอกจากนี้ แอลกอฮอล์และแซนดาแรควาณิช มีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย เมื่อดูเซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/C 3T3 หลังจากสัมผัสคลอโรเฮกซิดีนแซนดาแรควาณิชนาน 24 ชั่วโมง พบว่าในหลุมที่สัมผัสแซนดาแรควาณิชมีความหนาแน่นของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/C 3T3 มากกว่าหรือเท่ากับกลุ่มควบคุม และมากกว่าหลุมที่สัมผัสคลอโรเฮกซิดีนแซนดาแรควาณิชความเข้มข้นร้อยละ 5, 10, 20 และ 40 ตามลำดับ นอกจากนี้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/C 3T3 ที่สัมผัสคลอโรเฮกซิดีนแซนดาแรควาณิชความเข้มข้นร้อยละ 40 มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ดังภาพประกอบ 26



ตอนที่ 2. การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของคลออร์เฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเองกับคลออร์เฮ็กซีดีนวานิชที่มีจำหน่าย

จากการศึกษาคุณสมบัติของคลออร์เฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเองข้างต้น โดยเลือกคลออร์เฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 40 เปรียบเทียบกับ EC 40[®] เนื่องจากคลออร์เฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 40 สามารถนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. mutans* ได้ และเมื่อพิจารณาถึงส่วนประกอบของ วานิซ คลออร์เฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 40 มีร้อยละของคลออร์เฮ็กซีดีนและองค์ประกอบที่ไม่ออกฤทธิ์ (inactive component) ที่สำคัญใกล้เคียงกับ EC 40[®] คือแซนดาแรควานิซ

การเตรียมกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคลออร์เฮ็กซีดีนกับพื้นที่ tracing จากโครมาโตกราฟ ตอนที่ 2

เตรียมกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคลออร์เฮ็กซีดีนกับพื้นที่ tracing โดยเตรียมสารละลายคลออร์เฮ็กซีดีนมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นในการเตรียมกราฟมาตรฐาน 1 ครั้ง เนื่องจากทำการวัดปริมาณคลออร์เฮ็กซีดีนที่ปลดปล่อยออกมาจากคลออร์เฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซแต่ละความเข้มข้นในครั้งเดียวกัน โดยสมการและค่าสถิติที่ได้จากความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของคลออร์เฮ็กซีดีนกับพื้นที่ tracing ได้ความสัมพันธ์เป็นสมการเส้นตรงที่คือ $Y = 145,420X - 372,121$ มีค่า $R^2 = 0.9966$ และ $\text{relative error} = 0.34\%$ เมื่อ Y คือ พื้นที่ของ tracing และ X คือ ความเข้มข้นของคลออร์เฮ็กซีดีน

2.1 การศึกษาการปลดปล่อยคลออร์เฮ็กซีดีนจากคลออร์เฮ็กซีดีนในแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20, 40 และ EC 40[®]

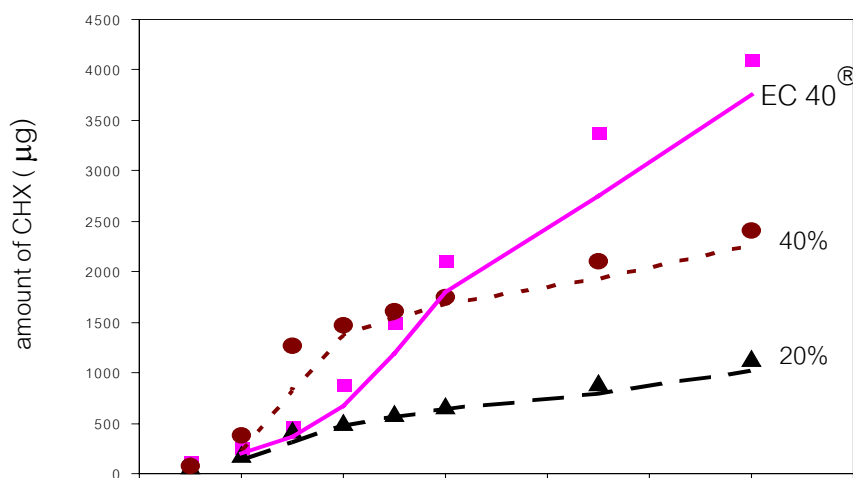
ทำการศึกษาการปลดปล่อยคลออร์เฮ็กซีดีนในช่วง 12 ชั่วโมงเนื่องจากการศึกษาข้างต้นพบว่าอัตราการปลดปล่อยสูงสุดของคลออร์เฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเองอยู่ที่ 2-4 ชั่วโมง และลดลงจนคงที่ที่ 5-10 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 16-19)

การปลดปล่อยคลออร์เฮ็กซีดีนจากคลออร์เฮ็กซีดีนวานิชทั้ง 3 ชนิดแสดงดังตาราง 9 โดยคลออร์เฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 40 ปลดปล่อยคลออร์เฮ็กซีดีนสูงสุดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 3 ความเข้มข้นสูงสุดเฉลี่ยที่ปลดปล่อยคือ 8.13 ± 2.05 และ 29.46 ± 4.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ EC 40[®] ปลดปล่อยคลออร์เฮ็กซีดีนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 ความเข้มข้นเฉลี่ย 20.84 ± 2.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากภาพประกอบ 27 และ 28 แสดงให้เห็นว่าคลออร์เฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 40 ปลดปล่อยคลออร์เฮ็กซีดีนที่ความเข้มข้นสูง

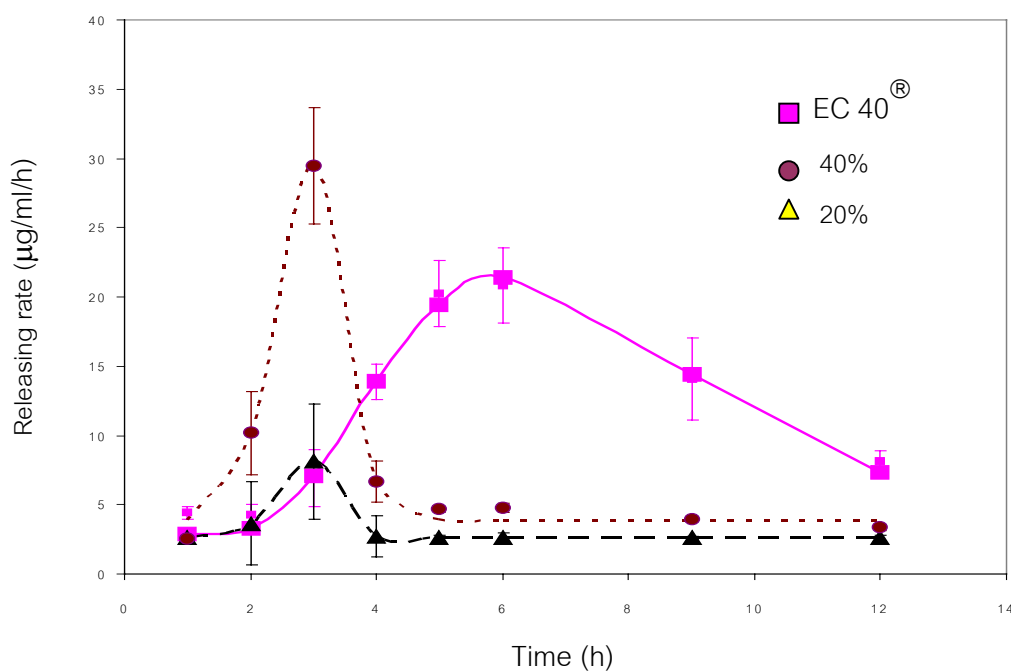
สูงที่สูงกว่า EC 40[®] และคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20 ตามลำดับ ระยะเวลาในการปลดปล่อยคลอโรเฮ็กซีดีนสูงสุดของคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 40 สั้นกว่า และ ลดลงเร็วกว่า EC 40[®] ดังแสดงได้จากในชั่วโมงที่ 12 ตรวจพบคลอโรเฮ็กซีดีนเฉลี่ยจาก EC 40[®] (8.11 ± 0.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร) มากกว่าคลอโรเฮ็กซีดีนเฉลี่ยในแซนดาแรควานิซร้อยละ 40 (3.34 ± 0.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร) และ 20 (2.56 ± 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร) ตามลำดับ

ตาราง 9 ความสามารถในการปลดปล่อยคลอโรเฮ็กซีดีนของคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเองความเข้มข้นร้อยละ 20, 40 เปรียบเทียบกับ EC 40[®] (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

คลอโรเฮ็กซีดีนในแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ	ชั่วโมงที่ปลดปล่อยคลอโรเฮ็กซีดีนสูงสุด	ความเข้มข้นคลอโรเฮ็กซีดีนสูงสุด (ไมโครกรัม/มิลลิเมตร)
20	3	8.13 ± 2.05
40	3	29.46 ± 4.17
EC 40 [®]	6	20.84 ± 2.70



ภาพประกอบ 27 ปริมาณการปลดปล่อยคลอริเอ็กซีดีนสะสมใน 12 ชั่วโมง จากคลอริเอ็กซีดีนแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเองความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 40 เปรียบเทียบกับ EC 40[®]



ภาพประกอบ 28 อัตราการปลดปล่อยคลอริเอ็กซีดีนจากคลอริเอ็กซีดีนแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเองความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 40 เปรียบเทียบกับ EC 40[®]

2.2 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อ *S. mutans* ATCC 25175 ของคลอริเอ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20, 40 และ EC 40[®] และคลอริเอ็กซีดีนสูงสุดที่ถูกปลดปล่อยออกมา

จากปริมาณของคลอโรเฮ็กซีดีนสูงสุดที่ปลดปล่อยออกมาจากวานิชทั้ง 3 ชนิดข้างต้น พบว่าความเข้มข้นของคลอโรเฮ็กซีดีนสูงสุดที่ปลดปล่อยออกมาจากคลอโรเฮ็กซีดีนในแซนดาแรควานิชความเข้มข้นร้อยละ 20 (8.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), 40 (29.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ EC 40[®] (20.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สูงกว่าค่า MIC และ MBC ของ *S. mutans* ATCC 25175 และเมื่อนำตัวอย่างคลอโรเฮ็กซีดีนสูงสุดที่ถูกปลดปล่อยออกมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อ *S. mutans* ด้วยวิธี agar diffusion ตัวอย่างคลอโรเฮ็กซีดีนสูงสุดที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากคลอโรเฮ็กซีดีนในแซนดาแรควานิชความเข้มข้นร้อยละ 20, 40 และ EC 40[®] เกิดบริเวณที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (วงใส) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 12.5, 15.0 และ 14.5 มิลลิเมตรตามลำดับ ดังตารางที่ 10 และภาพประกอบ 29 ซึ่งบริเวณที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อที่เกิดขึ้นจากวานิชทั้ง 3 ชนิดไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อทดสอบเช่นเดียวกันด้วยคลอโรเฮ็กซีดีนวานิชพบว่า EC 40[®] (24.5 มิลลิเมตร) เกิดบริเวณที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมากกว่าคลอโรเฮ็กซีดีนในแซนดาแรควานิชความเข้มข้นร้อยละ 20 (21.3 มิลลิเมตร) และ 40 (21.5 มิลลิเมตร) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way analysis of variance; ANOVA) ด้วยวิธี Tukey ดังตาราง 11 และภาพประกอบ 30

ตาราง 10 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. mutans* ATCC 25175 จากตัวอย่างสารละลายคลอโรเฮ็กซีดีนความเข้มข้น 8.13, 29.46 และ 20.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ปลดปล่อยออกมาจากคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิชที่เตรียมขึ้น

เปรียบเทียบกับ EC 40[®] (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

ความเข้มข้นของตัวอย่างสารละลาย คลอร์เฮกซิดีนสูงสุด ที่ถูกปลดปล่อย (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
8.13	12.5 ± 0.7
29.46	15.0 ± 1.4
20.84	14.5 ± 1.4

หมายเหตุ เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่ได้รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม (8 มิลลิเมตร)

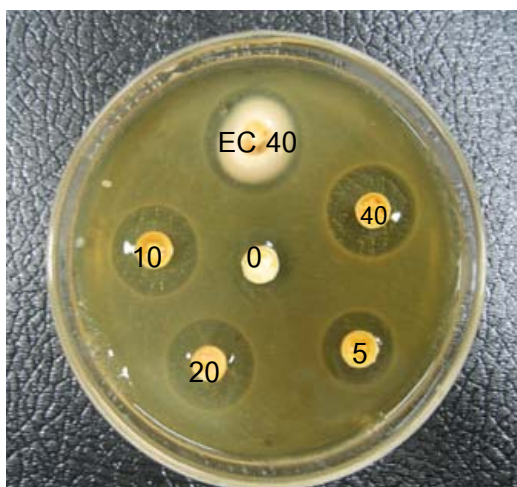
ตาราง 11 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. mutans* ATCC 25175 จาก
คลอร์เฮกซิดีนแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเองเปรียบเทียบกับ EC 40[®]
(ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

คลอร์เฮกซิดีน แซนดาแรควานิซ ความเข้มข้นร้อยละ	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
20	21.3 ± 1.8
40	21.5 ± 2.1
EC 40 [®]	24.5 ± 2.1

หมายเหตุ เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่ได้รวมเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม (8 มิลลิเมตร)



ภาพประกอบ 29 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ของตัวอย่างสารละลายคลออร์เฮ็กซิดีนความเข้มข้น 1) 0, 2) 8.13, 3) 29.46 และ 4) 20.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ปลดปล่อยออกมาจากคลออร์เฮ็กซิดีนในแคนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเปรียบเทียบกับ EC 40[®]



ภาพประกอบ 30 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ของแคนดาแรควานิซ (0) และคลออร์เฮ็กซิดีนแคนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 5, 10, 20 และ 40 เปรียบเทียบกับ EC 40[®]

2.3 ความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/c 3T3 ของคลออร์เฮ็กซิดีนแคนดาแรควานิซ ความเข้มข้นร้อยละ 20, 40 และ EC 40[®]

เมื่อนำความเข้มข้นสูงสุดของคลอโรเฮ็กซีดีนที่ปลดปล่อยออกมาจากคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นของคลอโรเฮ็กซีดีนที่ทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/C 3T3 มีชีวิตร้อยละ 50 เมื่อสัมผัสสารนาน 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของคลอโรเฮ็กซีดีนที่ปลดปล่อยออกมาจากคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20 (8.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), 40 (29.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ EC 40[®] (20.84 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สูงกว่าค่าความเข้มข้นของคลอโรเฮ็กซีดีนที่ทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/C 3T3 มีชีวิตร้อยละ 50 และเมื่อทดสอบความเป็นพิษของคลอโรเฮ็กซีดีนวานิช พบว่าคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20 มีร้อยละการมีชีวิตมากกว่าคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 40 และ EC 40[®] ตามลำดับ ดังตาราง 12 โดยคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 40 และ EC 40[®] มีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์แตกต่างกับคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20 อย่างมีนัยสำคัญ แต่คลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 40 และ EC 40[®] มีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way analysis of variance; ANOVA) ด้วยวิธี Tukey ดังนั้นคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20 มีความเป็นพิษน้อยกว่าคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 40 และ EC 40[®] ตามลำดับ

ตาราง 12 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/C 3T3 (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

คลอโรเฮ็กซีดีน ในแซนดาแรควานิซ ความเข้มข้นร้อยละ	ร้อยละการมีชีวิต
กลุ่มควบคุม	100.00 ± 0.00
20	88.56 ± 11.22
40	55.31 ± 20.67 *
EC40	47.34 ± 6.75 *

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม (ไม่มีสารทดสอบ) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95