บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

สารที่ใช้ในการทดลอง

1. แอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์ (Adsorbed Tetanus Toxoid) ขององค์การเภสัชกรรม
2. เลซิทินบริสุทธ์จากไข่แดง (Purified Egg Yolk Lecithin)
3. คารบอกซีเมทิลไคติน (Carboxy Methyl Chitin)
4. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)
5. เซลลูโลส อะซีเตท ทาเลท (Cellulose Acetate Phthalate)
6. อะซีโตน (Acetone)
7. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium Sulfate)
8. แป้งข้าวโพด (Corn Starch)
9. สแปน 80 (Span 80)
10. น้ำมันแร่ (Liquid Paraffin)
11. ไฮดรอกซี โปรปิล เมทิล เซลลูโลส (Hydroxy Propyl Methyl Cellulose)
12. เมทิลีน คลอไรด์ (Methylene Chloride)
13. เอทิลีน ไกลคอล (Ethylene Glycol)
14. เอทิล เซลูโลส (Ethyl Cellulose)
15. เอทิล อะซิเตท (Ethyl Acetate)
16. คลอโรฟอร์ม (Chloroform)
17. โปตัสเซียม ฟอสเฟต โมโนเบสิค (Potassium Phosphate, Monobasic-KH_2PO_4)
18. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide)
19. โซเดียม คลอไรด์ (Sodium Chloride)
20. เตตานัส ท็อกซิน (Tetanus Toxin)

หมายเหตุ ตัวทำละลายทุกตัวใช้ AR Grade ของบริษัท E. Merk

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ Hetofrig ของบริษัท Heto
2. เครื่องคนซึ่งสามารถปรับความเร็วได้ Frauz MORAT KG. Typ. R 30
3. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ
4. เครื่องชั่งอย่างละเอียด Single pan ของ August Sauter KG. D-7470
5. เครื่องวัด pH ของบริษัท El-Hama Instrument Model PBS 730
6. กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา ของบริษัท Olympus
7. เครื่องเซนตริฟิวจ์แบบควบคุมอุณหภูมิได้ (Beckman J2-21)
8. เครื่องเขย่า (Vortex Mixer) ของบริษัท Scientific Industries Inc. model K-550-GE

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาเทคนิคต่างๆ ในการเตรียม เตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลในห้องปฏิบัติการเพื่อหาเทคนิคที่เหมาะสม โดยศึกษาจากเทคนิค

1.1 Coacervation Techniques

1.2 Interfacial Polymerization Techniques.

2. พัฒนาวิธีที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 เพื่อหาวิธีเตรียมที่ดีที่สุดเพื่อให้ได้เตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลที่เหมาะสมที่จะนำไปทำเป็นยาฉีด

3. ทดสอบคุณภาพของไมโครแคปซูลที่เตรียมจากขั้นตอนที่ 2 เพื่อให้ได้เตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล ที่เหมาะสมที่จะนำไปทำเป็นยาฉีด

4. วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลโดยใช้วิธีทางสถิติ

1. การศึกษาเทคนิคต่าง ในการเตรียมเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลในห้องปฏิบัติการ

1.1 เทคนิคการเกิดโคอาเซอร์เวชั่นหรือ การทำให้เกิดการแยกตัวของวัฏภาคเป็น 2 วัฏภาค (Coacervation Techniques or Phase Seperation Techniques) (50)

1.1.1 การเติมเกลือที่ละลายได้ดีในน้ำ (Phase Seperation by dispersion in aqueous solution of inorganic salt) เตรียมเตตานัส

ท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล โดย ใช้ เซลลูโลสอะซิเตท ทาเลท เป็นเปลือกหุ้มไมโครแคปซูล และใช้อะซีโตน เป็นตัวทำละลายเซลลูโลสอะซิเตททาเลท เติมสารละลายของแอมโมเนียมซัลเฟตทำให้เกิดการแยกชั้นของวัฏภาค

วิธีทำ นำเตตานัสท็อกซอยด์จำนวน 5 มล. มาทำให้กระจายตัว ในสารละลายของเซลลูโลส อะซีเตท ทาเลท ซึ่งละลายในอะซีโตน ในความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักจำนวน 20 กรัม เติมสารละลายแอมโมเนียม ซัลเฟต ความเข้มข้น 35 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 160 กรัม คนด้วยความเร็ว 400 รอบต่อนาที นาน 6 ชั่วโมง สังเกตการเกิดไมโครแคปซูล ถ้าไม่เกิดไมโครแคปซูลให้เปลี่ยนอัตราเร็วในการคนเป็น 1000 รอบต่อนาที และ 2000 รอบต่อนาที ตามลำดับหรือใช้อัตราเร็วในการปั่น 400 รอบต่อนาที ใช้เซลลูโลอะซีเตททาเลท 10 % โดยน้ำหนักตามเดิม แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เป็น 5 เปอร์เซ็นต์หรือคงอัตราในการคนเป็น 400 รอบต่อนาที และความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 35 เปอร์เซ็นต์เท่าเดิม แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของเซลลูโลส อะซีเตท ทาเลท เป็น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

1.1.2 การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า Dielectric Constant 15-34 เตรียมเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล โดยใช้ เซลลูโลสอะซิเตท ทาเลท เป็นผนังหุ้มไมโครแคปซูล ใช้อะซีโตน ซึ่งมีค่า dielectric constant 21 เป็น ตัวทำละลายของเซลลูโลสอะซิเตททาเลท ใช้ น้ำมันแร่ และสแปน 80 ทำให้เกิดการแยกชั้นของวัฏภาค

วิธีทำ ผสมเตตานัสท็อกซอยด์ 1 มล. กับแป้งข้าวโพด (corn starch) 1 กรัม ในสารละลายของเซลลูโลสอะซิเตททาเลท ในอะซีโตน 23 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักเทลงในส่วนผสมของแป้งข้าวโพด (corn starch) ซึ่งกระจายตัวอยู่ในน้ำมันแร่ และสแปน 80 ที่มี แป้งข้าวโพด 2.5 กรัม, สแปน 80 2.5 มล. และน้ำมันแร่ 250 มล. คนด้วยอัราเร็ว 400 รอบต่อนาทีนาน 6 ชั่วโมง สังเกตการเกิดไมโครแคปซูล

1.1.3 การเติมตัวทำละลายที่มีค่า Dielectric Constant ต่ำกว่า 10

1.1.3.1 เตรียมเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล โดยใช้ ไฮดร๊อกซีโปรปิล เมทิล เซลลูโลส เป็นเปลือกหุ้มไมโครแคปซูลและใช้ เมทิลีน คลอไรด์ เป็นตัวทำละลายไฮดร๊อกซีโปรปิล เมทิลเซล ลูโลส ใช้เอทิลีน ไกลคอล ทำให้เกิดการแยกชั้นของวัฏภาค

วิธีทำ ผสมเตตานัสท็อกซอยด์ 2 มล. ในสารละลายของไฮดรอกซีโปรปิลเมทิลเซลลูโลสในเมทิลีน คลอไรด์ความเข้มข้น 6.6 เปอร์เซ็นต์ เติมเอทิลีนไกลคอล150 มล. คนด้วยอัตราเร็ว 400 รอบต่อนาทีนาน 6 ชม. สังเกตการเกิดไมโครแคปซูล

1.1.3.2 เตรียมเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลโดยใช้เอทิลเซลลูโลส เป็นเปลือกหุ้มไมโครแคปซูลและใช้สารละลายของเอทิลอะซิเตทในคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) เป็นตัวทำละลาย เอทิลเซลลูโลส ใช้เอทิลีน ไกลคอลทำให้เกิดการแยกชั้นของวัฏภาค

วิธีทำ ผสมเตตานัสท็อกซอยด์ 5 มล. ในสารละลายของเอทิลเซลลูโลส 1 กรัม ในเอทิลอะซีเตท-คลอโรฟอร์ม (1:1) จำนวน 50 มล. เขย่าใน vortex mixer นาน 3 นาที ให้ได้อิมัลชั่น (emulsion) เติมเอทิลีนไกลคอล 150 มล. คนด้วยอัตราเร็ว 1000 รอบต่อนาที นาน 3 ชม. สังเกตการเกิดไมโครแคปซูล

1.2 การเตรียมเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลโดยใช้อินเตอร์เฟเชียลโพลีเมอร์ไรเซชั่นเทคนิค (Interfacial Polymerization Technique) (40,41)

เตรียมเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลโดยใช้ปฏิกิริยาโพลีเมอร์ไรเซชั่น จากเลซิทินบริสุทธิ์และคาร์บอกซีเมทิลไคทิน ทำให้เกิดเป็นเปลือกหุ้มไมโครแคปซูล

วิธีทำ ผสมเตตานัสท็อกซอยด์ 5 มล. ในสารละลายของเลซิทินบริสุทธิ์ที่ได้จากไข่แดง 250 มก. ในไดคลอไรมีเทน 5 มล. เขย่าโดยใช้ vortex mixer นาน 30 วินาทีเพื่อให้เกิด W/O emulsion เติมสารละลาย คาร์บอกซีเมทิลไคทิน ที่ละลายใน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 50 มล. คนด้วยอัตราเร็ว 400 รอบ ต่อนาที นาน 10 นาที จะได้ W/O/W emulsion เติมสารละลายคาร์บอกซีเมทิลไคทิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ลงไปอีก 50 มล. คนต่อจนกระทั่งไดคลอโรมีเทนระเหยไปหมดนำมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) โดยใช้อัตราเร็ว 2000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แยกเอาตะกอนออก และนำสารละลายส่วนบน (supernatant) ไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง โดยใช้อัตราเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที นำตะกอนที่ได้มาทำให้กระจาย ตัวในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4

การศึกษาในข้อ 1.1 และ 1.2 ทุกขั้นตอนจะต้องควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 0-4 องศาและสังเกต การเกิดไมโครแคปซูล โดยการสุ่มตัวอย่างจากสารละลายในแต่ละขั้นตอน ไปส่องกล้องจุลทรรศน์

2. พัฒนาวิธีที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 เพื่อหาวิธีเตรียมที่ดีที่สุดเพื่อให้ได้เตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลที่เหมาะสมจะนำไปทำยาฉีด

2.1 วิธีทำ Ternary Phase Diagram ของเอทิลเซลลูโลส, เอทิลอะซีเตท-คลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) และเอทิลีนไกลคอล

ละลายเอทิลเซลลูโลสในสารละลายเอทิลอะซีเตท ในคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) และเอทิลีนไกลคอล ในอัตราส่วนต่างๆโดยน้ำหนัก 79 อัตราส่วน ตามตารางที่ 5 บรรจุในหลอดยาฉีดแบบแอมพูล (Ampoul) ขนาด 5 มล. โดยให้น้ำหนักรวมของสารทั้ง 3 ชนิดเป็น 2.5 กรัม ทุก ๆ หลอด ปิดหลอดแอมพูลให้สนิท นำไปเขย่าเป็นเวลา 60 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชม. สังเกตการแยกชั้นของสารละลายในหลอดแอมพูลด้วยตาเปล่า และบันทึกลงใน Phase Diagram จากนั้นนำหลอดแอมพูลทั้ง 79 หลอด เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชม. สังเกตการแยกชั้นของสารละลาย และบันทึกใน Phase Diagram เพื่อเปรียบเทียบการละลายของสารทั้ง 3 ชนิด ระหว่างที่อุณหภูมิ 4° และ อุณหภูมิห้อง

นำอัตราส่วนที่ให้ผลการละลายของสารทั้ง 3 ชนิดเป็น 2 วัฏภาคคือ Liquid-Gel มาเตรียมเตตานัสท็อกซอยด์ ดังนี้

2.1.1 เตรียมเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลโดยใช้อัตราส่วนของเอทิลเซลลูโลส, เอทิลอะซีเตท-คลอโรฟอร์ม, เอทิลีนไกลคอลที่จุด A จากรูปที่ 7 คือ 5:75:20 ตามลำดับ เติมเอทิลีนไกลคอล ลงไปอีก จนได้อัตราส่วนของสารทั้ง 3 ชนิด ตามอัตราส่วนที่จุด B คือ 2.5:37.5:60 ตามลำดับ โดย ผสมเตตานัสท็อกซอยด์ 5 มล. ในสารละลายของเอทิลเซลลูโลส 5 กรัม ในเอทิลอะซีเตท-คลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) จำนวน 75 กรัม เขย่าโดยใช้ vortex mixer นาน 3 นาที ให้ได้อิมัลชั่น (emulsion) เติมเอทิลีนไกลคอล 20 กรัม คนด้วยอัตราเร็ว 400 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เติมเอทิลีนไกลคอลอีก 120 กรัม คนด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม สังเกตการเกิดไมโครแคปซูลว่าต้องใช้เวลาคนนานเท่าใด จึงจะได้ไมโครแคปซูลที่มีผนังแคปซูลแข็งแรงพอที่จะเก็บไว้ได้โดยที่ไมโครแคปซูลไม่รวมกันเป็นขนาดใหญ่

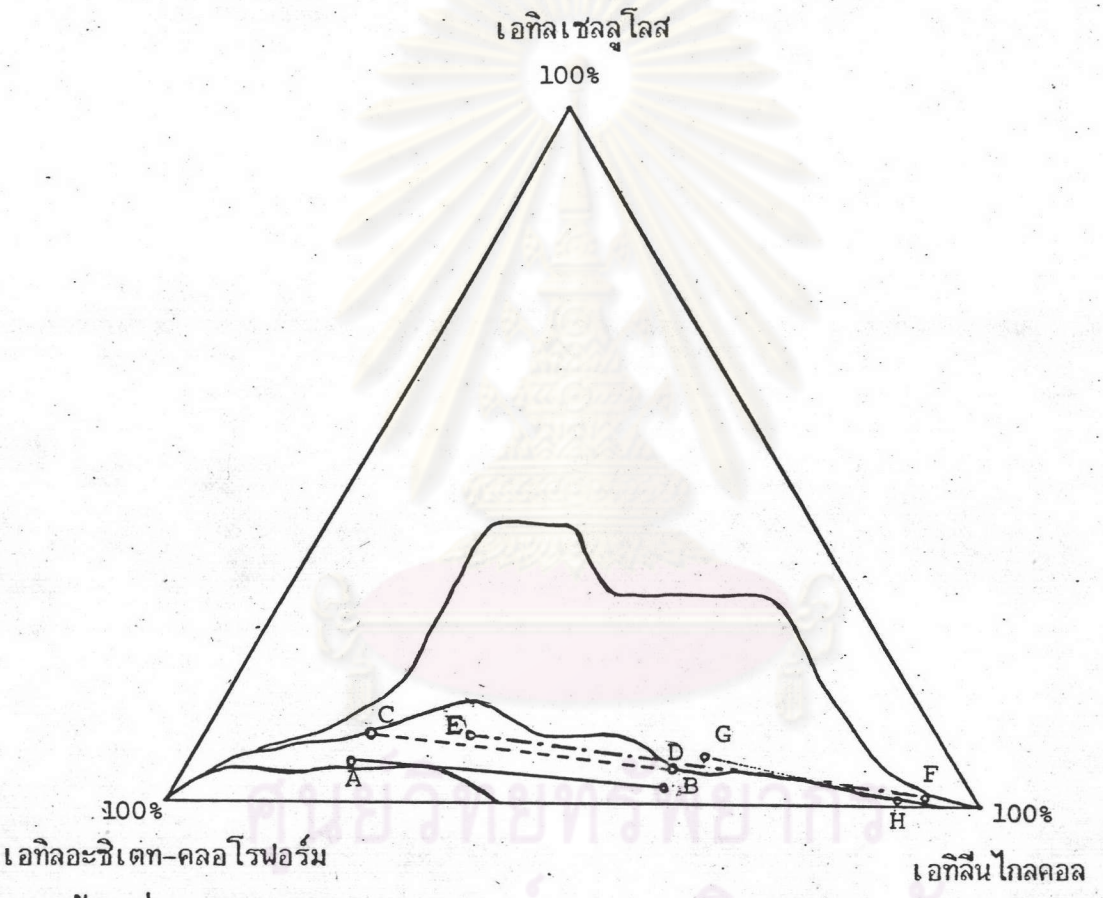
2.1.2 เตรียมเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล โดยใช้อัตราส่วนของเอทิลเซลลูโลส เอทิลอะซีเตท-คลอโรฟอร์ม, เอทิลีนไกลคอล ที่จุด C ในรูปที่ 7 คือ 10:70:20 ตามลำดับ เติมเอทิลีนไกลคอลลงไปอีกจนได้อัตราส่วนของสารทั้ง 3 ชนิด ตามอัตราส่วนที่จุด D คือ 5:35:60 ตามลำดับ โดย ผสมเตตานัสท็อกซอยด์ 5 มล. ในสารละลายของเอทิล เซลลูโลส 5 กรัม ในเอทิลอะซีเตท-คลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) จำนวน 35 กรัม เขย่าโดยใช้vortex mixer นาน 3 นาที ให้ได้อิมัลชั่น

(emulsion) เติมเอทิลีนไกลคอล 10 กรัม คนด้วยอัตราเร็ว 400 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เติมเอทิลีนไกลคอล อีก 50 กรัม คนด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม สังเกตการเกิดไมโครแคปซูลว่าต้องใช้เวลาคนนานเท่าใดจึงจะได้ไมโครแคปซูลที่มีผนังแคปซูล แข็งแรง พอที่จะเก็บไว้ได้โดยไมโครแคปซูลไม่รวมกันเป็นขนาดใหญ่

2.1.3 เตรียมเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล โดยใช้อัตราส่วนของเอทิลเซลลูโลส, เอทิลอะซีเตท-คลอโรฟอร์ม, เอทิลีนไกลคอล ที่จุด E ในรูปที่ 7 10:30:63 ตามลำดับ เติมเอทิลีนไกลคอล ลงไปอีกจนได้อัตราส่วนของสารทั้ง 3 ชนิดตาม อัตราส่วนที่จุด F คือ 1:6:93 ตามลำดับ โดยผสมเตตานัสท็อกซอยด์ 5 มล. ในสารละลายของเอทิลเซลลูโลส 5 กรัม ในเอทิลอาซีเตท-คลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) จำนวน 30 กรัม เขย่าโดยใช้ vortex mixer นาน 3 นาที ให้ได้อิมัลชั่น (emulsion) เติมเอทิลีนไกลคอล 15 กรัม คนด้วยอัตราเร็ว 400 รอบต่อนาที นาน 15 นาทีเติมเอทิลีนไกลคอลอีก 50 กรัม คนด้วยอัตราเร็วเท่าเดิมสังเกตการเกิดไมโครแคปซูลว่าต้องใช้เวลาคนนานเท่าใด จึงจะได้ไมโครแคปซูล ที่มีผนังแคปซูลแข็งแรงพอที่จะเก็บไว้ได้โดยไมโครแคปซูล ไม่รวมกันเป็นขนาดใหญ่

2.1.4 เตรียมเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล โดยใช้อัตราส่วนของเอทิลเซลลูโลส, เอทิลอะซีเตท-คลอโรฟอร์ม, เอทิลีไกลคอล ที่จุด G ในรูปที่ 7 คือ 7:30:63 ตามลำดับ เติมเอทิลีนไกลคอลลงไปอีกจนได้อัตราส่วนของสารทั้ง 3 ชนิดตามอัตราส่วนที่จุด H คือ 1:9:90 ตามลำดับ โดยผสมเตตานัสท็อกซอยด์ 5 มล. ในสารละลายของ เอทิลเซลลูโลส 5 กรัม ในเอทิลอะซีเตท-คลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) จำนวน 45 กรัม เขย่าโดยใช้ vortex mixer นาน 3 นาที ให้ได้อิมัลชั่น (emulsion) เติม เอทิลีนไกลคอล 21.4 กรัม คนด้วยอัตราเร็ว 400 รอบต่อนาทีนาน 15 นาที เติมเอทิลีนไกลคอลอีก 428.6 กรัม คนด้วยอัตราเร็วเท่าเดิม สังเกตการเกิดไมโครแคปซูลว่าต้องใช้เวลานานเท่าใด จึงจะได้ไมโครแคปซูลที่มีผนังแคปซูลแข็งแรงพอที่จะเก็บไว้ได้โดยไมโครแคปซูล ไม่รวมกันเป็นขนาดใหญ่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 แสดง Ternary Phase Diagram ของเอทิลเซลลูโลส, เอทิลอะซิเตท -คลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) และ เอทิลีนไกลคอล ที่อุณหภูมิ 4 °องศาเซลเซียส และจุดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล

ตารางที่ 5 อัตราส่วนต่าง ๆ ของเอทิลเซลลูโลส, เอทิลอะซิเตทในคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) และเอทิลีนไกลคอล ที่ใช้ในการทำ Ternary Phase Diagram

อัตราส่วนที่	ความเข้มข้นเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก		
	เอทิลเซลลูโลส	เอทิลอะซิเตทในคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1)	เอทิลีนไกลคอล
1	50	50	0
2	40	60	0
3	30	70	0
4	20	80	0
5	10	90	0
6	0	100	0
7	50	40	10
8	40	50	10
9	30	60	10
10	20	70	10
11	10	80	10
12	0	90	10
13	50	30	20
14	40	40	20
15	30	50	20
16	20	60	20
17	10	70	20
18	0	80	20
19	50	20	30
20	40	30	30
21	30	40	30
22	20	50	30
23	10	60	30
24	0	70	30

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 อัตราส่วนต่าง ๆ ของเอทิลเซลลูโลส, เอทิลอะซิเตทในคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) และเอทิลีนไกลคอล ที่ใช้ในการทำ Ternary Phase Diagram (ต่อ)

อัตราส่วนที่	ความเข้มข้นเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก		
	เอทิลเซลลูโลส	เอทิลอะซิเตทในคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1)	เอทิลีนไกลคอล
25	50	10	40
26	40	20	40
27	30	30	40
28	20	40	40
29	10	50	40
30	0	60	40
31	50	0	50
32	40	10	50
33	30	20	50
34	20	30	50
35	10	40	50
36	0	50	50
37	40	0	60
38	30	10	60
39	20	20	60
40	10	30	60
41	0	40	60
42	30	0	70
43	20	10	70
44	10	20	70
45	0	30	70
46	20	0	80
47	10	10	80
48	0	20	80
49	10	0	90
50	0	10	90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 อัตราส่วนต่าง ๆ ของเอทิลเซลลูโลส, เอทิลอะซิเตทในคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) และเอทิลีนไกลคอล ที่ใช้ในการทำ Ternary Phase Diagram (ต่อ)

อัตราส่วนที่	ความเข้มข้นเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก		
	เอทิลเซลลูโลส	เอทิลอะซิเตทในคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1)	เอทิลีนไกลคอล
51	0	0	100
52	5	95	0
53	5	90	5
54	5	85	10
55	5	70	25
56	5	65	30
57	5	60	35
58	5	50	45
59	5	35	60
60	5	25	70
61	5	15	80
62	5	5	90
63	10	85	5
64	20	75	5
65	25	70	5
66	40	55	5
67	45	45	10
68	45	35	20
69	45	25	30
70	30	30	40
71	25	25	50
72	25	15	60
73	25	55	20
74	15	50	35
75	15	45	40

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 อัตราส่วนต่างๆ ของเอทิลเซลลูโลส, เอทิลอะซิเตทในคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) และเอทิลีนไกลคอล ที่ใช้ในการทำ Ternary Phase Diagram (ต่อ)

อัตราส่วนที่	ความเข้มข้นเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก		
	เอทิลเซลลูโลส	เอทิลอะซิเตทในคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1)	เอทิลีนไกลคอล
76	15	35	50
77	15	25	60
78	15	15	70
79	15	5	80

3. การทดสอบคุณภาพของเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล

3.1 วัดขนาดของไมโครแคปซูลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic method) (44) ดังวิธีต่อไปนี้ หยดเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลบนแผ่นสไลด์ (slide) ปิดด้วย cover slid' นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ที่มีสเกลบอกขนาดติดอยู่ เลื่อนสไลด์ไปทีละ 4 มิลลิเมตร ตามความกว้างและยาวจนครบ 25 พื้นที่ ในแต่ละพื้นที่ก็นับขนาดอนุภาคของไมโครแคปซูลออกมาเป็นช่วงๆ บันทึกความถี่ในแต่ละช่วง การนับต้องอ่านจำนวนอนุภาคทั้งหมดไม่ต่ำกว่า 625 อนุภาค จากนั้นนำค่าความถี่ (frequency) และช่วงขนาด (size range) มาสร้างกราฟความถี่สะสม (accumulative percent undersize) เทียบกับขนาดของอนุภาค (particle size) เพื่อนำมาหาค่าตัวกลางมัธยฐาน (median) ตัวกลางเลขคณิต (mean) และฐานนิยม (mode)

3.2 ประเมินผลทางชีวภาพ

3.2.1 การหา $LD_{50/ml}$ ของเตตานัสท็อกซิน ใช้ Reed and Muench's Method (44) โดยนำเตตานัสท็อกซินมาทำให้เจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์สาไลน์ (Phosphate Buffer Saline-PBS) pH 7.4 เป็น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} นำแต่ละตัวอย่างฉีดเข้าใต้ผิวหนังของหนูถีบจักร ตัวอย่างละ 10 ตัว ตัวละ 0.5 มล. หลังจากนั้น 4 วัน นับจำนวนหนูที่ตายและจำนวนหนูที่รอดในแต่ละกลุ่ม คำนวณจำนวนหนูที่ตายสะสม (accumulated died value-D) จากตัวอย่างที่เจือจางมากไปหาตัวอย่างที่เจือจางน้อย และคำนวณจำนวนหนูที่รอดสะสม (accumulated survived value-S) จากตัวอย่างที่เจือจางน้อย ไปหาตัวอย่างที่เจือจางมาก นำค่าที่

ได้ไปคำนวณอัตราการตายสะสม (Accumulated Mortality Ratio) และ . เปอร์เซ็นต์การตายสะสม ในแต่ละกลุ่ม นำค่าที่ได้ไปคำนวณหา $LD_{50/ml}$ จากสูตร

$$\text{proportionate distance} = \frac{\text{mortality above 50\% - 50}}{\text{mortality above 50\%-mortality below 50\%}}$$

$$-\log LD_{50} = -\log \text{dilution above 50\% mortality} + \text{proportionate distance}$$

3.2.2 <u>ทดสอบความแรง (Potency Test) ของเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล</u>

ใช้วิธีเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคบาดทะยักของเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล กับแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์ และเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคบาดทะยักของเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลที่ผสมแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์ (อัตราส่วน (1:1) กับแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์เพียงชนิดเดียว การทดสอบยึดถือตามวิธีขององค์การอนามัยโลก (7) ซึ่งดัดแปลงโดย K.R.Mittal (46) คือใช้หนูถีบจักรเป็นสัตว์ทดลองโดยแบ่งหนูถีบจักรออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ฉีดแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์ กลุ่มที่ 2 ฉีดส่วนผสมของเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล กับแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์ (อัตราส่วน 1:1) กลุ่มที่3 ฉีดเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล ในแต่ละกลุ่มแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยละ 30 ตัว แต่ละกลุ่มย่อย ฉีดตัวอย่างที่ทำให้ เจือจางเป็น 1:30, 1:60 และ 1:120 ด้วย PBS pH 7.4 โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังตัวละ 0.5 มล. ตามลำดับ ดังตารางที่ 6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

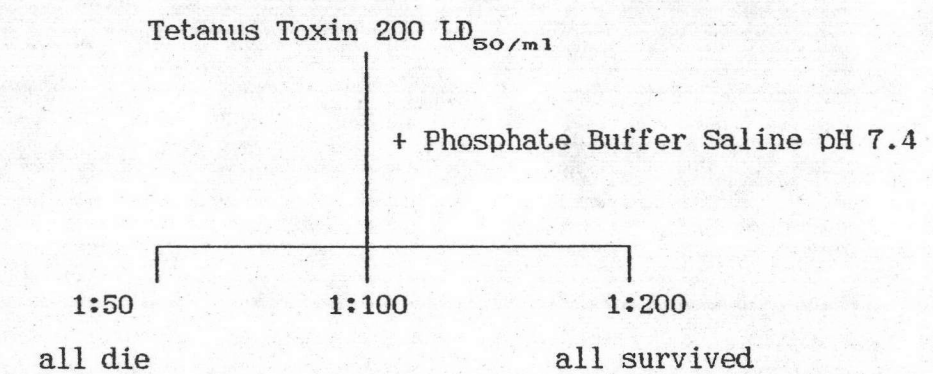
ตารางที่ 6 แสดงการแบ่งกลุ่มของหนูถีบจักรที่ใช้ในการทดสอบความแรงของเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล

อัตราส่วนความเจือจางของตัวอย่าง	จำนวนหนูถีบจักรที่ใช้ในแต่ละกลุ่มทดลอง		
	แอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์	เตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์	เตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล
1:30	30	30	30
1:60	30	30	30
1:120	30	30	30

ในสัปดาห์ที่ 4 (วันที่ 28) หลังการฉีดหนูถีบจักรด้วยตัวอย่างท็อกซอยด์ทั้ง 9 กลุ่มนำหนูถีบจักรกลุ่มย่อยละ 10 ตัวมาฉีดพิษทับ (challenged) ด้วยเตตานัสท็อกซินความแรง 200 $LD_{50/ml}$ โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังตัวละ 0.5 มล. เปรียบเทียบจำนวนหนูถีบจักรที่รอดตายในแต่ละกลุ่มย่อยหลังการฉีดพิษทับ 5 วัน

ในสัปดาห์ที่ 12 และ 24 หลังการฉีดหนูถีบจักรด้วยตัวอย่างท็อกซอยด์ทั้ง 9 กลุ่ม นำหนูถีบจักรที่เหลือกลุ่มย่อยละ 10 ตัว มาฉีดพิษทับ ด้วยวิธีเดียวกัน

ทุกครั้งของการฉีดพิษทับ จะต้องเตรียมหนูถีบจักรที่ไม่ได้รับการฉีดท็อกซอยด์ชนิดใดๆ ทั้งสิ้น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ซึ่งต่อไปนี้จะเรียกเป็นกลุ่มควบคุม นำกลุ่มควบคุม ทั้ง 3 กลุ่ม มาฉีดเตตานัสท็อกซิน 200 $LD_{50/ml}$ ซึ่งทำให้เจือจางด้วยสารละลาย PBS pH 7.4 เป็น 1:50, 1:100 และ 1:200 ตามลำดับ โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังตัวละ 0.5 มล. นับจำนวนหนูถีบจักรที่ตายในแต่ละกลุ่ม หนูถีบจักรที่ได้รับการฉีดด้วยตัวอย่างที่ทำให้เจือจาง 1:50 ต้องตายทั้งหมด และหนูถีบจักรที่ได้รับการฉีดด้วยตัวอย่างที่ทำให้เจือจาง 1:200 ต้องรอดทั้งหมด ดังแผนภูมิ



ถ้าหากหนูกลุ่มควบคุมได้ผลไม่เป็นไปตามนี้ เช่นกลุ่มที่ฉีดด้วยตัวอย่างที่ทำให้เจือจาง 1:200 ตายหมดหรือตายบางส่วน แสดงว่าเกิดความผิดพลาดเกี่ยวกับความแรงของท็อกซิน ต้องนำท็อกซินไปหา $LD_{50/ml}$ ใหม่ จึงจะนำมาใช้ได้

4. <u>การวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลโดยวิธีทางสถิติ</u> (47) นำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบความแรงของเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลในหนูถีบจักรมาวิเคราะห์โดยวิธีทางสถิติที่เรียกว่าการแจกแจง แบบไคสแควร์ (Chi-Square Distribution) ดังวิธีต่อไปนี้

4.1 นำข้อมูลที่ได้มาเรียบเรียงเป็นตารางที่เรียกว่า contingency table ตามตารางที่ 7

<u>ตารางที่ 7</u> contingency table

อัตราส่วนความเจือจางของตัวอย่าง	จำนวนหนูถีบจักรที่รอด			
	แอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์	เตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์	เตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล	ผลรวม
1:30	X	X	X	X
1:60	X	X	X	X
1:120	X	X	X	X
ผลรวม	X	X	X	X

4.2 ตั้งสมุติฐาน Ho : จำนวนหนูถีบจักรที่รอดไม่แตกต่างกันตามชนิดของท็อกซอยด์

Ha : จำนวนหนูถีบจักรที่รอดแตกต่างกันตามชนิดของท็อกซอยด์

4.3 คำนวน $\chi^2 = \sum \frac{(Oi-Ei)^2}{Ei}$

เมื่อ Oi = จำนวนหนูที่รอดจากการทดลอง

Ei = ค่าคาดหวัง (expected value) ที่ได้จากการคำนวณจากข้อมูล

4.4 เปิดตารางดูค่า χ^2 โดยใช้ α = 0.05 degree of freedom สำหรับการทดลองนี้ เท่ากับ 4

4.5 สรุปผล ถ้า χ^2 จากการคำนวณ น้อยกว่า X^2 จากตารางจะยอมรับสมมุติฐาน Ho

ถ้า χ^2 จากการคำนวณ มากกว่า X^2 จากตารางจะปฏิเสธสมมุติฐาน Ho และยอมรับสมมุติฐาน Ha

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย