

### บทที่ 3 ผลการวิจัย

#### 1. ศึกษาเทคนิคต่างๆ ในการเตรียมเตตรานัสที่ออกซอซิดไมโครแคปซูล ในห้องปฏิบัติการ 1.1 เทคนิคการเกิดโคอาเซอร์เวชัน หรือการทำให้เกิดการแยกตัวของวัฏภาค เป็น 2 วัฏภาค (Coacervation Techniques or Phase Separation Techniques)

##### 1.1.1 การเติมเกลือที่ละลายได้ในน้ำ (Phase Separation by dispersion in aqueous solution of inorganic salts)

การเตรียมเตตรานัสที่ออกซอซิดไมโครแคปซูล โดยใช้สารละลาย เซลลูโลส อะซีเตท ทาเลท 10 เปอร์เซ็นต์ ในอะซีโตน เป็นผนังหุ้มไมโครแคปซูล และ ใช้สารละลาย แอมโมเนียมซัลเฟต 35 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำให้เกิดการแยกชั้นของวัฏภาค ใช้อัตราเร็วในการคน 400 รอบต่อนาที พบว่าสารละลายสุดท้ายจับกันเป็นก้อน เห็นขาวคล้ายวุ้น ไม่เกิดไมโครแคปซูล เมื่อเปลี่ยนอัตราเร็วในการคนเป็น 1000 รอบต่อนาที และ 2000 รอบต่อนาที ได้ผลการทดลองเหมือนเดิมคือไม่เกิดไมโครแคปซูล เมื่อให้อัตราการคนคงที่เป็น 400 รอบต่อนาที และความเข้มข้นของเซลลูโลส อะซีเตท ทาเลท เป็น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ ก็ได้ผลการทดลองเหมือนเดิมคือไม่เกิดไมโครแคปซูล เมื่อคงอัตราการคน เป็น 400 รอบต่อนาที ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 35 เปอร์เซ็นต์ แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของเซลลูโลสอะซีเตท ทาเลทเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก จะได้สารละลายสุดท้ายไม่เกาะกันเป็นวุ้น แต่ก็ยังคงไม่เกิดไมโครแคปซูล เช่นเดียวกัน

##### 1.1.2 การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า Dielectric Constant 15-34

การเตรียมเตตรานัสที่ออกซอซิดไมโครแคปซูล โดยใช้สารละลายของเซลลูโลสอะซีเตททาเลท ในอะซีโตน 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเป็นผนังหุ้มไมโครแคปซูล ใช้น้ำมันแร่ และสแนป 80 เป็นตัวทำให้เกิดการแยกชั้นของวัฏภาค พบว่าสารละลายสุดท้าย จับกันเป็นก้อนเห็นขาวคล้ายวุ้น ไม่เกิดไมโครแคปซูล

##### 1.1.3 การเติมตัวทำละลายที่มีค่า Dielectric Constant ต่ำกว่า 10

1.1.3.1 การเตรียมเตตรานัสที่ออกซอซิดไมโครแคปซูล โดยใช้ไฮดร็อกซีโปรพิลเมทิลเซลลูโลส ในเมทิลีนคลอไรด์ เป็นผนังหุ้มไมโครแคปซูล ใช้เอทิลีนไกลคอล เป็นตัวทำให้เกิดการแยกชั้นของวัฏภาค พบว่าสารละลายสุดท้ายยังคงจับกันเป็นก้อนเห็นขาวคล้ายวุ้น และไม่เกิดไมโครแคปซูล

1.1.3.2 การเตรียมเตตานิส์ที่ออกซอดีไมโครแคปซูล โดซีใช้เอทิลเซลลูโลส เป็นผนังหุ้มไมโครแคปซูล และใช้ส่วนผสมของเอทิลอะซีเตตคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) เป็นตัวทำละลายเอทิลเซลลูโลส ใช้เอทิลีนไกลคอลทำให้เกิดการแยกชั้นของวัฏภาค นั้นพบว่าการเกิด โคอาเซอร์เวท (Coacervate) รอบตัวยาแต่ได้เตตานิส์ที่ออกซอดีไมโครแคปซูลขนาดใหญ่ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร

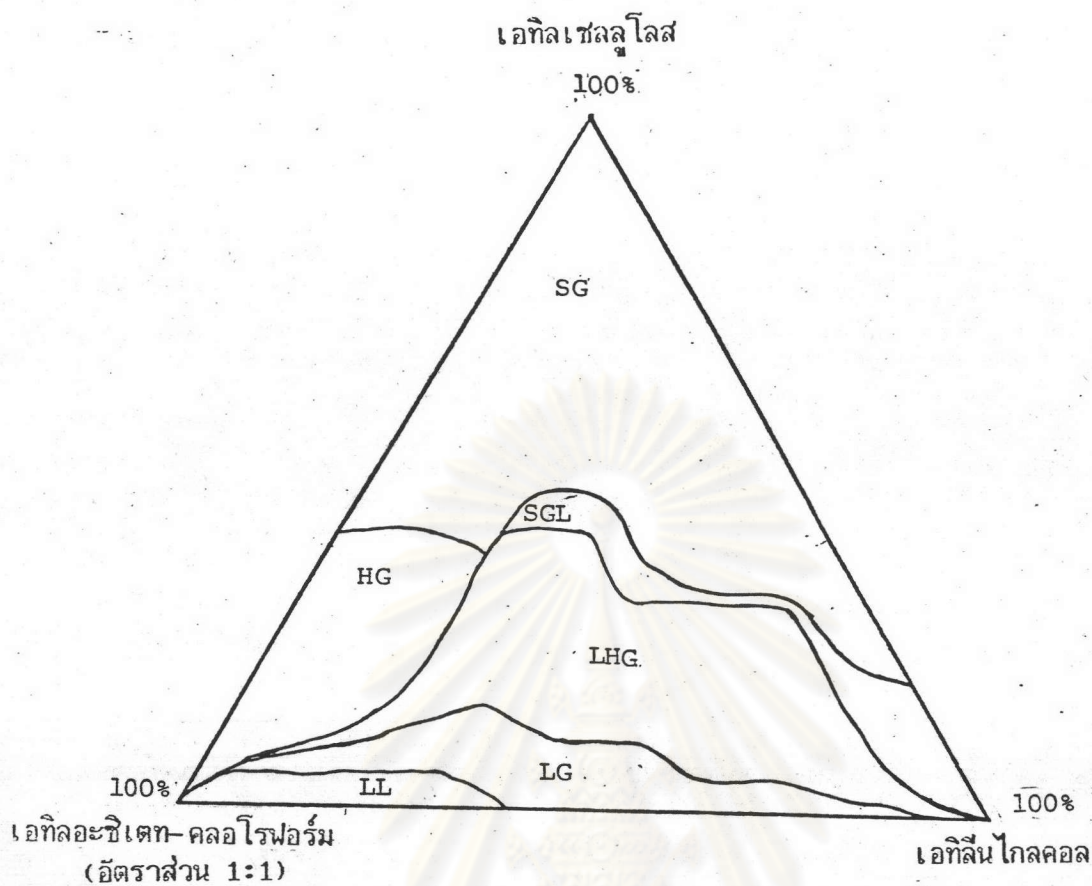
## 1.2 การเตรียมเตตานิส์ที่ออกซอดีไมโครแคปซูล โดซีใช้อินเตอร์เฟเชียลโพลีเมอร์ไรเซชันเทคนิค (Interfacial Polymerization Technique)

การเตรียมเตตานิส์ที่ออกซอดีไมโครแคปซูล โดซีใช้เลขิทินบริสท์ที่ได้จากไข่แดงเป็นผนังหุ้มไมโครแคปซูล และใช้คาร์บอกซีเมทิลไคติน เป็นตัวทำให้เกิดปฏิกิริยาโพลีเมอร์ไรเซชัน จะได้ไมโครแคปซูลขนาดเล็กและสม่ำเสมอมีตัวกลางเลขคณิตของเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.69 ไมครอน และ 72% ของอนุภาคของไมโครแคปซูลจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง ไม่เกิน 3 ไมครอน ใช้เวลาคน 16 ชั่วโมง เพื่อให้ไดคลอโรมีเทนระเหยหมด

## 2. นิตนาวิธีที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 เพื่อหาวิธีเตรียมที่ดีที่สุด เพื่อให้ได้เตตานิส์ที่ออกซอดีไมโครแคปซูลที่เหมาะสมที่จะนำไปทำยาฉีด

การทำ Ternary -Phase Diagram ของเอทิลเซลลูโลส เอทิลอะซีเตต ในคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) และเอทิลีนไกลคอล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องได้ผลดังรูปที่ 8 และ 9 ตามลำดับ แบ่งพื้นที่ของ Ternary -Phase Diagram ตามลักษณะการละลายออกได้เป็น 6 พื้นที่ คือ Solid-gel(SG), Hard gel (HG), Solid-Gel-Liquid(SGL), Liquid-Hard Gel(LHG), Liquid-Gel(LG), และ Liquid-Liquid(LL)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**รูปที่ 8** แสดง Ternary Phase Diagram ของเอทิลเซลลูโลส, เอทิลอะซิเตท-คลอโรฟอร์ม (1:1) และ เอทิลีนไกลคอล ศึกษาที่อุณหภูมิ 4°C

SG = Solid - Gel

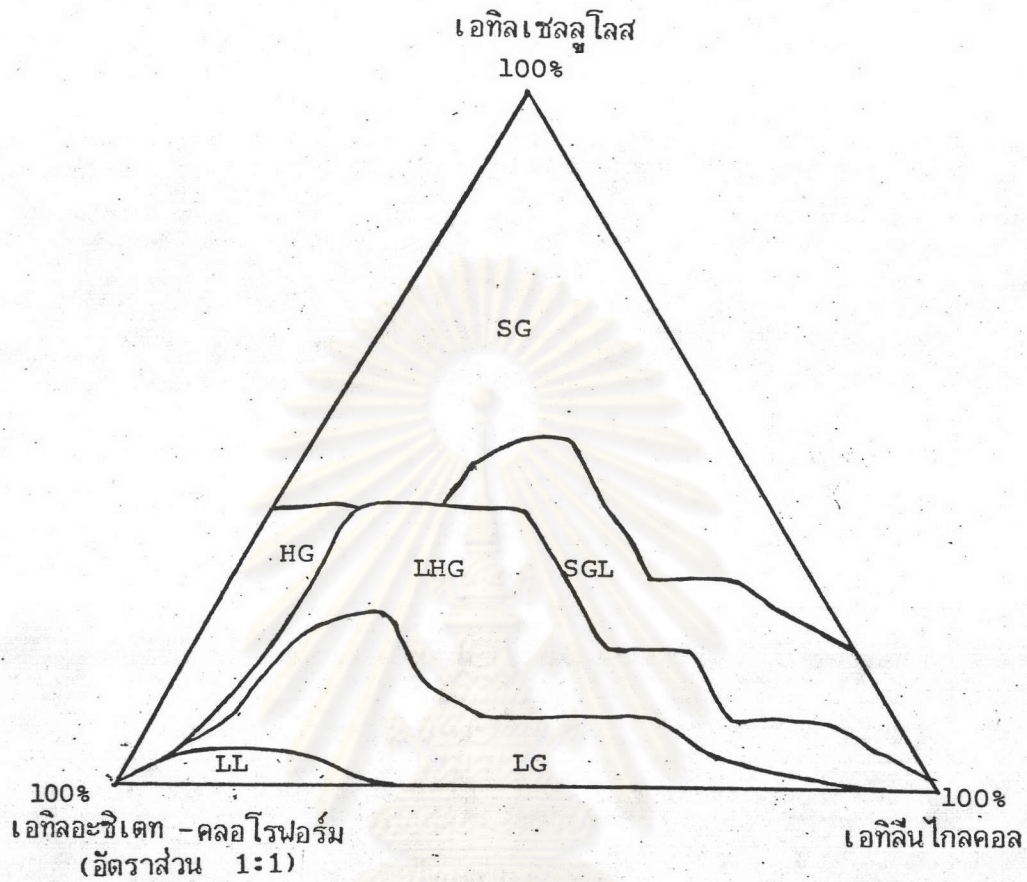
HG = Hard Gel

SGL = Solid - Gel - Liquid

LHG = Liquid - Hard Gel

LG = Liquid - Gel

LL = Liquid - Liquid



**รูปที่ 9** แสดง Ternary Phase Diagram ของเอทิลเซลลูโลส, เอทิลอะซิเตท - คลอโรฟอร์ม (1:1) และ เอทิลีนไกลคอล ศึกษาที่อุณหภูมิห้อง

SG = Solid - Gel

HG = Hard Gel

SGL = Solid - Gel - Liquid

LHG = Liquid - Hard Gel

LG = Liquid - Gel

LL = Liquid - Liquid

- Solid-Gel (SG) ผลการละลายของสารทั้ง 3 ชนิด จะได้เป็น 2 วัฏภาค คือมีส่วนที่เป็นของแข็ง (Solid) และส่วนที่เป็นวุ้น (Gel)
- Hard Gel (HG) ผลการละลายของสารทั้ง 3 ชนิดจะเป็น 1 วัฏภาค ที่มีลักษณะเป็นวุ้นแข็ง ไม่มีคุณสมบัติการไหล (Flowability)
- Solid-Gel-Liquid (SGL) ผลการละลายของสารทั้ง 3 ชนิด จะได้เป็น 3 วัฏภาคคือมีส่วนที่เป็นของแข็ง ส่วนที่วุ้น และส่วนที่เป็นของเหลว (Liquid)
- Liquid-Hard Gel (LHG) ผลการละลายของสารทั้ง 3 ชนิดจะได้เป็น 2 วัฏภาค คือส่วนที่เป็นของเหลว และส่วนที่เป็นวุ้นแข็ง
- Liquid-Gel (LG) ผลการละลายของสารทั้ง 3 ชนิดจะได้เป็น 2 วัฏภาค คือส่วนที่เป็นของเหลว และส่วนที่เป็นวุ้น
- Liquid-Liquid (LL) ผลการละลายของสารทั้ง 3 ชนิด จะได้เป็น 2 วัฏภาค คือส่วนที่เป็นของเหลว 2 ชนิด ซึ่งไม่ละลายต่อกัน (immiscible)

ผลการทดลองเมื่อเตรียมเตตรานีสที่ออกซอยด์ไมโครแคปซูล โดยใช้อัตราส่วนของเอทิลเซลลูโลส เอทิลอะซิเตท-คลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) และเอทิลีนไกลคอล ในพื้นที่ที่เป็น Liquid-Gel ใน Ternary-Phase Diagram ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดลองโดยใช้โคอาเซอร์เวชันเทคนิค และ Ternary Phase Diagram

การทดลองที่	อัตราส่วนของเอทิลเซลลูโลส เอทิลอะซิเตท - คลอโรฟอร์ม, และเอทิลีนไกลคอล ตามลำดับ		เวลาที่ใช้ในการเกิดโคอาเซอร์เวท (ชั่วโมง)	ขนาดของอนุภาค เป็นไมครอน
	อัตราส่วนเริ่มต้น	อัตราส่วนสุดท้าย		
2.1.1	A 5 : 75 : 20	B 2.5 : 37.5 : 60	6.5	33
2.1.2	C 10 : 70 : 20	D 5 : 35 : 60	8.0	35
2.1.3	E 10 : 60 : 30	F 1 : 6 : 93	2.5	45
2.1.4	G 7 : 30 : 63	H 1 : 9 : 90	2.5	25

### 3. การทดสอบคุณภาพของเตตานีสที่ออกซอยด์ไมโครแคปซูล

#### 3.1 ผลการวัดขนาดของไมโครแคปซูลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

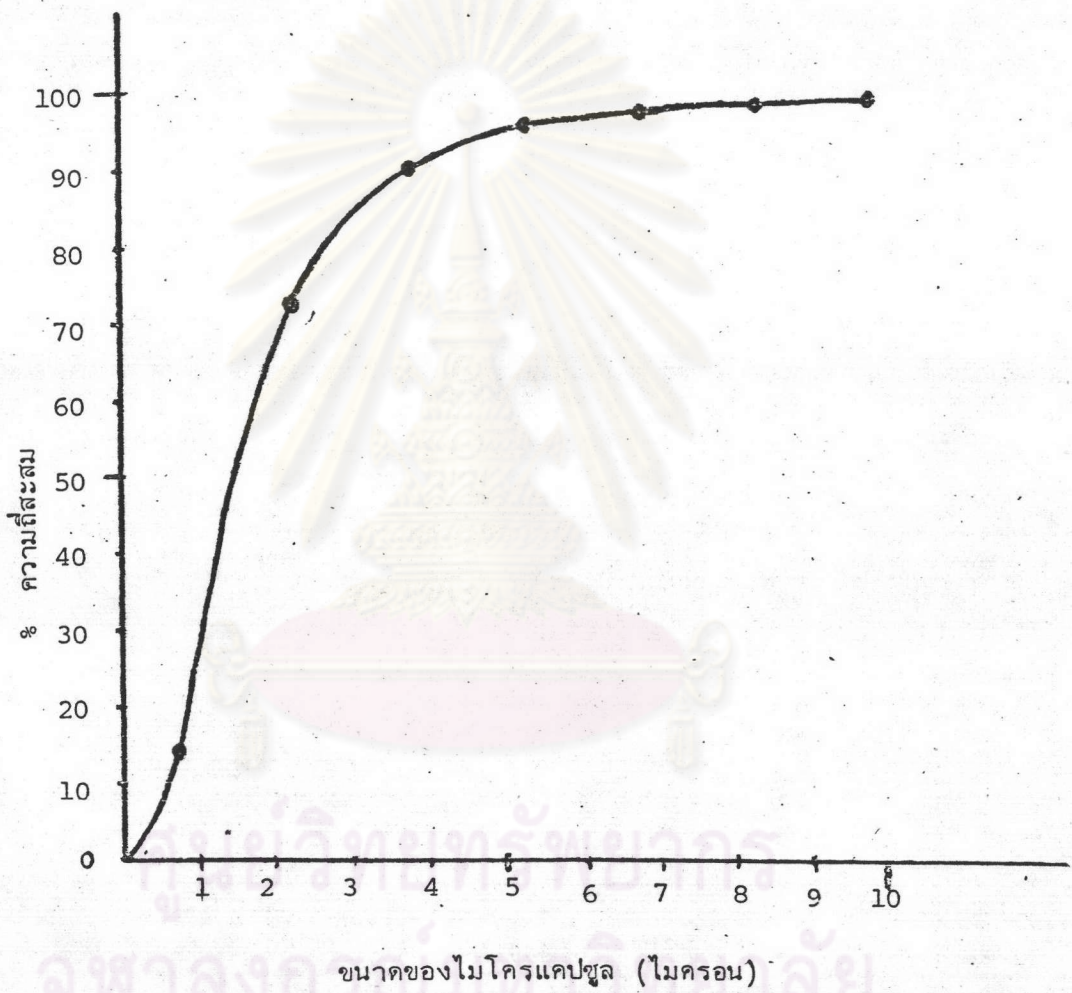
การวัดขนาดและการกระจายขนาดของเตตานีสที่ออกซอยด์ไมโครแคปซูล  
ตัวรับต่างๆ ได้ค่าเฉลี่ย ตัวกลางเลขคณิต มัธยฐาน และฐานนิยม ปรากฏตามตารางที่ 9  
และ 10 และรูปที่ 10 และ 11

ตารางที่ 9 แสดงขนาดและการกระจายขนาดของเตตานีสที่ออกซอยด์ไมโคร  
แคปซูล โดยวิธีอินเตอร์เพนเชียลโพลีเมอร์ไรเซชัน ตามวิธีในข้อ 1.2

ช่วงขนาดอนุภาค (ไมครอน)	% ความถี่	% ความถี่สะสม
0 - 1.5	14.29	14.29
1.6 - 3.0	58.41	72.70
3.1 - 4.5	18.25	90.95
4.6 - 6.0	5.24	96.19
6.1 - 7.5	1.59	97.78
7.6 - 9.0	1.11	98.89
9.1 - 10.5	1.11	100.00
ตัวกลางเลขคณิต	2.69	
มัธยฐาน	1.82	
ฐานนิยม	2.2	
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	1.54	

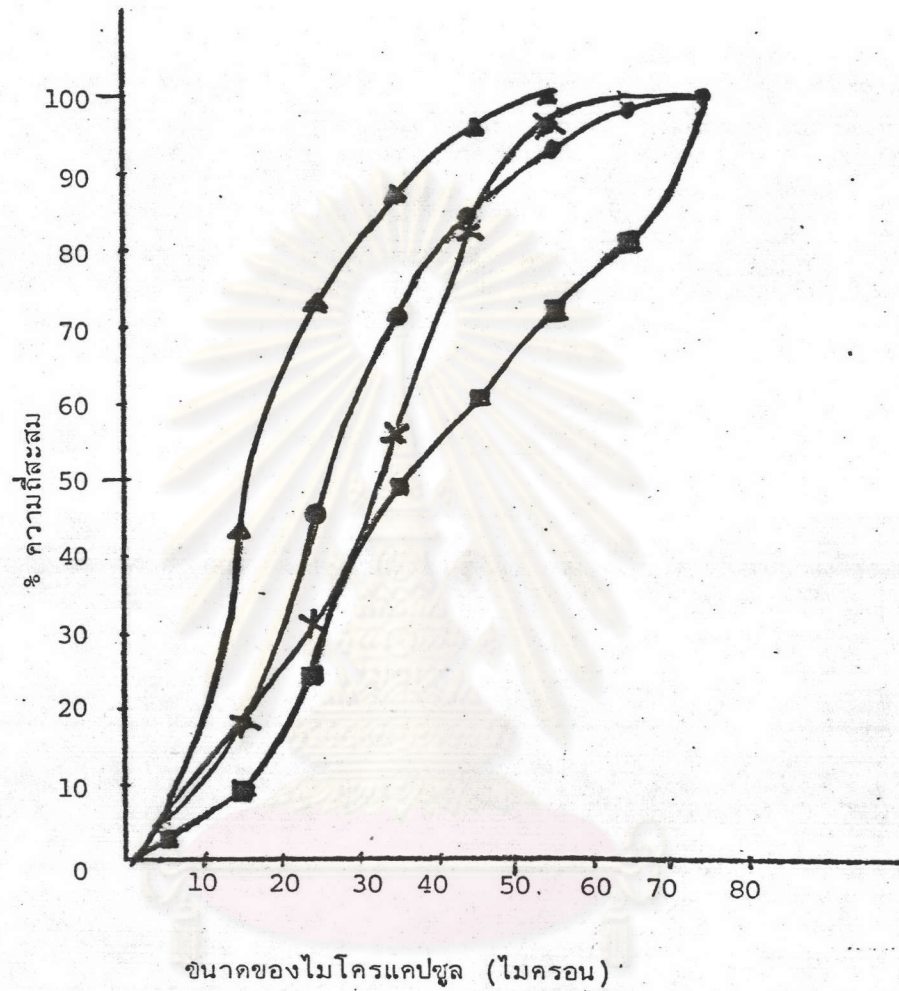
ตารางที่ 10 แสดงขนาดและการกระจายของเตตานั้นส์ที่ออกซอยด์ไมโครแคปซูลโดยวิธี  
โคอาเซอร์เวชัน ตามวิธีในข้อ 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3 และ 2.1.4

ช่วงขนาด อนุภาค (ไมครอน)	วิธีในข้อ 2.1.1		วิธีในข้อ 2.1.2		วิธีในข้อ 2.1.3		วิธีในข้อ 2.1.4	
	% ความถี่	% ความถี่สะสม	% ความถี่	% ความถี่สะสม	% ความถี่	% ความถี่สะสม	% ความถี่	% ความถี่สะสม
2-10	6.18	6.18	7.73	7.73	2.86	2.86	7.13	7.13
11-20	10.72	16.90	10.85	18.58	6.75	9.61	36.12	43.25
21-30	28.15	45.05	12.21	30.79	19.48	29.09	24.19	67.44
31-40	26.14	71.19	24.83	55.62	20.13	49.22	19.69	87.13
41-50	13.40	84.59	26.87	82.49	11.30	60.52	8.06	95.19
51-60	12.73	97.32	13.84	96.33	12.34	72.86	4.81	100.00
61-70	1.34	98.66	2.04	98.37	7.79	80.65	-	
71-80	1.34	100.00	1.63	100.00	19.35	100.00	-	
ตัวกลางเลขคณิต	33.01		35.98		44.52		24.99	
มัธยฐาน	32.39		38.24		41.19		23.29	
ฐานนิยม	25.50		45.50		35.50		25.50	
ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	14.92		15.94		20.65		12.71	



รูปที่ 10 แสดงการกระจายขนาดของเตตานิส์ที่ออกขอยคิไมโครแคปซูลที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีอินเตอร์เฟซัลโพลีเมอไรเซชัน





รูปที่ 11 แสดงการกระจายขนาดของเตตรานีสที่ออกซอยด์ไมโครแคปซูล  
ที่ได้จากการเตรียมโดยวิธีโคอาเชอร์เวชัน 4 วิธี

- X การกระจายขนาดของไมโครแคปซูล ตามวิธีที่ 2.1.1
- การกระจายขนาดของไมโครแคปซูล ตามวิธีที่ 2.1.2
- การกระจายขนาดของไมโครแคปซูล ตามวิธีที่ 2.1.3
- ▲ การกระจายขนาดของไมโครแคปซูล ตามวิธีที่ 2.1.4

### 3.2 การประเมินผลทางชีวภาพ

3.2.1 การหา  $LD_{50/m1}$  ของเตตานีสที่อกซิม จำนวนหนูกีบจักรที่ตายหลังจาก การฉีดเตตานีสที่อกซิม ที่ทำให้เจือจางเป็น  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  และ  $10^{-5}$  แสดงไว้ในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 จำนวนหนูกีบจักรที่ตายและค่าการคำนวณในการหา  $LD_{50/m1}$  ของเตตานีสที่อกซิม

dilution	Mortality Ratio	Died	Survived	Accumulated Value			
				Die (D)	Survived (S)	Mortality Ratio	Percent = $\frac{D}{D+S} \times 100$
$10^{-1}$	10/10	10	0	30	0	30/30	100
$10^{-2}$	10/10	10	0	26	0	20/20	100
$10^{-3}$	10/10	10	0	10	0	10/10	100
$10^{-4}$	0/10	0	10	0	10	0/10	0
$10^{-5}$	0/10	0	10	0	20	0/20	0

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

$$= \frac{100 - 50}{100 - 0} = 0.5$$

$$\begin{aligned} -\log LD_{50/m1} &= -\log \text{dilution above 50\% mortality} + \text{proportionate distance} \\ &= -\log 10^{-3} + 0.5 \\ &= 3.5 \end{aligned}$$

$$LD_{50/m1} = 10^{-3.5}$$

นั่นคือ ถ้าต้องการ 1  $LD_{50/m1}$  ต้องเจือจางเตตานีสที่อกซิม 1 มล. เป็น  $10^{3.5}$  มล.

ฉะนั้น ถ้าต้องการ 200  $LD_{50/m1}$  ต้องเจือจางเตตานีสที่อกซิม 200 มล. เป็น  $10^{3.5}$  มล.

ถ้าต้องการ 200  $LD_{50/m1}$  ต้องเจือจางเตตานีสที่อกซิม 1 มล. เป็น  $\frac{10^{3.5}}{200} = 15.8$  มล.

### 3.2.2 การทดสอบความแรง (Potency Test) ของเตตานีสที่ออกซอลดีไมโครแคปซูล

ตารางที่ 12, 13 และ 14 แสดงผลการทดลองจากการฉีดหนูถีบจักรด้วยแอดสอร์บเตตานีสที่ออกซอลดี, เตตานีสที่ออกซอลดีไมโครแคปซูลผสมกับแอดสอร์บเตตานีสที่ออกซอลดี (อัตราส่วน 1:1) และเตตานีสที่ออกซอลดี ไมโครแคปซูล แล้วนำมาฉีดพิษกับด้วย เตตานีสที่ออกซอลดี 200 LD<sub>50/m1</sub> ในสัปดาห์ที่ 4, 12 และ 24 ตามลำดับ

ตารางที่ 12 แสดงจำนวนหนูถีบจักรที่รอดจากเตตานีสที่ออกซอลดีหลังจากได้รับการฉีดที่ออกซอลดี 4 สัปดาห์

ความเจือจาง ของ ที่ออกซอลดี	จำนวนหนูถีบจักรที่รอด		
	แอดสอร์บเตตานีสที่ออกซอลดี	เตตานีสที่ออกซอลดีไมโครแคปซูล แอดสอร์บเตตานีสที่ออกซอลดี	เตตานีสที่ออกซอลดี ไมโครแคปซูล
1:30	8	9	0
1:60	5	4	0
1:120	0	0	0

ตารางที่ 13 จำนวนหนูถีบจักรที่รอดจากเตตานีสที่ออกซอลดีหลังจากได้รับการฉีดที่ออกซอลดี 12 สัปดาห์

ความเจือจาง ของ ที่ออกซอลดี	จำนวนหนูถีบจักรที่รอด		
	แอดสอร์บเตตานีสที่ออกซอลดี	เตตานีสที่ออกซอลดีไมโครแคปซูล แอดสอร์บเตตานีสที่ออกซอลดี	เตตานีสที่ออกซอลดี ไมโครแคปซูล
1:30	5	8	0
1:60	0	3	0
1:120	0	0	0

**ตารางที่ 14** จำนวนหน้บจักรที่รอดจากเตตานีสที่อกชิน หลังจากได้รับการจัด  
ที่อกชอยด์ 24 สัปดาห์

ความเจือจาง ของ ที่อกชอยด์	จำนวนหน้บจักรที่รอด		
	แอดสอร์บเตตานีสที่อกชอยด์	เตตานีสที่อกชอยด์ไมโครแคปซูล แอดสอร์บเตตานีสที่อกชอยด์	เตตานีสที่อกชอยด์ ไมโครแคปซูล
1:30	0	1	0
1:60	0	0	0
1:120	0	0	0

4. การวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล โดยวิธีทางสถิติ

นำผลการทดลองจากตารางที่ 12, 13 และ 14 มาเรียบเรียงใส่ตาราง contingency ตามตารางที่ 15, 16 และ 17 ตามลำดับ

นำผลการทดลองจากตารางที่ 12, 13 และ 14 มาคำนวณทางสถิติซึ่งมีรายละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวก จากการวิเคราะห์ข้อมูลสรุปได้ว่า

4.1 จำนวนหน้บจักรที่รอดจากเตตานีสที่อกชินหลังจากได้รับการจัดเตตานีสที่อกชอยด์ชนิดต่าง ๆ 4 สัปดาห์ไม่มีความแตกต่างกันตามชนิดของที่อกชอยด์

4.2 จำนวนหน้บจักรที่รอดจากเตตานีสที่อกชินหลังจากได้รับการจัดเตตานีสที่อกชอยด์ชนิดต่าง ๆ 12 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันตามชนิดของที่อกชอยด์

4.3 จำนวนหน้บจักรที่รอดจากเตตานีสที่อกชินหลังจากได้รับการจัดเตตานีสที่อกชอยด์ชนิดต่าง ๆ 24 สัปดาห์ไม่มีความแตกต่างกันตามชนิดของที่อกชอยด์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย