หอสมุดกลาง
จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สารสังเคราะห์และยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดลอง

สารสังเคราะห์ชนิดที่ 1 5-(2-nitrobenzylidene) rhodanine (R-1)

" " 2 5-(4-nitrobenzylidene) rhodanine (R-2)

" " 3 5-(2,6-dichlorobenzylidene) rhodanine (R-3)

" " 4 5-(2-chlorobenzylidene) rhodanine (R-4)

" " 5 5-(4-chlorobenzylidene) rhodanine (R-5)

" " 6 5-(4-N-dimethylaminobenzylidene) rhodanine (R-6)

" " 7 5-(3,4-methylenedioxybenzylidene) rhodanine (R-7)

สารสังเคราะห์ทั้ง 7 ชนิดนี้ได้มาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชัย โตวิวิชญ์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย ดังแสดงในตารางที่ 1 ส่วนยาปฏิชีวนะที่ใช้มี 4 ชนิดคือ เพ็นนิซิลลิน (Merck & Co., Inc., U.S.A.) สะเตร็ปโตมัยซิน (Merck & Co., Inc., U.S.A.) เตตราไซคลิน (Pfizer Inc., U.S.A.) คลอแรมฟินิคอล (T.P. Drug) ซึ่งอยู่ในรูปของยาฉีด

2. บักเตรีที่ใช้ในการทดลอง

บักเตรีที่ใช้มีทั้งแกรมบวก (Gram positive) และแกรมลบ (Gram negative) รวมทั้งสิ้น 22 ชนิด ส่วนใหญ่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ บางชนิดได้จากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Bacillus subtilis ATCC 6633

Serratia marcescens

Salmonella paratyphi A

Salmonella derby

Salmonella typhi

Salmonella anatum

Pseudomonas aeruginosa

Proteus vulgaris

Proteus mirabilis

Proteus rettigeri

Klebsiella pneumoniae

Enterobacter cloaca

Citrobacter freundii

Shigella dysenteriae

Shigella sonnei

Shigella boydii

Shigella flexneri

Escherichia coli ATCC 25922

Escherichia coli

Staphylococcus aureus ATCC 25923

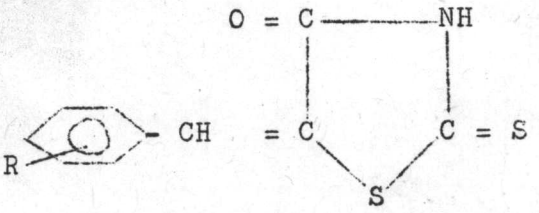
Staphylococcus aureus

Streptococcus faecalis

บักเตรีทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้เก็บรักษาโดยเพาะเลี้ยงใน tryptic soy agar (Difco. U.S.A.) slant (TSA slant) และถ่ายเชื้อใส่ลงใน TSA slant หลอดใหม่ทุก ๆ 5 วัน เมื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจึงเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 สูตรโครงสร้างและคุณสมบัติของสารสังเคราะห์ที่ใช้ในการทดลอง

สูตรทั่วไป :



รหัส	R	สูตร	จุดหลอมเหลว	ลักษณะ
R-1	2-Nitro	$C_{10}H_6N_2O_3S_2$	200-202	ผลึกรูปเข็มสีเหลือง
R-2	4-Nitro	$C_{10}H_6N_2O_3S_2$	270-272	ผลึกเป็นแผ่นสีเหลือง
R-3	2,6-Dichloro	$C_{10}H_5Cl_2NOS_2$	184-186	ผลึกรูปเข็มสีเหลือง
R-4	2-Chloro	$C_{10}H_6Cl\ NOS_2$	191-192	ผลึกรูปเข็มสีเหลือง
R-5	4-Chloro	$C_{10}H_6Cl\ NOS_2$	230-232	ผลึกรูปเข็มสีเหลือง
R-6	4-N-Dimethylamino	$C_{12}H_{12}N_2OS_2$	264-268	ผลึกเป็นผงสีส้ม
R-7	3,4-Methylenedioxy	$C_{11}H_7NO_3S_2$	293-295	ผลึกเป็นผงสีเหลือง

3. การหาวิธีที่เหมาะสมเพื่อใช้ทดสอบสารสังเคราะห์ทั้ง 7 ชนิด

ผู้วิจัยได้ทดลองใช้วิธีที่นิยมใช้กันทั่วไป 3 วิธี คือ

วิธีที่ 1 Tube dilution method

วิธีที่ 2 Agar plate dilution method

วิธีที่ 3 Paper disc diffusion method

4. การเตรียมแผ่นกระดาษบรรจุสารสำหรับทดสอบ

นำกระดาษซับที่ได้ตัดเป็นรูปกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วทำให้แห้งโดยใส่ตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อแห้งแล้วนำกระดาษรูปกลมดังกล่าวใส่หลอดทดลองฝาเกลียว แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Cruickshank, 1960) แล้วจึงบรรจุสารสังเคราะห์ ซึ่งมีอะซีโตนเป็นตัวทำละลาย และยาปฏิชีวนะโดยใช้ปิเปตที่ทำให้ปราศ-

จากเชื้อแล้วขนาด 0.1มิลลิลิตร ดูดสารแล้วหยดลงบนแผ่นกระดาษรูปกลมและให้รู้ปริมาณที่แน่นอนของสารสังเคราะห์ ในกระดาษแต่ละแผ่น ในการทดลองนี้ได้เตรียมแผ่นกระดาษกรองที่บรรจุอะซีโตนเพียงอย่างเดียวด้วยเพื่อใช้ทดสอบผลของอาซีโตนที่มีต่อบัก-เตรี (control disc) แล้วปล่อยให้แผ่นกระดาษบรรจุสารแห้งเสียก่อนจึงเก็บไว้ในหลอดทดลองฝาเกลียว (WHO, 1961; Hunter, et al., 1969)

สำหรับแผ่นกระดาษบรรจุสารสังเคราะห์และแผ่นบรรจุอะซีโตนเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนแผ่นบรรจุยาปฏิชีวนะเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมเชื้อเพื่อจะนำมาเพาะ (inoculate) ลงในจานเลี้ยงเชื้อ(petridish)

ถ่ายเชื้อจาก TSA slant 1 บ่วง (loop) ลงในขวดแก้ว (flask) ซึ่งบรรจุtryptic soy broth (TSB) 25 มิลลิลิตร ที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว แล้วบ่มเชื้อ (incubate) ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง(Lennette, et al., 1974; Ruddell, et al., 1975)แล้วนำไปเข้าเครื่องปั่นเพื่อแยกเซลล์และล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ 2 ครั้ง แล้วจึงปรับให้เซลล์ที่แขวนลอยในน้ำเกลือมีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc. Farland barium sulfate หมายเลข 2 (Bailey, et al., 1966; Washington, et al., 1972) เชื้อที่เตรียมไว้แล้วนี้ต้องนำไปใช้ทันที หรืออย่างช้าไม่เกิน 20 นาที หลังจากเตรียมเรียบร้อยแล้ว (Lennette, et al., 1974)

6. การเตรียมจานเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการทดลอง

เท TSA ที่หลอมเหลวแล้วและปราศจากเชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อให้ได้ความลึกของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 4 มิลลิเมตร (Lennette, et al., 1974) แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว ตั้งทิ้งค้างคืนไว้เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีเชื้ออื่นปะปน (Bailey, et al.. 1966) แล้วจึงนำมาใช้ ส่วนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารบรรจุอยู่ที่เหลือเก็บเข้าตู้เย็นไว้ใช้ได้ภายใน 4 วัน และก่อนจะนำมาใช้ต้องเอามาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที ก่อนเพื่อให้ผิวหน้าของอาหารแห้ง แล้วจึงนำไปใช้ได้ (Baner, et al., 1966)

7. การทดสอบประสิทธิภาพในการต่อต้านบักเตรีของสารสังเคราะห์

การทดลองนี้ใช้สารสังเคราะห์และบักเตรีทั้งหมดที่ได้รายงานไว้ในหน้า 10-11

7.1 เพาะ (inoculate) บักเตรีที่ได้ปรับความขุ่นให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc. Farland barium sulfate หมายเลข 2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงใน TSA ที่บรรจุในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งแก้วสำหรับเกลี่ยเชื้อ (triangular glass spreader) ปล่อยให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งประมาณ 15 นาที อย่าให้นานกว่านี้ (Cruick shank, 1960; WHO, 1961; Lennette, et al., 1974; Liberman,et al., 1975)

7.2 ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อหยิบกระดาษที่บรรจุสารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน และแผ่นกระดาษบรรจุอะซีโตน วางลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทำ ซ้ำกัน 3 ครั้ง แล้วทุก ๆ จานเลี้ยงเชื้อมีแผ่นกระดาษบรรจุอะซีโตนเพื่อควบคุมการวัดผล กดแผ่นกระดาษที่บรรจุสารให้สัมผัสกับผิวอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วทั้งแผ่น (Bailey, et al., 1966; Bauer, et al., 1966;Lennette, et al., 1974) โดยวางให้ห่างกันพอควรเพื่อไม่ให้บริเวณที่เชื้อถูกระงับการเจริญ (inhibition zone) ซ้อนกัน (Cruickshank, 1960; WHO, 1961; Lennette, et al., 1974) และต้องวางแผ่นบรรจุสารห่างจากขอบจานอย่างน้อย 10 มิลลิลิตร (Washington, 1972) แล้วตั้งจานบรรจุเชื้อและแผ่นบรรจุสารไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 ชั่วโมงก่อนบ่มเชื้อเพื่อให้สารในแผ่นกระดาษแพร่กระจายไปรอบ ๆ โดยที่เชื้อยังไม่เจริญ (Ericsson, 1960; WHO, 1961; Bailey, et al., 1966)

7.3 นำจานที่บรรจุเชื้อและแผ่นกระดาษบรรจุสารที่ได้ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง แล้วไปบ่มเชื้อโดยวางหงายไว้ในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก่อนนำมาตรวจผล

7.4 นำจานที่เข้าบ่มเชื้อครบ 18 ชั่วโมงออกมาตรวจผลโดยการหาความ

เข้มข้นต่ำสุดของสารแต่ละอนุพันธ์ที่สามารถระงับการเจริญของเชื้อบักเตรีแต่ละชนิดที่ยังทำให้เห็นบริเวณที่ไม่มีเชื้อบักเตรีเจริญรอบ ๆ แผ่นกระดาษบรรจุสารโดยดูเปรียบเทียบกับแผ่นกระดาษที่บรรจุอะซีโตนอย่างเดียว แล้วบันทึกผลไว้เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถระงับการเจริญของบักเตรีได้ [minimum inhibitory concentration (MIC)] ในที่นี้มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อแผ่น

8. การทดสอบเปรียบเทียบคุณสมบัติในการต่อต้านบักเตรีระหว่างสารสังเคราะห์กับยาปฏิชีวนะ

การทดลองนี้เลือกใช้เฉพาะสารสังเคราะห์ที่ได้ทดสอบแล้วว่าสามารถระงับการเจริญเติบโตของบักเตรีได้ ส่วนยาปฏิชีวนะใช้ทุกชนิดดังกล่าวข้างต้น

วิธีการทดสอบเหมือนหัวข้อ 7 แต่แผ่นบรรจุสารสังเคราะห์และแผ่นบรรจุยาปฏิชีวนะนั้นใช้แผ่นที่มีสารและยาปฏิชีวนะบรรจุอยู่ 20 ไมโครกรัมต่อแผ่นเท่า ๆ กัน เพื่อจะได้เปรียบเทียบกันได้ ส่วนการบันทึกผลนั้นทำโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีบักเตรีเจริญรอบ ๆ แผ่นบรรจุสารโดยใช้ไม้บรรทัด แล้วบันทึกผลเป็นมิลลิเมตร (Cruickshank, 1960 ; Bailey, et al., 1966; Ruddell, et al., 1975)

9. การตรวจดูแบบของการต่อต้านบักเตรีของสารสังเคราะห์

การทดลองนี้ได้เลือกใช้เฉพาะสารสังเคราะห์ที่ได้ทดสอบแล้วว่า สามารถระงับการเจริญของบักเตรีได้เท่านั้น

วิธีการทดสอบเหมือนข้อ 7 แต่แผ่นบรรจุสารสังเคราะห์ใช้เฉพาะแผ่นที่มีความเข้มข้นของสาร 60 ไมโครกรัมต่อแผ่นเท่านั้น เมื่อบ่มเชื้อครบ 18 ชั่วโมง แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle) ตัดชิ้นอาหารในบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโตขนาด 3 X 3 มิลลิเมตร มาใส่ในน้ำกลั่นที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองเขย่าให้เซลล์บักเตรี (ซึ่งอาจตายหรือยังมีชีวิตอยู่) ที่ติดอยู่บน

ชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อให้มาแขวนลอยอยู่ในน้ำกลั่น แล้วจึงดูดน้ำกลั่นดังกล่าวปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่บรรจุอยู่ในจาน ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหารแล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจดูว่ามีเชื้อเจริญหรือไม่

ถ้ามีบักเตรีเจริญหลังจากบ่มเชื้อแล้ว แสดงว่าฤทธิ์ต่อต้านบักเตรีของสารสังเคราะห์ชนิดนั้นเป็นแบบระงับการเจริญชั่วคราว (bacteriostatic)

ถ้าไม่มีบักเตรีเจริญหลังจากบ่มเชื้อแล้ว แสดงว่าฤทธิ์ต่อต้านบักเตรีของสารสังเคราะห์ชนิดนั้นต่อบักเตรีนั้น ๆ เป็นแบบฆ่าบักเตรี (bactericidal)

10. การหาความเป็นพิษ (toxicity) ของสารสังเคราะห์

10.1 สารสังเคราะห์ที่ใช้

เลือกใช้สารสังเคราะห์ที่ให้ผลในการระงับการเจริญของบักเตรีดีที่สุด 2 อนุพันธ์ ที่มีความแตกต่างกันในแง่สูตรโครงสร้าง คือ

สารสังเคราะห์ชนิดที่ 2 หรือ R-2 ได้แก่ 5-(4-nitrobenzylidene) rhodanine

สารสังเคราะห์ชนิดที่ 3 หรือ R-3 ได้แก่ 5-(2,6-dichlorobenzylidene) rhodanine

10.2 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (Swiss mice) น้ำหนัก 28-32 กรัม ไม่จำกัดเพศ เลี้ยงด้วยอาหารหนู (mouse pellets) ของบริษัท เอฟ อี ซิลลิก (กรุงเทพฯ) จำกัดตลอดการทดลอง

10.3 วิธีทดลอง

นำสารสังเคราะห์ทั้งสองชนิดมาทำให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 5 ระดับ โดยทำให้เจือจางลง 2 เท่า (2-fold dilution) ในน้ำมันมะกอกที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว นำสารสังเคราะห์แต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันไป ฉีดเข้าในหนู

ขาว โดยแต่ละความเข้มข้นจะฉีดหนู 5 ตัว และฉีดตัวละ 0.1 มิลลิลิตร เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal) แล้วดูจำนวนหนูที่ตายและอยู่รอดภายใน 7 วัน นำผลที่ได้ไปคำนวณหา L D_{50} (ปริมาณสารพิษที่ทำให้หนูตาย 50 เปอร์เซนต์) โดยใช้วิธีของ Reed & Muench (1938)

11. การทดสอบประสิทธิภาพในการรักษาโรคในหนูของสารสังเคราะห์

11.1 บักเตรี

เลือกใช้ S. aureus เป็นบักเตรีที่จะฉีดเข้าสัตว์ทดลองเพื่อให้มีอาการ เนื่องจากบักเตรีนี้แล้วจึงฉีดสารเข้าไปเพื่อรักษา เหตุผลที่เลือกเชื้อนี้เพราะเป็นเชื้อที่สารสังเคราะห์สามารถระงับการเจริญเติบโตได้ในหลอดทดลอง (in vitro) และได้มีการยืนยันว่า S. aureus เป็นบักเตรีที่สามารถทำให้หนูขาว (Swiss mice) มีอาการเป็นหนองขึ้นได้ (Cruickshank, 1968)

11.2 สัตว์ทดลอง

เลือกใช้หนูขาว (Swiss mice) เพราะเป็นสัตว์ทดลองที่เชื้อ S. aureus สามารถทำให้เกิดโรคได้ (Cruickshank, 1968) โดยใช้น้ำหนัก 28 - 32 กรัม ไม่จำกัดเพศ เลี้ยงด้วยอาหารหนู (mouse pellets) ของบริษัทเอฟ อี ซิลลิก (กรุงเทพฯ) จำกัด ตลอดการทดลอง

11.3 สารสังเคราะห์

เลือกใช้ 5-(4-nitrobenzylidene) rhodanine และ 5 - (2,6 - dichlorobenzylidene) rhodanine เพราะเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการระงับการเจริญของ S. aureus ได้ดีกว่าอนุพันธ์อื่น ๆ

11.4 วิธีการทดลอง

11.4.1 การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ฉีดสัตว์ทดลอง

นำเชื้อ S. aureus ที่ใช้ในการทดลองในหลอดแก้วมาแล้วมาทำให้เป็นเซลล์ที่แขวนลอย (suspension) ในน้ำเกลือที่เข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์

ด้วยวิธีการที่เคยทำมาแล้วข้างต้น แล้วปรับความขุ่นของเซลล์ให้ได้ประมาณ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ฉีดเข้าหนูขาวน้ำหนัก 28- 32 กรัม โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) ที่ขาข้างใดข้างหนึ่งด้วยปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เลี้ยงสัตว์ทดลองไว้จนกระทั่งตรงบริเวณที่ฉีดพองขึ้นมา และเป็นหนองซึ่งกินเวลาประมาณ10 วัน จึงเอาหนองจากรอยบวมนั้นมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ก่อนว่าเป็นเชื้อบริสุทธิ์ชนิดที่ฉีดเข้าไปหรือไม่ ถ้าใช่จึงนำมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลว BHI (brain heart infusion broth; Difco) แล้วปรับความขุ่นของเซลล์ให้ได้ประมาณ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงนำเชื้อไปฉีดเข้าสัตว์ทดลองในทันทีที่ได้ปรับเซลล์ได้ตามต้องการ การที่ต้องฉีดเชื้อผ่านเข้าสัตว์ทดลองก่อนแล้วจึงนำเชื้อมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการทดลอง เพราะได้มีการยืนยันว่า เชื้อ S. aureus ที่ได้จากหนองของสัตว์จะมีความรุนแรง (virulency)สูงกว่าเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เตรียมขึ้น (Davis, 1970) และผู้วิจัยก็ได้ทดลองฉีดเชื้อ S. aureus ที่เลี้ยงใน TSB เข้าสัตว์ทดลอง ปรากฏว่าเปอร์เซนต์การเป็นหนองของสัตว์ทดลองนั้นน้อยมากเมื่อเทียบกับใช้เชื้อที่ได้มาโดยการฉีดผ่านเข้าสัตว์ทดลองมาขั้นหนึ่งแล้ว ดังนั้นการทดลองที่จะรายงานต่อไปจะใช้เชื้อ S. aureus ที่ได้ผ่านการฉีดเข้าสัตว์ทดลองมาขั้นหนึ่งแล้วก่อนที่จะนำไปเพาะในหลอดแก้ว เพื่อเพิ่มจำนวนให้เพียงพอในการใช้ฉีดสัตว์ทดลองเพื่อทำให้เกิดโรค

11.4.2 การทำให้หนูขาวเป็นหนอง

ฉีดเชื้อ S. aureus ที่ได้เตรียมไว้แล้วตามวิธีในหัวข้อ 11.4.1 เข้าหนูจำนวนมาก โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังที่บริเวณขาข้างใดข้างหนึ่งในปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เลี้ยงสัตว์ทดลองต่อไปจนเกิดหนองที่บริเวณที่ฉีดโดยที่จะเห็นผิวหนังบวมขึ้นมาอย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งใช้เวลาประมาณ 10 วัน แล้วจึงแบ่งสัตว์ทดลองออกเป็นกลุ่ม ๆ กลุ่มละ 5 ตัว โดยให้มีอาการบวมเป็นหนองของแต่ละกลุ่มใกล้เคียงกันที่สุด ดังแสดงในแผนผังที่ 2

11.4.3 การฉีด 5-(4- nitrobenzylidene) rhodanine และ 5-(2,6-dichlorobenzylidene) rhodanine เข้าสัตว์ทดลองที่เป็นหนองแล้วเพื่อใช้รักษา

สารสังเคราะห์ที่ใช้ฉีดเข้าสัตว์ทดลองต่อไปนี้ชั่งด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด แล้วผสมกับน้ำมันมะกอกที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้วให้เข้ากันดีจึงใช้ฉีด โดยฉีดในปริมาณ (dose)ที่สูงที่สุดที่ไม่ทำให้สัตว์ทดลองตายในปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โดยดูจากผลการทดลองหาความเป็นพิษของสารทั้งสองอนุพันธ์ในที่นี้ปริมาณ (dose) ที่ใช้ฉีด คือ

สารชนิดที่ 2 หรือ R-2 ได้แก่ 5-(4-nitrobenzylidene) rhodanine ฉีด 7.5 มิลลิกรัม ต่อ หนูขาว 1 ตัว ซึ่งหนัก 28-32 กรัม

สารชนิดที่ 3 หรือ R-3 ได้แก่ 5-(2,6 dichlorobenzylidene) rhodanine ฉีด 0.75 มิลลิกรัม ต่อหนูขาว 1 ตัว ซึ่งหนัก 28-32 กรัม

แบ่งการฉีดสารสังเคราะห์เข้าสัตว์ทดลองเป็น 2 ทาง และแต่ละทางทำซ้ำ 2 ครั้ง

11.4.3.1 ฉีดสารสังเคราะห์เข้ากล้ามเนื้อบริเวณขา

แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็นกลุ่ม ๆ ดังนี้ คือ

กลุ่มที่ 1 หนูขาว 5 ตัว ฉีด 5-(4-nitrobenzylidene) rhodanine 1 ครั้งตลอดการทดลอง

กลุ่มที่ 2 หนูขาว 5 ตัว ฉีด 5-(2,6 dichloroben-zylidene) rhodanine 1 ครั้งตลอดการทดลอง

กลุ่มที่ 3 หนูขาว 5 ตัว ฉีด 5-(4-nitrobenzylidene) rhodanine ทุก ๆ 2 วัน ตลอดการทดลอง

กลุ่มที่ 4 หนูขาว 5 ตัว ฉีด 5-(2,6 dichloroben-zylidene) rhodanine ทุก ๆ 2 วันตลอดการทดลอง

กลุ่มที่ 5 หนูขาว 5 ตัว ฉีด 5-(4-nitrobenzylidene) rhodanine ทุก ๆ 4 วัน ตลอดการทดลอง

กลุ่มที่ 6 หนูขาว 5 ตัว ฉีด 5-(2,6 dichlorobenzylidene) rhodanine ทุก ๆ 4 วันตลอดการทดลอง

กลุ่มที่ 7 หนูขาว 9 ตัว ฉีดน้ำมันมะกอก 0.1 มิลลิลิตร 1 ครั้ง ตลอดการทดลอง, ทุก ๆ 2 วันตลอดการทดลอง และทุก ๆ 4 วันตลอดการทดลอง อย่างละ 3 ตัว

เลี้ยงสัตว์ทดลองเหล่านี้ต่อไป ดูผลการหายจากอาการเป็นหนอง โดยเทียบกับกลุ่มที่ 7 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ควบคุมการวัดผล ดังแสดงในแผนผังที่ 2

เมื่อได้ทำการทดลองฉีดสารสังเคราะห์เข้าสัตว์ทดลองทางกล้ามเนื้อเพื่อรักษาโดยใช้ความถี่ของการฉีดต่าง ๆ กันแล้ว ปรากฏว่าสารสังเคราะห์ไม่มีผลในการรักษาอาการหนองเลย กล่าวคือ สัตว์ทดลองทุกกลุ่มหายจากการเป็นหนองในระยะเวลาไล่เลี่ยกับกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดสารสังเคราะห์

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทดลองอีกวิธีหนึ่งซึ่งคิดว่าน่าจะเป็นวิธีที่ดีที่สุดที่จะใช้สารสังเคราะห์เหล่านี้รักษาสัตว์ทดลองที่เป็นหนอง คือวิธีที่ให้สารสังเคราะห์เข้าไปในบริเวณที่เป็นหนองโดยตรง ดังการทดลองในหัวข้อต่อไปนี้

11.4.3.2 ฉีดสารสังเคราะห์เข้าบริเวณที่เป็นหนองโดยตรง

แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็นกลุ่ม ๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนูขาว 5 ตัว ฉีด 5-(4-nitrobenzylidene) rhodanine 1 ครั้ง ตลอดการทดลอง

กลุ่มที่ 2 หนูขาว 5 ตัว ฉีด 5-(2,6 dichlorobenzylidene) rhodanine 1 ครั้งตลอดการทดลอง

กลุ่มที่ 3 หนูขาว 5 ตัว ฉีด 5-(4- nitrobenzylidene)rhodanine ทุก ๆ 2 วัน ตลอดการทดลอง

กลุ่มที่ 4 หนูขาว 5 ตัว ฉีด 5-(2,6 dichlorobenzylidene) rhodanine ทุก ๆ 2 วัน ตลอดการทดลอง

กลุ่มที่ 5 หนูขาว 5 ตัว ฉีด 5-(4- nitrobenzylidene)rhodanine ทุก ๆ 4 วัน ตลอดการทดลอง

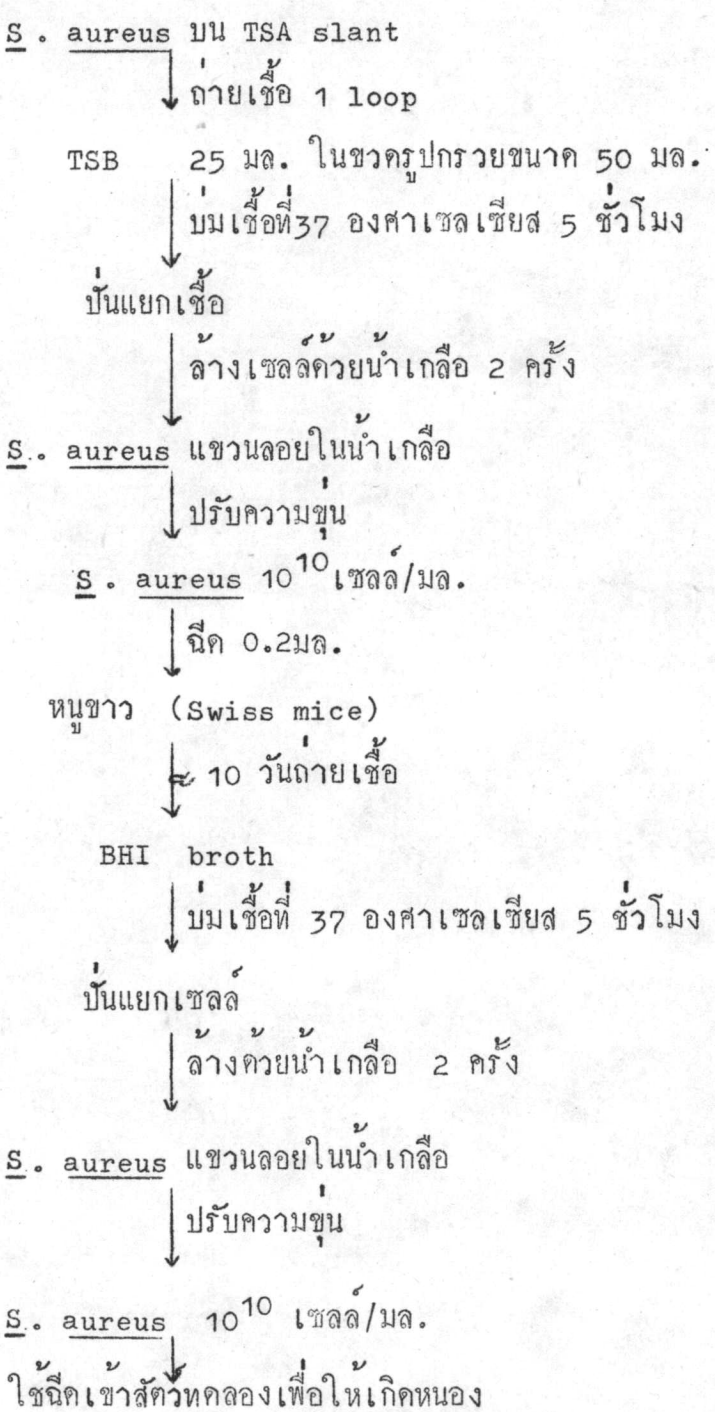
กลุ่มที่ 6 หนูขาว 5 ตัว ฉีด 5-(2,6 dichlorobenzylidene) rhodanine ทุก ๆ 4 วัน ตลอดการทดลอง

กลุ่มที่ 7 หนูขาว 9 ตัว ฉีดน้ำมันมะกอก 0.1 มิลลิลิตร 1ครั้ง ตลอดการทดลอง, ทุก ๆ 2 วันตลอดการทดลอง และทุก ๆ 4 วันตลอดการทดลอง อย่างละ 3 ตัว

เลี้ยงสัตว์ทดลองเหล่านี้ต่อไป ดูผลการหายจากอาการเป็นหนองโดยเทียบกับกลุ่มที่ 7 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ควบคุมการวัดผล ดังแสดงในแผนผังที่ 2

แผนผังที่ 1

แสดงการเตรียมเชื้อ S. aureus เพื่อใช้ฉีดเข้าหนูขาว (Swiss mice) ให้เกิดอาการเป็นหนอง



แผนผังที่ 2

แสดงขั้นตอนของการฉีดเชื้อ S. aureus เพื่อให้เกิดหนองและการฉีดR-2,R-3 เข้าหนูขาว(Swiss mice) ทางใต้ผิวหนังเพื่อรักษา