2. วัสดุและวิธีการ

2.1 สารเคมี

การทดลองนี้ใช้ chlorhexidine digluconate (Hibitane 20%, ICI Ltd, Macclesfield ประเทศอังกฤษ) ส่วนสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมบัฟเฟอร์ ซึ่งได้แก่ phosphoric acid, sodium hydroxide, disodium hydrogen phosphate เป็นของบริษัท E Merck, Darmstadt ประเทศเยอรมนี Triethylamine และสารทำละลายคือ acetonitrile (HPLC grade), methanol (HPLC grade) เป็นของ JT Baker, NJ, ประเทศสหรัฐอเมริกา, 1-heptane sulphonate จาก BDH, Poole, ประเทศอังกฤษและน้ำกลั่นที่เป็นชนิดบริสุทธิ์ ที่ใช้กับ HPLC (Milli Q deionised water)

2.2 การวิเคราะห์คลอร์เฮกซิดีน

การศึกษานี้ได้เครื่อง HPLC รุ่น system gold (Beckman, Fullerton ประเทศสหรัฐอเมริกา) ซึ่งมี detector ชนิด UV และใช้ automate sampler ที่มีปริมาตรของตัวอย่างเท่ากับ 100 µl โดยใช้ column ชนิด reversed-phase (Ultrasphere C-18, Beckman) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณคลอร์เฮกซิดีน โดยใช้ mobile phase buffer ที่ประกอบด้วย acetonitrile กับ phosphate buffer ที่มี Na_2HP0_4 0.1M, triethylamine 0.05 M และ 1-heptane sulphonate 5 mM ในอัตราส่วน 35:65, pH 2.5 ซึ่งการใช้ sodium heptane sulfonate เป็น ion-pairing agent นั้นเนื่องจากคลอร์เฮกซิดีนเป็นสารที่มีประจุบวกในช่วง pH ที่เป็นกรด วิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวดัดแปลงมาจาก Pesonen และคณะ[10] โดยกำหนดให้ flow rate ที่ 1 มล/นาที และอ่านผลที่ความยาวคลื่น 260 nm. ทำการวัดคลอร์เฮกซิดีนที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 40 ไมโครกรัม/มล. จากนั้นนำค่าพื้นที่ของ peak คลอร์เฮกซิดีนที่คำนวณได้จากเครื่องในแต่ละความเข้มข้นไปทำ carlibration curve โดยโปรแกรม linear regression ที่มีมากับเครื่อง HPLC

2.3 การสกัดคลอร์เฮกซิดีนในน้ำลาย

ทำการเก็บน้ำลายในลักษณะที่ไม่มีการกระตุ้นการหลั่ง (non stimulated saliva) จากนั้นจึงปั่นเพื่อกำจัดเศษอาหารที่อาจปะปนมา แล้วปรับ pH ของน้ำลายให้เป็นด่างเพื่อลดปริมาณประจุบนโมเลกุลของคลอร์เฮกซิดีน ด้วยการใช้ 4.5 M NaOH 400µl ต่อน้ำลาย 200 µl แล้วจึงเติม acetonitrile 400 µl ทำการเขย่า (vortex-mixed) ประมาณ 1 นาที เพื่อให้สารทำละลายสกัดคลอร์เฮกซิดีน และทำให้ตัวยากระจายอยู่ในชั้นอินทรีย์ (acetonitrile) ทำการแยกชั้นโดยปั่นที่ 14000 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดชั้น acetonitrile ซึ่งมีคลอร์เฮกซิดีนละลายอยู่โดยใช้ปริมาตร 200 µl ไปใส่ในหลอดทดลองใหม่ แล้วเติม mobile phase buffer 370 µl ทำการวิเคราะห์หาปริมาณคลอร์เฮกซิดีนตามวิธีที่กล่าวมาในหัวข้อ 2.2

2.4 การศึกษาเภสัชจลนพลศาสตร์

การศึกษานี้เลือกใช้น้ำยาที่มีความเข้มข้นของคลอร์เฮกซิดีน 0.2% ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่นิยมใช้ในการควบคุมแบคทีเรียในช่องปาก และมีรายงานว่ามีประสิทธิผลดีในการร่วมใช้เพื่อรักษาโรคปริทันต์อักเสบ ทำการทดลองโดยใช้อาสาสมัคร 3 คน ที่มีสุขภาพดีและไม่เป็นผู้ใช้คลอร์เฮกซิดีนในรูปแบบใดๆ ในช่วงที่ทำการทดลอง เก็บน้ำลายของอาสาสมัครในลักษณะที่ไม่มีการกระตุ้นเพื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าเริ่มต้น (baseline) และอัตราหลั่งของน้ำลาย (flow rate) จากนั้นให้อาสาสมัครบ้วนน้ำยาที่มีคลอร์เฮกซิดีน 0.2% ปริมาณ 10 มล เป็นเวลา 1 นาที แล้วบ้วนน้ำยาทิ้ง ต่อมาทำการเก็บน้ำลาย 5 30 60 90 และ 120 นาที หลังจากบ้วน ทำการวิเคราะห์หาปริมาณคลอร์เฮกซิดีนโดยวิธีที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 2.3

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

- ทำการศึกษา calibration curve โดยการใช้ linear regression ด้วยโปรแกรมที่มีมาพร้อมเครื่อง HPLC
- คำนวณค่าทางเภสัชจลนพลศาสตร์ของคลอร์เฮกซิดีนในน้ำลาย โดยใช้โปรแกรม (WinNonlin, Scientific Consulting, Inc, สหรัฐอเมริกา) โดยใช้แบบจำลอง two-compartment open model[11]

$$Cs = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

โดย Cs = ความเข้มข้นของคลอร์เฮกซิดีนในน้ำลาย ณ เวลา t (µg/ml)

α และ β = ค่าคงที่ (rate constant ของ distribution และ elimination phase ตามลำดับ)

A และ B = intercept บนแกน Y ของ exponential segment ในสมการ

จากสมการดังกล่าว ทำให้สามารถคำนวณพื้นที่ใต้ curve (AUC) ได้โดย

$$AUC = \int_0^{\alpha} C_s dt = A/\alpha + B/\beta$$

biological – half life ($t_{1/2}$) ของแต่ละ phase จะมีค่าดังนี้

$t_{1/2}(\alpha) = 0.693/\alpha$

$t_{1/2}(\beta) = 0.693/\beta$

โดยมีค่าความเข้มข้นสูงสุด คือที่ ณ เวลา t=0, (C_{max}) = A+B μg/ml

จากค่า parameter ต่างๆ ทำให้สามารถคำนวณปริมาณยาที่คงค้างในช่องปากของแต่ละบุคคล (oral retention) ได้ดังนี้

เปอร์เซ็นต์ที่คลอร์เฮกซิดีน = $\frac{\text{อัตราหลั่งน้ำลาย (ml/h) x AUC } (\mu\text{g.h/ml}) \text{ x 100}}{\text{ปริมาณคลอร์เฮกซิดีนทั้งหมดที่มีใน 10 มล } (\mu\text{g})}$

คงเหลืออยู่ในช่องปาก