บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่1 การศึกษาระยะเวลาในการสลายตัวของคลอร์เฮกซิดีนเจลที่ใช้สารตัวนำสองชนิดในความเข้มข้นต่างๆกัน

1. เตรียมคลอร์เฮกซิดีนเจล 1% โดยใช้สารตัวนำสองชนิด คือ เมทิลเซลลูโลส และทรากาแคนธ์ ความเข้มข้นของสารตัวนำแต่ละชนิดเป็น 4% 4.5% 5% 5.5% และ 6% รวมทั้งสิ้นเป็น 10 ตัวอย่าง

2. บรรจุคลอร์เฮกซิดีนเจลในกระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดยาเบอร์ 21 ปลายทื่อ

3. ฉีดคลอร์เฮกซิดีนเจลที่เตรียมได้ลงในก้นหลอดขนาดเล็ก 300 มิลลิกรัม เติมสารละลายสีผสมอาหารสีเหลือง ความเข้มข้น 0.01% W/V 4 มิลลิลิตรตั้งทิ้งไว้ สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่ระยะเวลาต่างๆกันเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นคว่ำหลอดทดลองและสังเกตความคงสภาพของเจลภาย

ในเวลา 2 นาที ถ้าเจลสามารถเกาะตัวอยู่ที่ก้นหลอดได้ถือว่ายังคงสภาพของเจลอยู่ บันทึกวันที่เจลเริ่มเปลี่ยนสภาพไป

4. ทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง และเปรียบเทียบวันที่เจลเปลี่ยนสภาพของแต่ละตัวอย่าง

ตอนที่2 การศึกษาคุณสมบัติการปลดปล่อยตัวยาคลอร์เฮกซิดีนออกจากเจล ในสภาวะจำลองสภาพร่องเหงือก และประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแอกติโนแบซิลลัส แอกติโนมัยซีเทมโคมิเทนส์ ของสารละลายยาที่ปลดปล่อยออกมาในช่วงเวลาต่างๆ

1. เตรียมคลอร์เฮกซิดีนเจลที่ความเข้มข้นของคลอร์เฮกซิดีน ไดกลูโคเนต 0.12% 0.2% 1% และ 2% ในสารตัวนำ 2 ชนิด กำหนดความเข้มข้นของสารตัวนำที่เลือกใช้ให้พิจารณาจากผลการศึกษาตอนที่ 1

2. การวัดการปลดปล่อยตัวยาคลอร์เฮกซิดีนออกจากเจลในสภาวะจำลองสภาพร่องเหงือกด้วยชุดเครื่องมือเก็บสารละลายคลอร์เฮกซิดีนที่ปลดปล่อยจากเจล (ภาพที่ 1) ซึ่งมีส่วนประกอบสำคัญ 3 ส่วน คือ

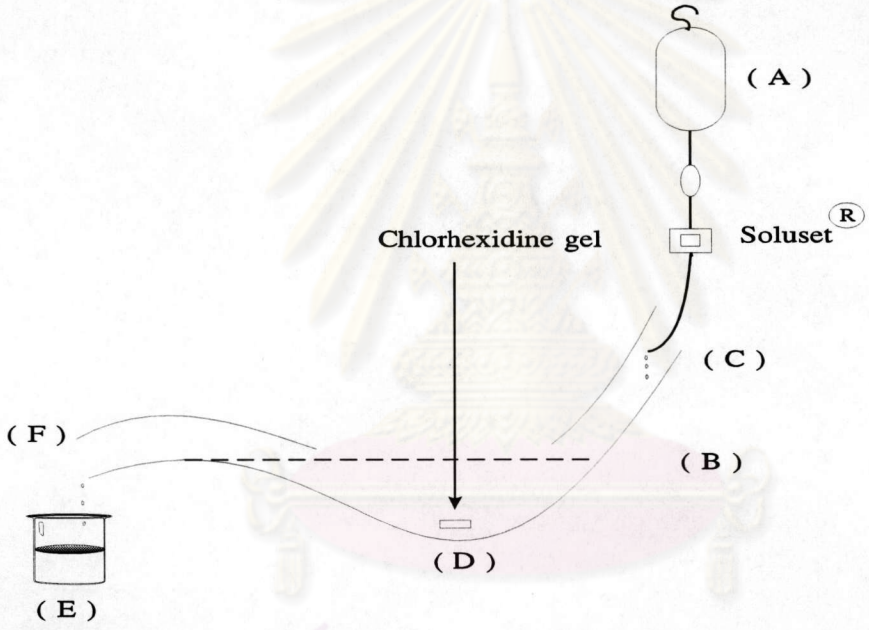
2.1 อุปกรณ์ควบคุมการไหลของน้ำกลั่น ในการศึกษานี้ใช้ Soluset® ซึ่งเป็นชุด I.V.administration set ที่ถูกควบคุมให้มีปริมาณการไหลของของเหลว 60 หยด เท่ากับ 1 มิลลิลิตร และมีกระบอกบรรจุของเหลวได้ 100 มิลลิลิตร

2.2 ส่วนจำลองสภาพร่องเหงือกที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ (ดัดแปลงจาก Noguchi และคณะ Bull.Tokyo Med.Dent.Univ.1984) เป็นท่อแก้วกลวง ที่ดัดให้มีลักษณะโค้งงอ มีแอ่งแก้ว

ภายใน และมีปลายเปิดทั้งสองด้าน ถูกยึดด้วยขาตั้ง (Stand) และตัวหนีบยึด (Clamp) เพื่อให้แอ่งแก้วอยู่ในตำแหน่งเดียวกันตลอดการศึกษา

2.3 หลอดแก้ว เพื่อรองรับสารละลายที่ไหลออกจากปลายล่างของท่อแก้ว

ทั้งท่อแก้ว และหลอดแก้วที่รองรับสารละลาย จะถูกหุ้มด้วยกระดาษตะกั่ว เพื่อป้องกันไม่ให้แสงทำปฏิกิริยากับคลอร์เฮกซิดีนได้



ภาพที่ 3 แสดงชุดเครื่องเก็บสารละลายคลอร์เฮกซิดีนที่ปลดปล่อยจากเจล ประกอบด้วย (A) อุปกรณ์ควบคุมการไหลของน้ำกลั่น Soluset® พร้อมเข็มฉีดยา (B) ส่วนจำลองสภาพร่องเหงือก มีลักษณะเป็นท่อแก้วกลวง โค้งงอ ปลายเปิดสองข้าง ปลายด้านบน(C) รองรับน้ำกลั่นที่ไหลจาก Soluset® (D) แอ่งแก้ว ซึ่งเป็นตำแหน่งที่วางคลอร์เฮกซิดีนเจล (E) หลอดแก้วรองรับสารละลายที่ไหลออกจากส่วนจำลองสภาพร่องเหงือกที่ปลายด้านล่าง (F)

3. ฉีดคลอร์เฮกซิดีนเจล 100 มิลลิกรัม ลงบนแถบกระดาษกรองเบอร์ 2 ขนาด 1x2 เซนติเมตร แล้วใช้กระดาษกรองอีกแผ่นปิดทับ วางแถบกระดาษกรองที่มีคลอร์เฮกซิดีนเจลลงในแอ่งแก้ว (D)

4. ที่ปลายด้านบนสุด (C) ของส่วนจำลองสภาพร่องเหงือก ปรับน้ำกลั่นหยดในอัตราการไหลประมาณ 2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หรือประมาณ 2 หยดต่อนาที ซึ่งควบคุมด้วย Soluset ®

5. เก็บสารละลายที่ไหลออกจากปลายด้านล่าง (F) ของส่วนจำลองสภาพร่องเหงือก ในช่วงเวลาต่างๆ คือ ชั่วโมงที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 36, 48, 60 และ 72 เป็นเวลานานตัวอย่างละ 60 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำสารละลายที่เก็บได้ในช่วงเวลาเดียวกันผสมรวมกัน เก็บตัวอย่างไว้ในตู้แช่แข็งจนกว่าจะนำไปศึกษาต่อไป

6. วัดค่าแอบซอร์แบนซ์ของสารละลายตัวอย่างที่เก็บได้ โดยใช้เครื่องยูวีสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (U.V. spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 253 นาโนเมตร (Addy, Langeroudi และHassan, 1985) ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ (Blank) วัด 5 ครั้งและหาค่าเฉลี่ย ในกรณีที่ตัวอย่างมีค่าแอบซอร์แบนซ์มากกว่า 1 ให้แบ่งสารละลายตัวอย่างมาเจือจาง และนำไปวัดหาค่าแอบซอร์แบนซ์ จากกฎของเบียร์ (Beer's law) (กิตติพงศ์ วีรวัฒนเมธินทร์ และคณะ, 2528) ค่าแอบซอร์แบนซ์ที่เหมาะสมในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นควรอยู่ในช่วง 0.15-1.0 ซึ่งทำให้ค่าความคลาดเคลื่อนอยู่ระหว่าง 1-2% เนื่องจากกราฟระหว่างค่าแอบซอร์แบนซ์กับความเข้มข้นของคลอร์เฮกซิดีนเป็นกราฟเส้นตรง

7. คำนวณค่าความเข้มข้นของคลอร์เฮกซิดีน ไดกลูโคเนต ที่มีอยู่ในแต่ละสารละลายตัวอย่าง จากการเปรียบเทียบค่าแอบซอร์แบนซ์กับกราฟมาตราฐาน ระหว่างค่าแอบซอร์แบนซ์กับความเข้มข้นของคลอร์เฮกซิดีนที่เตรียมขึ้น ในความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.002% W/V, 0.001% W/V,

0.0009% W/V, 0.0008% W/V, 0.0007% W/V, 0.0006% W/V, 0.0005% W/V และ 0.0004% W/V โดยใช้สารตั้งต้นจากการผสมสารละลายคลอร์เฮกซิดีน ไดกลูโคเนต 20% W/V กับน้ำกลั่น เพื่อเป็นสารละลายมาตรฐาน และคำนวณหาสมการความถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างค่าแอบซอร์แบนซ์กับค่าความเข้มข้นของสารละลายคลอร์เฮกซิดีน

8. นำสารละลายตัวอย่างที่เก็บได้ในชั่วโมงต่างๆมาทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแอกติโนแบซิลลัส แอกติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ สายพันธุ์วายสี่ (*Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4) โดยนำสารละลายเชื้อแอกติโนแบซิลลัส แอกติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดไม่จำเพาะ ทริปติเคส ซอย (Trypticase soy broth) และใช้ปริมาณเชื้อที่เหมาะสม โดยการวัดความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เพื่อให้ได้สารละลายเชื้อแอกติโนแบซิลลัส แอกติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ที่มีปริมาณเชื้อใกล้เคียงกันสำหรับการทดสอบทุกครั้ง

9. ในการทดสอบแต่ละครั้ง ใช้สารละลายเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายตัวอย่างที่เก็บได้ในช่วงเวลาต่างๆปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้หนึ่งชั่วโมงภายในตู้เลี้ยงเชื้อที่มีบรรยากาศประกอบด้วยกาซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 5% เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการทำลายเชื้อแอกติโนแบซิลลัส แอกติโนมัยซีเทมโคมิแทมส์ โดยฤทธิ์ของตัวยาคลอร์เฮกซิดีน จากนั้นให้หยุดปฏิกิริยา (Stop reaction) ของคลอร์เฮกซิดีนที่ยังคงเหลืออยู่ ซึ่งอาจมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ต่อๆไป โดยวิธีการเจือจางสารละลาย (Dilution method) หนึ่งต่อหมื่นส่วน (1: 10^4) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติเคส ซอย ก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งต่อไป ซึ่งสัดส่วนการเจือจางดังกล่าวนี้ได้จากการทดลองนำร่องดังจะกล่าวข้างท้าย

10. นำสารละลายข้อ 9 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่จำเพาะต่อเชื้อแอกติโนแบซิลลัส แอกโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ ในการวิจัยนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดทริปติเคส ซอย-ซีรัม-เบซิทราซิน-แวนโคมัยซิน หรือเรียกย่อๆว่า ทีเอสบีวี (trypticase soy-serum-bacitracin-vancomycin: TSBV) เกลี่ยเชื้อด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล (Bended glass rod) ให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปเพาะในตู้อบที่มีบรรยากาศกาซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 ° เซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

11. เตรียมหลอดควบคุมโดยนำสารละลายเชื้อปริมาตร 450 ไมโครลิตร มาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติเคส ซอยปริมาตร 450 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ภายในตู้เลี้ยงเชื้อที่บรรยากาศประกอบด้วยกาซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง จากนั้นเจือจางหนึ่งต่อหมื่นส่วน ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติเคส ซอย แล้วนำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทีเอสบีวี เป็นเวลา 3 วัน เช่นกัน

12. นับจำนวนโคโลนีของเชื้อแอกติโนแบซิลลัส แอกติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งของสารละลายตัวอย่าง เปรียบเทียบกับจำนวนโคโลนีที่สามารถ เจริญได้ของหลอดควบคุม แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซนต์ของการยับยั้งเชื้อของคลอร์เฮกซิดีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

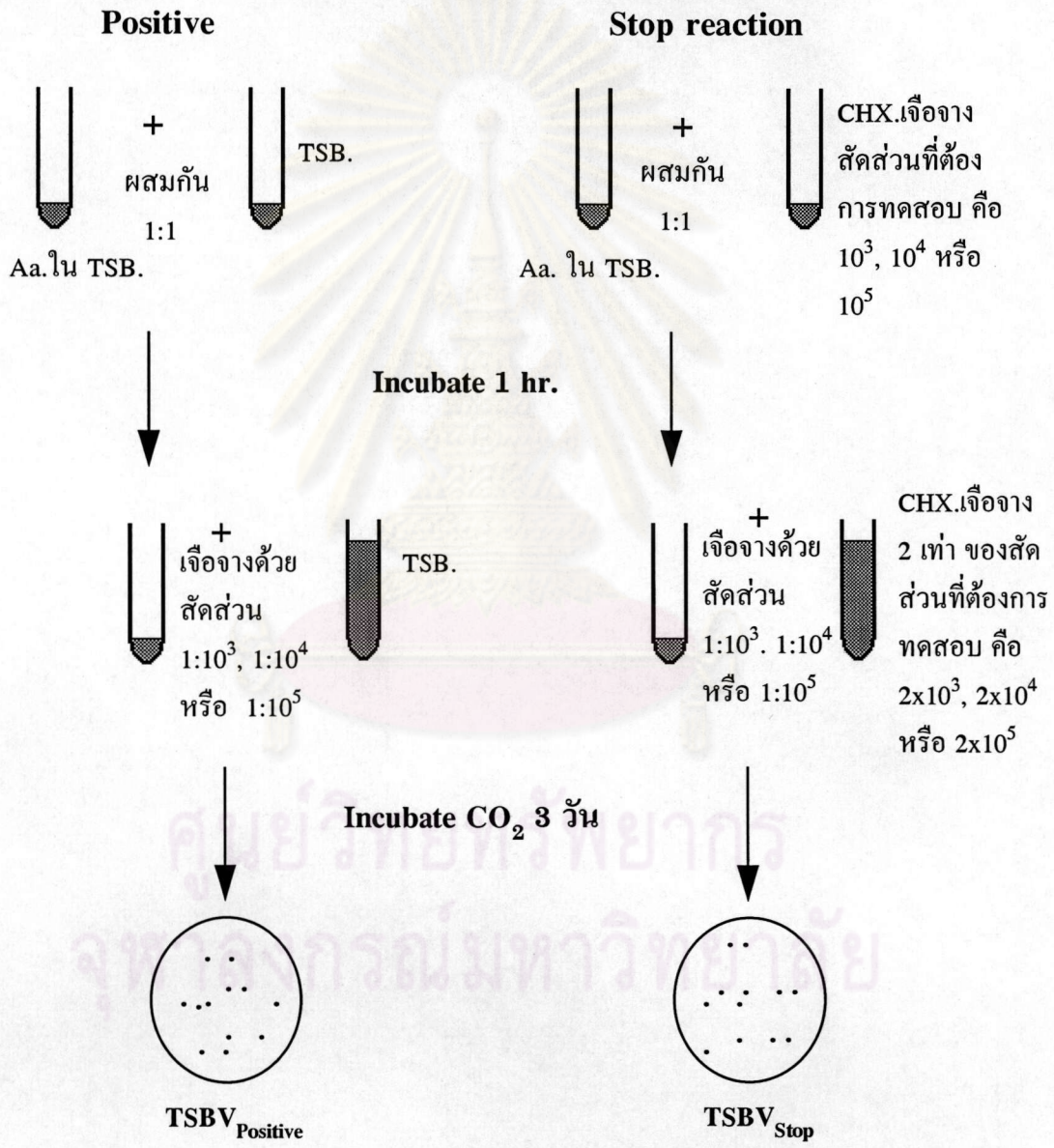
การทดลองนำร่องเพื่อหาสัดส่วนในการเจือจางสารละลายตัวอย่าง

เนื่องจากการศึกษานี้เกี่ยวกับประสิทธิภาพของคลอร์เฮกซิดีนเจลในการฆ่าเชื้อแอกติโนแบซิลัส แอกติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ โดยการผสมสารละลายคลอร์เฮกซิดีนกับเชื้อมาตรฐาน แล้วปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาการทำลายเชื้อเป็นระยะเวลาหนึ่ง จึงนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หากในการศึกษานี้ไม่ผ่านกระบวนการเจือจางสารละลายเพื่อหยุดปฏิกิริยาของคลอร์เฮกซิดีนที่เหลืออยู่ก่อนนำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ผลการศึกษาที่ได้จะเกิดความคลาดเคลื่อนขึ้น เนื่องจากคลอร์เฮกซิดีนยังสามารถออกฤทธิ์ต่อเชื้อแอกติโนแบซิลัส แอกติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ได้ต่อไป ดังนั้นวิธีการเจือจางสารละลายคลอร์เฮกซิดีน จะทำให้ปริมาณของคลอร์เฮกซิดีนที่เหลืออยู่ในสารละลายมีปริมาณน้อยจนกระทั่งไม่สามารถออกฤทธิ์ต่อเชื้อแอกติโนแบซิลัส แอกติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ได้อีกต่อไป ขั้นตอนการหาสัดส่วนเหมาะสมที่จะนำมาใช้เจือจางสารละลาย (Dilution method) เพื่อหยุดปฏิกิริยา (Stop reaction) ของคลอร์เฮกซิดีนเป็นดังนี้

1. เลือกสารละลายคลอร์เฮกซิดีนที่เก็บจากปลายด้านล่างของชุดเครื่องมือเก็บสารละลายคลอร์เฮกซิดีนที่ปลดปล่อยจากเจล ที่มีค่าแอบซอร์แบนซ์สูงสุดในแต่ละชนิดของสารตัวนำ นำมาใช้ในการทดลองนำร่อง

2. นำสารละลายเชื้อแอกติโนแบซิลัส แอกติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดทริปติเคส ซอย นาน 1 วัน ปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ

3. หาสัดส่วนที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเจือจางสารละลายคลอร์เฮกซิดีน โดยเจือจางสารละลายคลอร์เฮกซิดีนในสัดส่วน $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$ จากนั้นทำการทดลองโดยใช้สารละลายที่เจือจางแล้วทั้ง 3 ชนิดนั้นตามแผนภูมิข้างล่าง



4. นับจำนวนโคโลนีที่สามารถเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อของทั้งสองกลุ่ม คือ กลุ่ม Positive control ($TSBV_{Positive}$) และกลุ่ม Stop reaction ($TSBV_{Stop}$) พร้อมทั้งบันทึกผล

5. การแปลผลการทดลองนำร่องมีดังนี้ ถ้าจำนวนโคโลนีที่สามารถเจริญบนจานเพาะเชื้อของกลุ่ม $TSBV_{Stop} \geq$ จำนวนโคโลนีที่นับได้ของจานเพาะเชื้อจากกลุ่ม $TSBV_{Positive}$ แสดงว่าสัดส่วนที่ใช้ในการเจือจางคลอร์เฮกซิดีนนี้สามารถหยุดปฏิกิริยาของคลอร์เฮกซิดีนที่มีต่อเชื้อแอกติโนแบซิลัส แอกติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ได้ ถ้าจำนวนโคโลนีที่สามารถเจริญบนจานเพาะเชื้อของกลุ่ม $TSBV_{Stop} <$ จำนวนโคโลนีที่นับได้ของจานเพาะเชื้อจากกลุ่ม $TSBV_{Positive}$ แสดงว่าสัดส่วนที่ใช้ในการเจือจางยังไม่เพียงพอที่จะยับยั้งฤทธิ์ของคลอร์เฮกซิดีนต่อเชื้อแอกติโนแบซิลลัส แอกติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ได้ พิจารณาใช้ค่าสัดส่วนในการเจือจางสารละลายที่น้อยที่สุดที่สามารถหยุดปฏิกิริยาของคลอร์เฮกซิดีนในการศึกษาดังที่ได้กล่าวไว้แล้ว

จากการศึกษานำร่องเพื่อหาสัดส่วนในการเจือจางสารละลายตัวอย่างเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของคลอร์เฮกซิดีนพบว่าเมื่อใช้สัดส่วนในการเจือจางสารละลาย $1:10^3$ จำนวนโคโลนีที่นับได้ของกลุ่ม $TSBV_{Stop} <$ จำนวนโคโลนีที่นับได้ของ กลุ่ม $TSBV_{Positive}$ แต่เมื่อเพิ่มสัดส่วนในการเจือจางสารละลายเป็น $1:10^4$,และ $1:10^5$ พบว่าจำนวนโคโลนีที่ได้ของกลุ่ม $TSBV_{Stop} \geq$ จำนวนโคโลนีที่ได้ของกลุ่ม $TSBV_{Positive}$

ดังนั้นในการศึกษาตอนที่ 2 จึงพิจารณาใช้สัดส่วน หนึ่งต่อหมื่น ($1:10^4$) ซึ่งเป็นสัดส่วนการเจือจางสารละลายที่น้อยที่สุดที่สามารถหยุดปฏิกิริยาของคลอร์เฮกซิดีนต่อเชื้อแอกติโนแบซิลลัส แอกติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ได้

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. ชุดเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมคลอร์เฮกซิดีนเจล ได้แก่ โกร่งบดยา บีกเกอร์ กระบอกตวง แท่งแก้วคนยา ปิเปต

2. เครื่องชั่งน้ำหนัก Mettler A261 Dalta Range® บริษัท Mettler instrument AG. ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3. เครื่องยูวีสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Hitachi 220A (ภาพที่ 4)

4. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Novaspec® II บริษัท Pharmacia ประเทศอังกฤษ (ภาพที่ 5)

5. ชุดเครื่องมือเก็บสารละลายคลอร์เฮกซิดีนที่ปลดปล่อยจากเจล

6. Soluset® บริษัทแอ็บบอต ไอร์แลนด์ จำกัด ประเทศไอร์แลนด์

7. ชุดเครื่องมือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ จานเพาะเชื้อ แท่งแก้วรูปตัวแอล ตะเกียงแอลกอฮอล์ หลอดทดลองพร้อมฝาปิด ปิเปต ไมโครปิเปต

8. ตู้เลี้ยงเชื้อที่บรรยากาศประกอบด้วยกาซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (Infrared CO_2 Incubator) บริษัท Forma scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา (ภาพที่ 6)

9. เครื่อง Vortex mixer

10. เครื่องนับจำนวนโคโลนี (Colony counter 560) บริษัท Suntex ประเทศไต้หวัน (ภาพที่ 7)

11. เชื้อแอกติโนแบซิลัส แอกติโนมัยซีเทมโคมิแทนส์ สายพันธุ์วายสี่

12. สารที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ มีดังนี้

12.1 ทริปติเคส ซอย บรอธ (Trypticase soy broth) บริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

12.2 ทริปติเคส ซอย อะการ์ (Tryticase soy agar) บริษัท Difco Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

12.3 เบซิทราซิน (Bacitracin Zinc Salt) Lot.No. 17F-0603 บริษัท Sigma® chemical company ประเทศสหรัฐอเมริกา

12.4 แวนโคมัยซิน (Vancomycin hydrochloride) Lot.No. 16F-0059 บริษัท Sigma® chemical company ประเทศสหรัฐอเมริกา

12.5 Yeast extract Lot.No. B3DXCQ (BBL®) บริษัท Becton Dickinson Microbiology Systems ประเทศสหรัฐอเมริกา

12.6 เลือดม้า สภากาชาดไทย

13. สารที่ใช้ในการเตรียมคลอร์เฮกซิดีนเจล ได้แก่

13.1 สารละลายคลอร์เฮกซิดีน ไดกลูโคเนท 20% W/V (Hibitane® บริษัทICI pharmaceuticals ประเทศอังกฤษ

13.2 กลีเซอรอล (Glycerine USP)

13.3 เมธิลเซลลูโลส (400 cP.) (Methocel A4c.) บริษัท Colorcon Limited

13.4 ทรากาแคนธ์ (AT 65)

13.5 เมธิลพาราเบน (Methyl paraben USP)

13.6 โพรพิลพาราเบน (Propyl paraben USP)

13.7 พรอไพลีน ไกลคอล (Propylene glycol USP)

13.8 น้ำกลั่น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4 แสดงเครื่อง HITACHI 220A SPECTROPHOTOMETER ซึ่งเป็นยูวีสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

ภาพที่ 5 แสดงเครื่อง NOVASPEC® II SPECTROPHOTOMETER

ภาพที่ 6 แสดง INFRARED CO_2 INCUBATOR ซึ่งเป็นตู้เลี้ยงเชื้อที่บรรยากาศประกอบด้วย กาซ CO_2 5%

ภาพที่ 7 แสดงเครื่อง COLONY COUNTER 560 ซึ่งเป็นเครื่องนับจำนวนโคโลนี