

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

การเตรียมคลอรัเฮกซิดีนแซนดาแรควานิช

เตรียมคลอรัเฮกซิดีนแซนดาแรควานิชที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยคลอรัเฮกซิดีนที่เตรียมขึ้นประกอบด้วย

1. ส่วนออกฤทธิ์ (active component) คือ คลอรัเฮกซิดีนไดอะซิเตทโมโนไฮเดรท (chlorhexidine diacetate monohydrate : $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2CH_3COOH \cdot H_2O$ assay $\geq 98\%$ HPLC, Fluka Biochemical, Switzerland)
2. ส่วนเบส (base) คือ แซนดาแรควาเรซิน (sandarac resin: graded prime, scent-of-earth, Morocco) ภาพประกอบ 4
3. ตัวทำละลาย (solvent) คือ เอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95



ภาพประกอบ 4 แซนดาแรควาเรซิน

เตรียมคลอโรเฮ็กซีดีนวานิชโดยให้มีสัดส่วนของคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรคร้อยละ 0, 5, 10, 20 และ 40 โดยน้ำหนัก ดังตาราง 1 ผสมแซนดาแรคเรซินที่บดละเอียดด้วยโถรงบดยา เข้ากับเอซิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 และคนด้วยแท่งแก้วจนละลายจะได้วานิชสีเหลืองน้ำตาลใสที่มีความหนืดสูงกว่าแอลกอฮอล์เล็กน้อย และใส่คลอโรเฮ็กซีดีนไดอะซีเตทโมโนไฮเดรทลงในวานิชข้างต้น คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำคลอโรเฮ็กซีดีนวานิชที่เตรียมได้เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

ตาราง 1 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิชความเข้มข้นต่างๆ

ร้อยละความเข้มข้น ของ คลอโรเฮ็กซีดีนวานิช*	คลอโรเฮ็กซีดีน (กรัม)	แซนดาแรค (กรัม)	แอลกอฮอล์ (กรัม)
0 (แซนดาแรควานิช)	0	1	3
5	0.05	1	3
10	0.11	1	3
20	0.25	1	3
40	0.66	1	3

*หมายเหตุ ความเข้มข้นของคลอโรเฮ็กซีดีนวานิช คัดจากน้ำหนักของคลอโรเฮ็กซีดีนในน้ำหนักรวมของคลอโรเฮ็กซีดีนและแซนดาแรค (ภาคผนวก)

การศึกษาคุณลักษณะของคลอโรเฮ็กซีดีนวานิช แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ

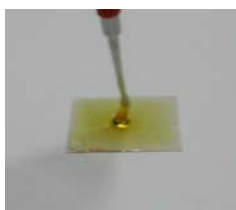
ตอนที่ 1 ศึกษาคุณลักษณะของคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิชที่เตรียมขึ้นเองที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนำไปใช้

ตอนที่ 2 เปรียบเทียบคุณลักษณะของคลอโรเฮ็กซีดีนแซนดาแรควานิชที่เหมาะสมในการนำไปใช้จากตอนที่ 1 กับ คลอโรเฮ็กซีดีนวานิชที่มีจำหน่าย

ตอนที่ 1 การศึกษาคุณลักษณะของคลอโรเฮ็กซีดีนในแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเอง

1.1 การศึกษาการปลดปล่อยคลอโรเฮ็กซีดีนจากคลอโรเฮ็กซีดีนในแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ

เตรียมขึ้นตัวอย่างคลอโรเฮ็กซีดีนวานิชเพื่อเก็บตัวอย่างคลอโรเฮ็กซีดีนที่ปลดปล่อยออกมา โดยนำคลอโรเฮ็กซีดีนในแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเองที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 5, 10, 20 และ 40 ปริมาณ 200 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นแก้ว (glass slide) ขนาด 22x22 มิลลิเมตร (ภาพประกอบ 5) จนเต็มแผ่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 – 20 นาที นำไปชั่งน้ำหนักเล็กน้อยที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกันความเข้มข้นละ 6 ช้อน นำขึ้นตัวอย่างแต่ละแผ่นใส่ลงในภาชนะแก้วที่มีน้ำกลั่น 30 มิลลิตร ซึ่งอยู่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีการเคลื่อนที่แนววนอน (horizontal incubator shaker) ที่ความเร็ว 54 รอบต่อนาที เปลี่ยนน้ำกลั่นทุก 1 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างสารละลายทุก 1 ชั่วโมง ใน 12 ชั่วโมงแรก และทุก 4 ชั่วโมงจนครบ 24 ชั่วโมง รวมเก็บทั้งหมด 15 ช่วงเวลา โดยเก็บช่วงเวลาละ 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างสารละลายตัวอย่างละ 5 มิลลิตรไว้ในหลอดแก้วที่หุ้มด้วยกระดาษตะกั่ว เพื่อนำตัวอย่างสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณคลอโรเฮ็กซีดีน



ภาพประกอบ 5 ลักษณะคลอโรเฮ็กซีดีนในแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเอง สีเหลืองใส มีความหนืดเล็กน้อย เตรียมลงบนแผ่นแก้ว ขนาด 22x22 มิลลิเมตร

วัดปริมาณของคลอโรเฮ็กซีดีนที่ปลดปล่อยออกมาที่เวลาต่าง ๆ โดยใช้เครื่องลิควิดโครมาโทกราฟีคุณภาพสูงชนิด reverse phase (high performance liquid chromatography: HPLC,

Agilent 1100 and Waters, USA) เนื่องจากปริมาณคลอริเอ็กซีดีนที่ปลดปล่อยออกมาที่มีปริมาณที่ต่ำโดยสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ

1. เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase): 0.05 M sodium acetate (Lab – Scan, Ireland) และ 0.005 M heptanesulfonic acid (Fluka, Switzerland) ร่วมกับ acetonitrile (J.T. Breker, Switzerland) ในอัตราส่วน 60 : 40 มีค่ากรด-ด่างเท่ากับ 5
2. เฟสคงที่ (stationary phase): column inertsil ODS 3, ขนาด 5 ไมโครเมตร, 4.6 x 250 มิลลิเมตร (GI Sciences Inc., Japan)
3. อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที
4. ดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ต 260 นาโนเมตร
5. อุณหภูมิห้อง

เตรียมกราฟมาตรฐานจากสารละลายคลอริเอ็กซีดีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นในช่วง 0.05 - 30.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เป็นช่วงความเข้มข้นคลอริเอ็กซีดีนที่ตรวจวัดได้จากการศึกษาของ Lam และคณะ (1993) และเป็นช่วงความเข้มข้นที่ได้จากการทำ pilot study) ฉีดตัวอย่างสารละลายความเข้มข้นละ 50 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง HPLC เพื่อหาพื้นที่ใต้กราฟของคลอริเอ็กซีดีนที่ทราบความเข้มข้นจำนวน 5 ความเข้มข้นในการวัดปริมาณคลอริเอ็กซีดีนของวานิชแต่ละชนิด นำค่าที่ได้เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟกับความเข้มข้นของคลอริเอ็กซีดีนเพื่อใช้ในการหาความเข้มข้นของคลอริเอ็กซีดีนจากตัวอย่างสารละลายที่ศึกษา เตรียมสารละลายคลอริเอ็กซีดีนที่ทราบความเข้มข้นในการเตรียมกราฟมาตรฐานใหม่ทุกครั้งที่ทำกรวัดปริมาณคลอริเอ็กซีดีนที่ปลดปล่อยออกมาจากคลอริเอ็กซีดีนในแซนดาแรควานิซแต่ละชนิด

นำตัวอย่างสารละลายที่ปลดปล่อยจากคลอริเอ็กซีดีนในแซนดาแรควานิซที่เก็บได้ข้างต้น ตัวอย่างละ 50 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ในสภาวะเดียวกัน เพื่อหาพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละเวลาของวานิชแต่ละความเข้มข้น นำค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ไปหาปริมาณคลอริเอ็กซีดีนที่ปลดปล่อยออกมาจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้ข้างต้น

1.2 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ในห้องปฏิบัติการ

1.2.1 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ (minimal inhibitory concentration: MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (minimal bactericidal concentration: MBC)

ค่า MIC และ MBC ของแต่ละห้องปฏิบัติการอาจมีความแตกต่างกัน เนื่องจากสภาวะแวดล้อมที่ใช้ ชนิดของเชื้อแบคทีเรียและอื่น ๆ ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องหา MIC และ MBC ของห้องปฏิบัติการนี้โดยวิธี two fold broth microdilution ดังนี้

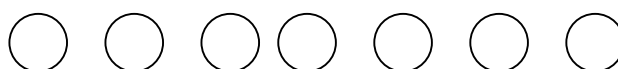
เตรียมเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ใน brain heart infusion broth (Merck, Germany) นำไปเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อ (incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ให้ได้ความหนาแน่นของเชื้อเทียบเท่ากับความขุ่น 0.5 MacFarland หรือค่าการดูดกลืนแสง (OD) เท่ากับ 0.3 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งมีความหนาแน่นของเชื้อประมาณ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

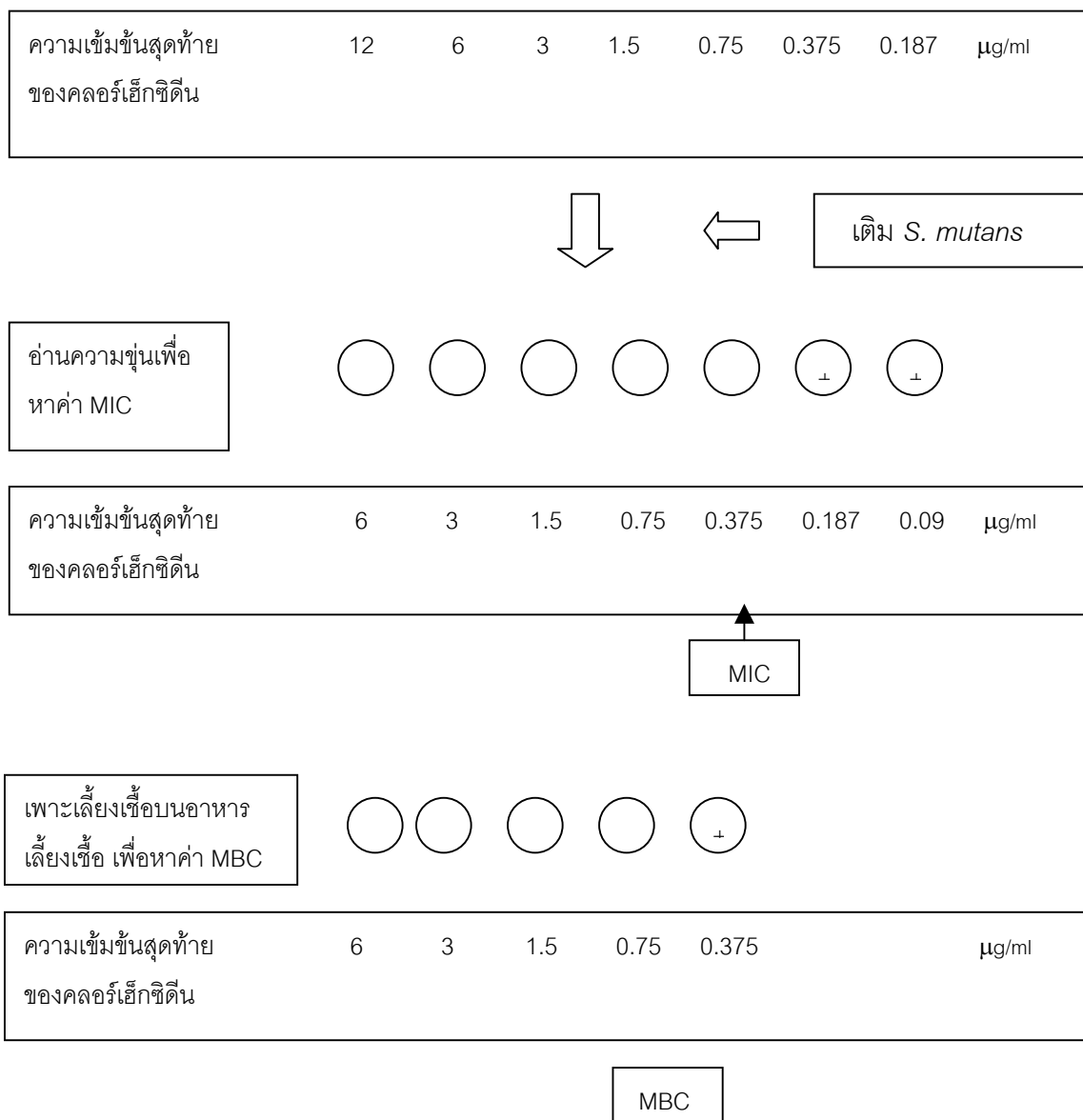
เตรียม brain heart infusion broth ลงในภาชนะหลอดเลี้ยงเชื้อชนิด 96 หลุม จำนวน 3 แถว แถวละ 12 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำสารละลายคลอร์เฮกซิดีนที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอธานอล (จากเกลือคลอร์เฮกซิดีนไดอะซิเตทโมโนไฮเดรท) เติมหลงในหลอดแรกของแต่ละแถว ทำ two - fold dilution ไปยังหลอดต่อๆ ไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 12 - 0.18 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เติมเชื้อ *S. mutans* ที่เตรียมไว้ลงในสารละลายแต่ละหลอด หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของคลอร์เฮกซิดีนอยู่ในช่วง 6 - 0.09 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (เนื่องจากการศึกษาของ Balanyk และ Sandham (1985) ค่า MIC และ MBC ของคลอร์เฮกซิดีนต่อ *S. mutans* JC2 มีค่า 0.39 - 1.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 1.56 - 3.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ กลุ่มควบคุมประกอบด้วยหลอดที่มี 1) brain heart infusion broth และ เอธิลแอลกอฮอล์ ทำ two - fold dilution ไปยังหลอดต่อ ๆ ไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอธิลแอลกอฮอล์เท่ากับที่ผสมอยู่ในสารละลายคลอร์เฮกซิดีนข้างต้น จำนวน 3 แถว แล้วเติมเชื้อ *S. mutans* เพื่อดูผลของเอธิลแอลกอฮอล์ต่อการเจริญเติบโตของ *S. mutans* 2) brain heart infusion broth ที่เติมเชื้อ *S. mutans* เพื่อเป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) 3) brain heart infusion broth ที่ไม่เติมเชื้อ *S. mutans* เพื่อเป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) นำไปเลี้ยงที่สภาวะเดิม นาน 24 ชั่วโมง ประเมินการเจริญเติบโตของ *S. mutans* จากความขุ่นในแต่ละหลอด หลุมที่มีความเข้มข้นของคลอร์เฮกซิดีนต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ (ไม่ขุ่น) คือความเข้มข้นที่เป็น MIC

นำสารละลายในหลอดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อทุกหลอดไปเลี้ยงบนวุ้นเลี้ยงเชื้อชนิดผสมเลือด (blood agar; Merck, Germany) และบ่มใน candle jar ในตู้บ่มเชื้อที่สภาวะเดิม นาน 24 ชั่วโมง ประเมินผลการเจริญเติบโตของเชื้อโดยความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ คือ ความเข้มข้นที่เป็น MBC ดังภาพประกอบ 6

นำค่าความเข้มข้นสูงสุดของคลอริเฮ็กซีดีนที่ปลดปล่อยออกมาของคลอริเฮ็กซีดีนวานิชแต่
ละความเข้มข้นจากการศึกษาที่ 1 เปรียบเทียบกับค่า MIC และ MBC ที่หาได้ เพื่อประเมินผลของ
คลอริเฮ็กซีดีนสูงสุดที่ปลดปล่อยออกมามีผลต่อ *S. mutans* อย่างไร

คลอริเฮ็กซีดีน และ
อาหารเลี้ยงเชื้อ





- ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ

+ มีการเจริญเติบโตของเชื้อ

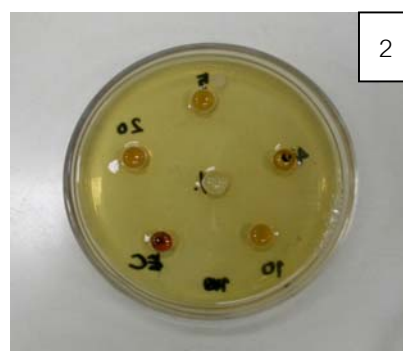
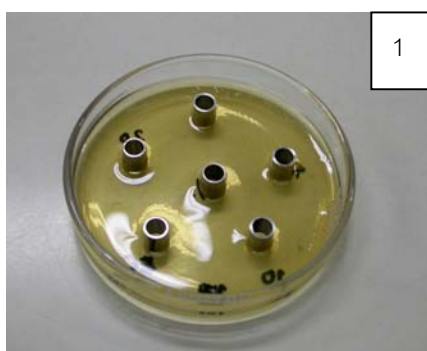
ภาพประกอบ 6 การหาค่า MIC และ MBC ของคลอร์เฮ็กซิดีนต่อเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175

1.2.2 ผลของคลอร์เฮ็กซิดีนวานิชที่เตรียมขึ้นและคลอร์เฮ็กซิดีนที่ถูกปลดปล่อย
ออกมามือ *S. mutans* ATCC 25175 ในห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากแซนดาแรคในแอลกอฮอล์ละลายน้ำไม่ได้ การทดลองนี้จึงใช้วิธี agar diffusion test เตรียมเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ใน brain heart infusion broth โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ได้ความหนาแน่นของเชื้อเมื่อวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.2 นำเชื้อ *S. mutans* 1 มิลลิลิตร เติมลงใน brain heart infusion broth agar 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเทลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ซึ่งมีวงโลหะ (cylinder cup) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตรวางอยู่ เมื่ออุ่นเลี้ยงเชื้อแข็งนำวงโลหะออกจะทำให้เกิดหลุม เติมสารที่จะทดสอบลงในหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร (ภาพประกอบ 7) โดยแต่ละกลุ่มทำการทดลองในจานเลี้ยงเชื้อจานเดียวกันดังนี้

กลุ่มที่ 1) สารละลายคลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้น 1, 3, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (จากเกลือคลอร์เฮกซิดีนไดอะซิเตทโมโนไฮเดรต) หลุมควบคุมคือ เอธิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 เพื่อเตรียมกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อไม่เจริญเติบโตซึ่งมีลักษณะใส (inhibition zone หรือ clear zone) กับความเข้มข้นของคลอร์เฮกซิดีน กลุ่มที่ 2) สารละลายคลอร์เฮกซิดีน ความเข้มข้นสูงสุดที่ถูกปลดปล่อยจากคลอร์เฮกซิดีนวานิล ความเข้มข้นร้อยละ 0, 5, 10, 20 และ 40 ตัวอย่างละ 1 หลุม เพื่อศึกษาผลของคลอร์เฮกซิดีนสูงสุดที่ถูกปลดปล่อยจากคลอร์เฮกซิดีนวานิลในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ กลุ่มที่ 3) คลอร์เฮกซิดีนในแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 0, 5, 10, 20 และ 40 ที่เตรียมขึ้นเอง หลุมควบคุมคือ เอธิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ตัวอย่างละ 1 หลุม เพื่อศึกษาผลของคลอร์เฮกซิดีนวานิลในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ นำจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดบ่มใน candle jar ที่สภาวะเดิม นาน 24 ชั่วโมง

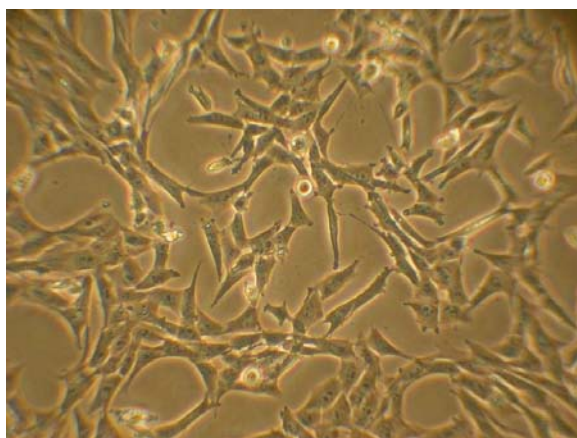
ประเมินผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เชื้อไม่เจริญเติบโตซึ่งมีสีใส (inhibition zone หรือ clear zone) โดยตัวอย่างที่มีระยะเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่าเป็นตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. mutans* ได้มากกว่า ทำการทดลอง 3 ครั้งเพื่อหาค่าเฉลี่ย และประเมินความสามารถของวานิลแต่ละความเข้มข้นที่มีต่อการเจริญเติบโตของ *S. mutans*



ภาพประกอบ 7 1) การเตรียมวุ้นเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ซึ่งมีวงโลหะที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตรวางอยู่ 2) เมื่อวุ้นแข็ง นำวงโลหะออกจะทำให้เกิดหลุม เติมสารที่จะทดสอบลงในแต่ละหลุม

1.3 ศึกษาความเป็นพิษของคลอร์เฮกซิดีนในแซนนาแรควานิซต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/c 3T3 ในห้องปฏิบัติการ

ประเมินความเป็นพิษของคลอร์เฮกซิดีนและคลอร์เฮกซิดีนวานิซต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/c 3T3 ซึ่งได้จากหนู (ภาพประกอบ 8) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco 's modified eagle medium (DMEM: Gibco, USA) ปรับความเป็นกรด – ด่าง ด้วย 10 N HCl มี คาล์ฟ ซีรัม (calf serum) ร้อยละ 10, แอล-กลูตามีน (L-glutamine) 2 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร, เพนนิซิลิน (penicillin) 125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, สเตปโตไมยซิน (streptomycin) 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ เจนตามายซิน (gentamycin) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



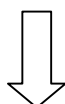
ภาพประกอบ 8 ลักษณะเซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/c 3T3

1.3.1 การหาความเข้มข้นของคลอร์เฮกซิดีนที่ทำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/c 3T3 มีชีวิตร้อยละ 50

โดยวิธี MTT colorimetric assay ซึ่งดัดแปลงมาจากการศึกษาของ Wataha และคณะ (1992) ดังต่อไปนี้

เลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ที่ความหนาแน่น 3×10^4 เซลล์ ต่อตารางเซนติเมตร (เฉลี่ยประมาณ 1×10^4 เซลล์ต่อหลุม) ในอาหารเลี้ยงเซลล์หลุมละ 200 ไมโครลิตร ในตู้บ่มเซลล์ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (CO₂ incubator, Science Tech Co., UK) ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เตรียมสารละลาย คลอร์เฮกซิดีนในอาหารเลี้ยงเซลล์จากสารละลายคลอร์เฮกซิดีนในแอลกอฮอล์เริ่มต้นที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายของคลอร์เฮกซิดีน 0.1, 1, 2, 4, 5, 8, 10, 12, 15 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เป็นช่วงความเข้มข้นที่ได้จากการศึกษาก่อนการทดลอง) แทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์ข้างต้นด้วยสารละลายคลอร์เฮกซิดีนความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้ (10 ความเข้มข้น) ความเข้มข้นละ 6 หลุม หลุมควบคุมคือหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสารละลาย คลอร์เฮกซิดีน จำนวน 6 หลุม และอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 จนมีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 0.95 นำไปเลี้ยงในตู้บ่มเซลล์ที่สภาวะข้างต้นนาน 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีคลอร์เฮกซิดีนออกแทนที่ด้วยสารละลาย MTT (3 – (4,5 dimethylthiazol – 2-yl) – 2, 5 diphenyl tetrazolium bromide: Sigma, Germany) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำเข้าตู้บ่มเซลล์ที่สภาวะเดิมนาน 45 นาที เซลล์ที่มีชีวิตจะติดสีน้ำเงิน เนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถผลิตพลังงานจากการทำงานของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เมื่อไมโทคอนเดรียทำงาน จะมีเอนไซม์ที่จะเปลี่ยนสีเหลืองของ Tetrazolium ไปเป็นสีน้ำเงินของ Formazan blue หลังจากนั้นนำสารละลาย MTT ออก แทนที่ด้วยสารละลาย DMSO (dimethyl sulfoxide: Merck, Germany) หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าก่อนวัดความเข้มสีจากค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่อ่านได้จากเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ดังภาพประกอบ 9

เลี้ยงไฟโบรบลาสต์ในอาหารเลี้ยงเซลล์
200 ไมโครลิตร/หลุม ในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม



บ่มเซลล์นาน 24 ชม.

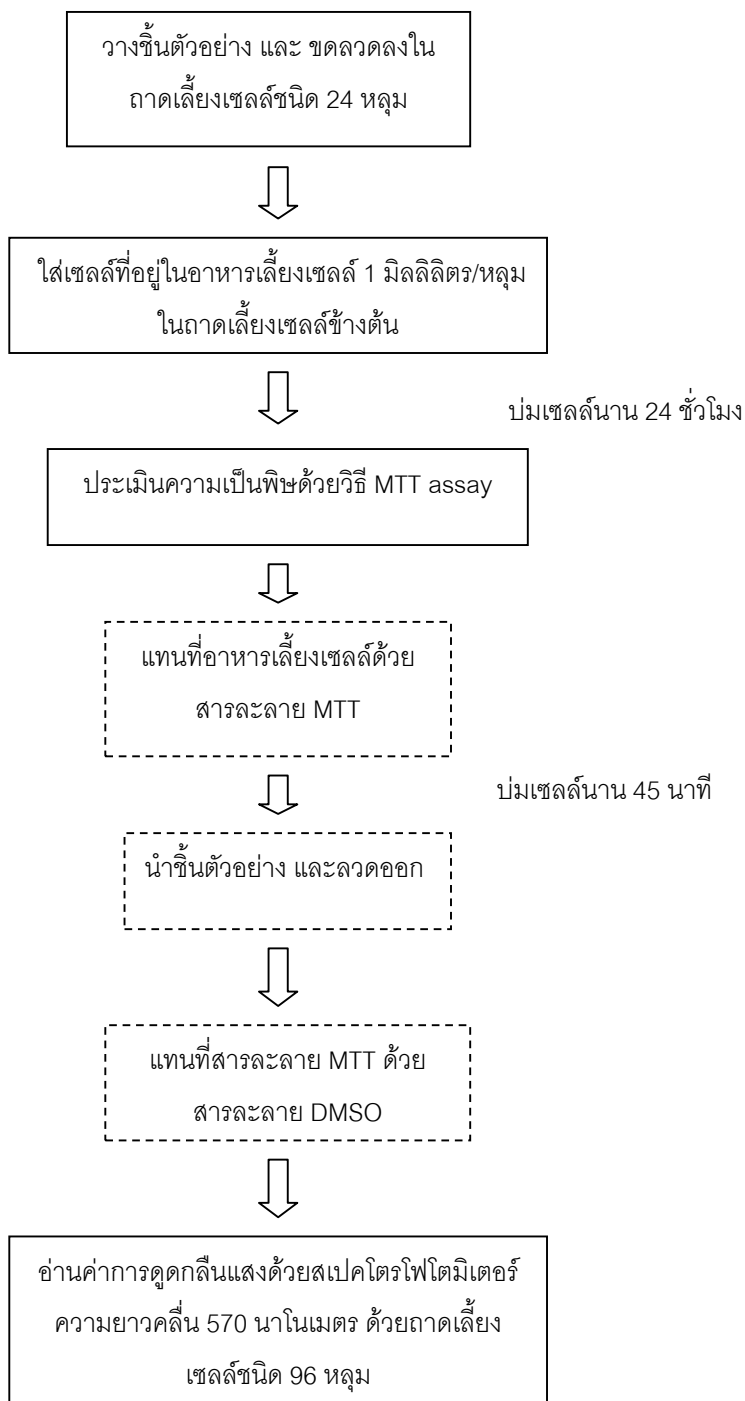
ภาพประกอบ 9 การทดสอบความเป็นพิษของคลอโรเฮ็กซิดีนโดยวิธี MTT colorimetric assay เพื่อหาความเข้มข้นของคลอโรเฮ็กซิดีนที่ทำให้เซลล์มีชีวิตร้อยละ 50

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ของคลอร์เฮ็กซีดีนแต่ละความเข้มข้น ทำการทดลอง 3 ครั้ง โดยกลุ่มควบคุมคือกลุ่มที่มีแอลกอฮอล์ คิดเป็นการมีชีวิตของเซลล์ร้อยละ 100 และเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคลอร์เฮ็กซีดีนกับร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ คำนวณหาค่าความเข้มข้นของคลอร์เฮ็กซีดีนที่ทำให้เซลล์รอดชีวิตร้อยละ 50 จากสมการ $Y = 100 * (1 - X^n) / ((X^n) + (a^n))$ เมื่อ Y คือ ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์, X คือ ความเข้มข้นของคลอร์เฮ็กซีดีน, n คือ ความชันของกราฟที่ได้จากการทำสมการถดถอย และ a คือ ค่าความเข้มข้นของคลอร์เฮ็กซีดีนที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดร้อยละ 50 ด้วยโปรแกรม sigma plot 2000 (SPSS, Inc., USA) นำค่าความเข้มข้นสูงสุดของคลอร์เฮ็กซีดีนที่ปลดปล่อยออกมาในแต่ละชนิดจากการทดลองที่ 1.1 เปรียบเทียบกับค่าความเข้มข้นของคลอร์เฮ็กซีดีนที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดร้อยละ 50 เพื่อประเมินผลของคลอร์เฮ็กซีดีนที่ปลดปล่อยออกมาว่ามีความเป็นพิษอย่างไร

1.3.2 ความเป็นพิษของคลอร์เฮ็กซีดีนในแซนดาแรควานิซที่ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/c 3T3

เตรียมคลอร์เฮ็กซีดีนในแซนดาแรควานิซที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 5, 10, 20 และ 40 ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตรลงบนแผ่นกระดาษกรอง (filter membrane ชนิด hydrophilic polysulfone: PALL Gelman Sciences, SUPOR - 200, 0.2 μm , Michigan) ที่เตรียมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง กลุ่มควบคุมคือชิ้นตัวอย่างที่ไม่มีสารทดสอบใดๆ และชิ้นตัวอย่างที่มีเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ภายในตู้กรองอากาศปราศจากเชื้อ (laminar air flow hood) หลังจากนั้นนำชิ้นตัวอย่างวางลงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม โดยมีขดลวด สเตนเลสกดชิ้นตัวอย่างให้อยู่ในแต่ละหลุม ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเซลล์หนาแน่น 5×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรหลุมละ 1 มิลลิลิตร (ประมาณ 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม) นำเข้าตู้ปั๊มเซลล์ ที่สภาวะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแทนที่ด้วยสารละลาย MTT หลุมละ 300 ไมโครลิตร นำเข้าตู้ปั๊มเซลล์ที่สภาวะเดิมนาน 45 นาที หลังจากนั้นนำสารละลาย MTT ขดลวด และชิ้นตัวอย่างออก แทนที่ด้วยสารละลาย DMSO หลุมละ 300 ไมโครลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า นำตัวอย่างสารละลายที่ได้ใส่ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ก่อนวัดความเข้มสีจากการดูดกลืนแสงโดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ดังภาพประกอบ 10 ทำการทดลอง 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย ตัวอย่างที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูง คือ ตัวอย่างที่มีการรอดชีวิตของเซลล์ที่มากกว่า หรือมีความเป็นพิษน้อยกว่า นำค่าการดูดกลืนแสงที่

ได้ไปหาร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ของคลอโรเฮ็กซีดีนแต่ละชนิด โดยกลุ่มที่ไม่มีสารทดสอบคิดเป็นการมีชีวิตของเซลล์ร้อยละ 100



ภาพประกอบ 10 การดำเนินการทดลองความเป็นพิษของคลอโรเฮ็กซีดีนในแซนดาแคววานิชโดยวิธี MTT colorimetric assay

ตอนที่ 2. การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของคลออร์เฮกซิดีนแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเองกับคลออร์เฮกซิดีนวานิชที่มีจำหน่าย

เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของคลออร์เฮกซิดีนในแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเอง ที่ ความเข้มข้นต่างๆ กับคลออร์เฮกซิดีนวานิชที่มีจำหน่ายซึ่งปัจจุบันมี 3 ชนิด คือ Chlorzoin[®] (Imperial industries, Macclesfield, England), EC 40[®] (Certichem, Nijmegen, Netherlands) และ Cervitec[®] (Vivadent, Schaan, Liechtenstein) เนื่องจากผลการศึกษาในตอนต้นที่ 1 ทำให้ทราบว่าคลออร์เฮกซิดีนในแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเองที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 40 ให้ผลการรักษาที่ดี เหมาะในการนำไปใช้ ในการศึกษาตอนที่ 2 จึงเลือกที่จะศึกษาเปรียบเทียบคลออร์เฮกซิดีนในแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเอง กับ EC 40[®] เนื่องจาก EC 40[®] มีความเข้มข้นของคลออร์เฮกซิดีนที่สูง (ร้อยละ 40) ใกล้เคียงกับคลออร์เฮกซิดีนในแซนดาแรควานิซที่เตรียมขึ้นเองที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 40 มีส่วนผสมของเบสเหมือนกัน คือ แซนดาแรค และมีตัวทำละลายคือ เอทานอล โดย EC 40[®] ได้รับการสนับสนุนจากบริษัท Explore; Certichem, Nijmegen, Netherland

วิธีดำเนินการศึกษามีดังนี้

2.1 การศึกษาการปลดปล่อยคลออร์เฮกซิดีน จากคลออร์เฮกซิดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20, 40 และ EC 40[®] การศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาที่ 1.1.2

2.2 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อ *S. mutans* ATCC 25175 ของคลออร์เฮกซิดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20, 40 และ EC 40[®] และคลออร์เฮกซิดีนความเข้มข้นสูงสุดที่ถูกปลดปล่อยออกมา การศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาที่ 1.2.2

2.3 ความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ Balb/c 3T3 ของคลออร์เฮกซิดีนแซนดาแรควานิซความเข้มข้นร้อยละ 20, 40 และ EC 40[®] การศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาที่ 1.3.2

ผิดพลาด! ไม่ใช่วัตถุผนวกที่ถูกต้อง