รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะที่สุดของ เดโซมีดีน ในการเป็นยาฆ่าเชื้อ

รองศาสตราจารย์ ปภาวดี คล่องพิทยาพงษ์

ได้รับทุนจาก
งบประมาณแผ่นดินปี 2528

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย iii

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ iv

รายการรูปภาพประกอบ v

รายการตารางประกอบ vii

บทที่

1. บทนำ

คุณสมบัติของ Desomedine 1

สวนประกอบและโครงสร้างของเยื่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต 2

2. อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

2.1 อุปกรณ์ 6

2.2 วิธีการวิจัย 7

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลการซึมผ่านและปฏิกิริยาของ Desomedine ระดับความเข้มข้น 0.1 %, 0.2 % 0.5 %, 1.0 % 1.5 % และ 2.0 % ต่อสวนประกอบของ Egg Lecithin และ Cholesterol ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่ pH 5.9 10

3.2 ผลการซึมผ่านและปฏิกิริยาของ Desomedine ระดับความเข้มข้น 0.1 %, 0.2 %, 0.5 %, 1.0 % 1.5 % และ 2.0 % ต่อเยื่อเซลล์ที่สร้างจาก Egg Lecithin, Cholesterol และ Bovine Serum Albumin ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่ pH 5.9 16

4. การอภิปรายผลการวิจัย.....22

5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....23

เอกสารอ้างอิง..... 24

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาความเข้มข้นของ Desomedine ที่พอเหมาะ ในการมีฤทธิ์เป็นยาฆ่าเชื้อโดยไม่ทำให้เยื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง ความเข้มข้นของ Desomedine ที่ใช้ในการทดลองคือ 0.1 %, 0.2 %, 0.5 %, 1.0 %, 1.5 % และ 2.0 % ผลการวิจัยพบว่า Desomedine ในระดับความเข้มข้น 0.1 % ก่อให้เกิดปฏิกิริยากับเยื่อเซลล์น้อยที่สุด และยังคงมีคุณสมบัติเป็นยาฆ่าเชื้อได้ด้วย ปฏิกิริยาส่วนใหญ่ของ Desomedine จะเกิดกับ Cholesterol และปฏิกิริยาจะเกิดมากขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ Desomedine

Abstract

This research was investigated for the optimum concentration of Desomedine as an antiseptic without any change in cell membrane. The concentrations of Desomedine used were 0.1 %, 0.2 %, 0.5 %, 1.0 %, 1.5 % and 2.0 %. The results indicated that Desomedine 0.1 % has an antiseptic action and lowest interaction with cell membrane. The interaction occurred strongly with Cholesterol and the degree of interactions were increasing with increased concentration of Desomedine.

รายการรูปภาพประกอบ

รูปที่ หน้า

1. สูตรโครงสร้างทั่วไปของ Phospholipid..... 2.
2. สูตรโครงสร้างของ Cholesterol..... 3.
3. การจับรวมกันของ Phosphatidylethanolamine กับ Cholesterol..... 3.
4. Surface Pressure-Surface Area (π-A) curves ของ Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin อัตราส่วน 4:0:0 ที่ pH 5.9 เมื่อไม่มี Desomedine (X), เมื่อมี Desomedine 0.1 % (0), 0.2 % (△), 0.5 % (□), 1.0 % (▣), 1.5 % (●) และ 2.0 % (▲).....11
5. Surface Pressure-Surface Area (π-A) curves ของ Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin อัตราส่วน 3:1:0 ที่ pH 5.9 เมื่อไม่มี Desomedine (X), เมื่อมี Desomedine 0.1 %(0), 0.2 % (△), 0.5 % (□), 1.0 % (▣), 1.5 % (●) และ 2.0 % (▲).....12.
6. Surface Pressure-Surface Area (π-A) curves ของ Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin อัตราส่วน 2:2:0 ที่ pH 5.9 เมื่อไม่มี Desomedine (X), เมื่อมี Desomedine 0.1 % (0), 2.0 % (△), 0.5 % (□), 1.0 % (▣), 1.5 % (●) และ 2.0 % (▲).....13.
7. Surface Pressure-Surface Area (π-A) curves ของ Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin อัตราส่วน 1:3:0 ที่ pH 5.9 เมื่อไม่มี Desomedine (X), เมื่อมี Desomedine 0.1 % (0), 0.2 % (△), 0.5 % (□), 1.0 % (▣), 1.5 % (●) และ 2.0 % (▲)...14

รูปที่ หน้า

8. Surface Pressure-Surface Area (π-A) curves
ของ Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum
Albumin อัตราส่วน 4:0:4 ที่ pH 5.9 เมื่อไม่มี
Desomedine (X), เมื่อมี Desomedine 0.1 % (O)
0.2 % (△), 0.5 % (□), 1.0 % (■), 1.5 % (●)
และ 2.0 % (▲).....17

9. Surface Pressure-Surface Area (π-A) curves ๆ
ของ Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum
Albumin อัตราส่วน 3:1:4 ที่ pH 5.9 เมื่อไม่มี
Desomedine (X), เมื่อมี Desomedine 0.1 % (O)
0.2 % (△), 0.5 % (□), 1.0 % (■), 1.5 % (●)
และ 2.0 % (▲).....18

10. Surface Pressure-Surface Area (π-A) curves
ของ Egg Lecithin : Cholesterol . Bovine Serum
Albumin อัตราส่วน 2:2:4 ที่ pH 5.9 เมื่อไม่มี
Desomedine (X) เมื่อมี Desomedine 0.1 % (O)
0.2 % (△), 0.5%(□), 1.0 % (■), 1.5 % (●)
และ 2.0 % (▲).....19

11. Surface Pressure-Surface Area (π-A) curves
ของ Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum
Albumin อัตราส่วน 1:3:4 ที่ pH 5.9 เมื่อไม่มี
Desomedine (X) เมื่อมี Desomedine 0.1 % (O)
0.2 % (△), 0.5 % (□), 1.0 % (■), 1.5 % (●)
และ 2.0 % (▲).....20

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ หน้า

1. สรุปผลการซึมผ่านและปฏิกิริยาของ Desomedine ต่อเยื่อเซลล์ (Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin = 4:0:0, 3:1:0, 2:2:0 และ 1:3:0) ที่ pH 5.9 .....15.

2. สรุปผลการซึมผ่านและปฏิกิริยาของ Desomedine ต่อเยื่อเซลล์ (Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin = 4:0:4, 3:1:4, 2:2:4 และ 1:3:4) ที่ pH 5.9 .....21.

บทที่ 1.

บทนำ

Antiseptic เป็นยาที่ใช้กับเนื้อเยื่อเพื่อทำลายหรือป้องกันการเจริญเติบโตของจุลชีพ เนื่องจากเป็นยาที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวาง จึงมีการผลิตยาใหม่ ๆ อยู่เสมอเพื่อที่จะให้ได้ยาที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยมากที่สุด Desomedine เป็น antiseptic ที่ถูกนำมาใช้เมื่อเร็ว ๆ นี้ ซึ่งจากการทดลองพบว่าเป็น antiseptic ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด และดีที่สุดตัวหนึ่ง(14) นอกจากจะใช้ได้ผลดีใน Protozoal diseases แล้วยังใช้ได้ผลดีเป็น bacteriostatic, bacteriocidal และ fungistatic อีกด้วย โดยมีผลไปกด oxidative metabolism ของแบคทีเรีย ซึ่ง bacteriostatic action จะลดลงในสภาวะของกรด แต่จะเพิ่มขึ้นในสภาวะของด่าง(2,6,18)

Desomedine เป็นผงสีขาว ละลายได้ดีในน้ำ, Propylene glycol, Methanol, Dimethylformamide, Sorbitol และ Glycerine ละลายได้เล็กน้อยใน ethanol แต่ไม่ละลายใน ethyl ether, acetone และ chloroform เมื่อละลายแล้วจะไม่มีสี มีความเป็นกลาง และเป็นสารละลายที่มีความคงตัว มีผู้นำ Desomedine ในความเข้มข้น 0.1 %, 1.0 % และ 1.5 % มาใช้ในพวกโรคผิวหนัง ความเข้มข้น 2.0 % นำมาใช้สำหรับล้างมือ, อาบน้ำ และผสมกับ Physiological saline ใช้ฉีดเข้าเส้นเลือดในรายที่มีการติดเชื้อหรือมี Gangrenous deep lesion หรือติดเชื้อจากพวก Candida เนื่องจาก Desomedine ไม่มีกลิ่น และไม่เปลี่ยนกลิ่นหอมของเครื่องสำอาง จึงนำมาใช้ในการผลิตเครื่องสำอางประเภท Deodorizing และ Antiperspiring ในความเข้มข้น 0.2 % ซึ่งฤทธิ์ของยาไม่เปลี่ยนแปลงตามเวลาและอุณหภูมิเมื่อเก็บไว้ (14)

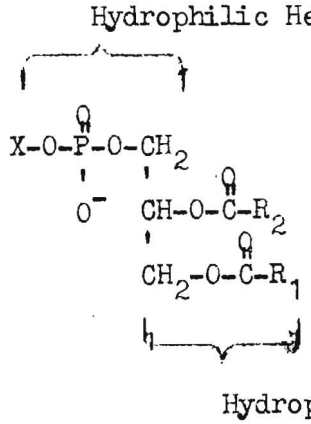
Desomedine สามารถซึมผ่านผิวหนังได้เล็กน้อย และถ้ายานี้สัมผัสกับผิวหนังเป็นเวลานานจะทำให้ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรคลดลง(14) ซึ่งมีรายงานว่าสารประกอบไขมันบริเวณผิวหนังจะมีผลไปลดฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรคของยา Antiseptics หลายชนิด(18) นอกจากนี้ Schoenbach(14) และ Elson(6) ยังพบว่า Soybeen lecithin มี inhibitory effect คือ Fungistatic และ Bacteriostatic ของ Propamidine ซึ่งเป็น Lower homologue ของ Desomedine อีกด้วย

ส่วนประกอบและโครงสร้างของเยื่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต

ส่วนประกอบที่สำคัญ คือ ไขมัน และโปรตีน เยื่อเซลล์แต่ละชนิดและสัตว์ต่าง Species กันจะมีไขมันและโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีคาร์โบไฮเดรท น้ำ และกรดนิวคลีอิครวมอยู่ด้วยจำนวนเล็กน้อย เยื่อเซลล์ส่วนมากมีไขมันอยู่ประมาณ 30-40 % โปรตีนประมาณ 50-70 % และคาร์โบไฮเดรทประมาณ 1-10 % ของน้ำหนักแห้ง

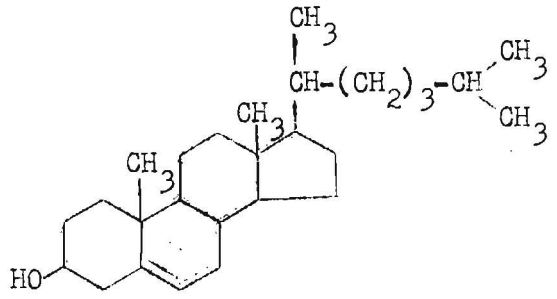
ไขมันที่ประกอบในเยื่อเซลล์ประมาณ 60 % เป็น Phospholipid อีกประมาณ 40 % เป็น Cholesterol และจำนวนเล็กน้อยเป็น Glycolipid ลักษณะที่สำคัญของไขมันที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อเซลล์ คือ เป็นสารประเภท Amphipathic กล่าวคือโมเลกุลมีอยู่ 2 ลักษณะ ส่วนหนึ่งเรียกว่าส่วนหัวเป็นส่วนที่มีขั้วละลายน้ำได้ดี (Hydrophilic Head Group) อีกส่วนหนึ่งเรียกว่าส่วนหาง เป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว ไม่ละลายในน้ำ (Hydrophobic Tail) แต่ละลายในสารพวกไฮโดรคาร์บอนได้ดี เมื่ออยู่ในน้ำจะจับกันเองโดยเอาส่วน Hydrophobic หันเข้าหากันและเอาส่วน Hydrophilic หันออกเข้าหาน้ำ การจับกันแบบนี้ทำให้เกิดเป็นหยดเล็ก ๆ (Micelles) หรือแผ่นคู่ (Bilayer or Lamellar)

Phospholipid หรือ Phosphoglyceride ได้แก่ ไขมันที่ประกอบด้วย Glyceride, Fatty Acid 2 ตัว, Phosphate และ Alcohol ซึ่ง Phospholipid แต่ละชนิดจะมีโครงสร้างของ Alcohol ต่างกัน ส่วนที่มีขั้วได้แก่ส่วน Phosphate และ Alcohol ส่วนที่ไม่มีขั้วได้แก่ ส่วน Long Chain Hydrocarbon ของ Fatty acid Phospholipid ที่พบในเยื่อเซลล์ส่วนมากได้แก่ Phosphatidylcholine, Sphingomyeline และ Phosphatidylethanolamine ส่วน Cerebroside จะมีอยู่มากในเยื่อเซลล์ประสาท



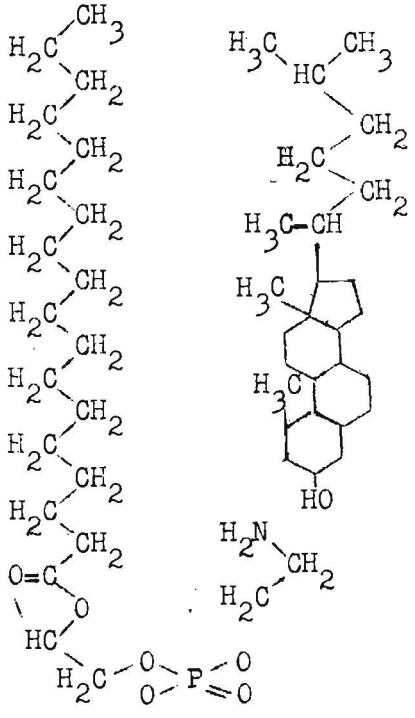
รูปที่ 1. สูตรโครงสร้างทั่วไปของ Phospholipid

Cholesterol ได้แก่ Neutral Lipid ชนิดที่พบมากที่สุดในเยื่อเซลล์ เป็นสารไขมันพวกสเตอรอยด์ที่มีคุณสมบัติเป็น Alcohol



รูปที่ 2. สูตรโครงสร้างของ Cholesterol

Cholesterol จะเรียงตัวแทรกรวมอยู่กับ Phosph olipid โดย Phospholipid จะเรียงตัวอยู่ในรูป J. ซึ่งส่วนของ Polar Head Group จะโค้งไปจับกับ Hydroxy Group ของ cholesterol ด้วย Ionic Interaction ส่วน Hydrocarbon Long Chain จะจับกับส่วน Steroid Nucleus และ Aliphatic Tail ที่เกาะกับ Carbon 17 ของ Cholesterol แล้วส่วน Phosphate Group ของ Phospholipid จะรวมตัวกับ Hydrophilic Side Chain ของโปรตีนด้วย Electrostatic Interaction[12]



รูปที่ 3. การจับรวมกันของ Phosphatidylethanolamine กับ Cholesterol[12]

การมีปฏิกิริยานี้มีผลทำให้เยื่อเซลล์มีความคงตัว จำกัดการเคลื่อนไหวของ Hydrocarbon Chain ของ Phospholipid และลดการยอมให้สารผ่านของเยื่อเซลล์

โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน ซึ่งมีประมาณ 20 ชนิดต่อกันด้วย Peptide Bond โปรตีนแต่ละชนิดแตกต่างกันตามชนิดและการเรียงตัวต่อกันของกรดอะมิโน เยื่อเซลล์ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับขบวนการย่อยหลายอย่างและขบวนการขนส่ง อาจแบ่งโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อเซลล์ได้เป็น 2 ชนิดคือ

1. โปรตีนเปลือกหรือโปรตีนผิว (Extrinsic หรือ Peripheral Protein) หมายถึงโปรตีนที่จับอยู่ด้านนอกของเยื่อเซลล์ มักจะเป็นโปรตีนที่ละลายในน้ำได้ดี สามารถสกัดออกจากเยื่อเซลล์ได้ด้วยขบวนการง่าย ๆ โดยใช้สารละลายเกลือบางชนิด

2. โปรตีนแกนหรือโปรตีนฝังใน (Intrinsic หรือ Integral Protein) หมายถึงโปรตีนที่เป็นก้อน (globular Protein) ประกอบอยู่ภายในชั้นของไขมัน โดยอาจมีบางส่วนโผล่ออกมาจากผิวด้านใดด้านหนึ่ง หรือทั้งสองด้าน ส่วนที่ฝังในชั้นของไขมันจะมีลักษณะ Hydrophobic แต่ส่วนที่อยู่ด้านผิวจะมีลักษณะ Polar ดังนั้นจึงจัดได้ว่าโปรตีนเหล่านี้มีลักษณะเป็น Amphipathic มักละลายในน้ำไม่ได้ดีนัก จะสกัดออกจากเยื่อเซลล์ได้ยาก ต้องใช้สารละลายที่มี Detergent เช่น Sodium Dodecylsulfate หรือ Triton อยู่ด้วย

คาร์โบไฮเดรท ที่ประกอบอยู่ในเยื่อเซลล์ไม่ได้อยู่เป็นอิสระ แต่รวมอยู่กับโปรตีนเป็น glycoprotein หรือรวมกับไขมัน เป็น glycolipid น้ำตาลที่พบในเยื่อเซลล์ได้แก่ D-galactose, D-mannose, N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-D-glycosamine, L-fucose และ Sialic Acid คาร์โบไฮเดรทเหล่านี้ยื่นออกมาจากผิวเซลล์ด้านนอก ไม่มีความสำคัญในโครงสร้างของเยื่อเซลล์มากนัก แต่มีความสำคัญในหน้าที่อื่น เช่น เป็นตัวกันโปรตีนให้อยู่ในเยื่อเซลล์ไม่ให้เคลื่อนกลับเข้าไปในไซโทพลาสซึม

ลักษณะโครงสร้างของเยื่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ที่เป็นที่ยอมรับกันมาจนถึงปัจจุบันนี้ก็คือ เยื่อเซลล์ประกอบด้วยโมเลกุลของไขมันเรียงตัวเป็นสองชั้น ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย Phospholipid และ Cholesterol ส่วนโปรตีนที่ประกอบเป็นเยื่อเซลล์มีหลายชนิดขึ้นกับชนิดของเยื่อเซลล์นั้น ซึ่งจากการศึกษาด้วย Electron Microscope และ X-ray Diffraction สนับสนุนว่า โปรตีนมีการเรียงตัวในลักษณะคลุมอยู่ด้านนอกของชั้นไขมันทั้งสองด้าน จะทำให้เยื่อเซลล์มีความหนาใกล้เคียงกับเยื่อเซลล์ธรรมชาติมากที่สุด โปรตีนที่คลุมอยู่อาจอยู่ในลักษณะกลม (globular) หรือเป็นแผ่น (Lamellar) ก็ได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของเยื่อเซลล์ที่มันคลุมอยู่ มีโปรตีนบางส่วนแทรกอยู่ในชั้นของไขมันไปตลอดความหนา ทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องทางผ่าน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เยื่อเซลล์นอกจากจะเป็นแผ่นที่กั้นระหว่างภายนอกและภายในเซลล์แล้ว ยังมีหน้าที่เป็นตัวควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่าง ๆ เยื่อเซลล์จึงมีความสำคัญในการติดต่อระหว่างเซลล์หรือสิ่งแวดล้อมภายนอก โดยเป็นตัวรับสัญญาณจากเซลล์อื่นหรือภายนอกเพื่อสั่งให้เกิดปฏิกิริยาบางอย่างภายในเซลล์หรือเพื่อถ่ายทอดต่อไปยังเซลล์อื่น ๆ ดังนั้นเยื่อเซลล์จึงอาจจะถือได้ว่าเป็นส่วนที่สำคัญที่สุดของสิ่งมีชีวิต การทำหน้าที่ต่าง ๆของเยื่อเซลล์ขึ้นกับส่วนประกอบและโครงสร้างภายในเยื่อเซลล์ ถ้าหากโครงสร้างเปลี่ยนไป คุณสมบัติของเยื่อเซลล์ก็จะเปลี่ยนไปด้วย พบว่ายาและสารเคมีหลายชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยากับเยื่อเซลล์ (7,17,20) ดังนั้นการศึกษาถึงยาและสารเคมีต่าง ๆ ที่ร่างกายได้รับเข้าไปว่าจะมีผลต่อส่วนประกอบของเยื่อเซลล์อย่างไรบ้างจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ เพราะอาจไปมีผลทำให้ลักษณะและโครงสร้างของเยื่อเซลล์ผิดไปจากเดิม ซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคร้ายแรงบางชนิดได้

การศึกษาเกี่ยวกับเยื่อเซลล์นั้นเป็นการยากลำบากในการที่จะนำเอาเยื่อเซลล์ธรรมชาติมาศึกษา จึงได้มีการคิดสร้างเยื่อเซลล์ขึ้นมาให้มีส่วนประกอบและโครงสร้างใกล้เคียงกับเยื่อเซลล์จริงมากที่สุด แล้วตรวจสอบคุณสมบัติที่ต้องการทราบด้วยวิธีต่าง ๆ ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับเยื่อเซลล์ธรรมชาติ Monomolecular film เป็นรูปแบบเยื่อเซลล์ที่มีผู้นิยมนำมาศึกษาถึงปฏิกิริยาของยาและสารเคมีต่าง ๆ ต่อส่วนประกอบของเยื่อเซลล์กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนในการทดลองและง่ายในการศึกษาและแปลผลดังที่ Schulman (4,7,17) ได้กล่าวว่ารูปแบบนี้ถึงแม้จะไม่ได้เป็นรูปแบบที่แท้จริงของเยื่อเซลล์ธรรมชาติ แต่ก็มีความหมายในการศึกษาถึงระดับโมเลกุล ซึ่งเป็นสารประกอบในเยื่อเซลล์ และสามารถนำผลที่ได้ไปใช้กับเยื่อเซลล์จริงได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ Monomolecular Film ในการที่จะศึกษาหาความเข้มข้นที่พอเหมาะของ Desomedine ในการมีฤทธิ์เป็นยาฆ่าเชื้อโดยไม่ทำให้เยื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง

บทที่ 2.

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 เคมีภัณฑ์

2.1.1.1 Desomedine (Rhone-Poulene S.A.)

2.1.1.2 Cholesterol (E. Merck)

2.1.1.3 Egg Lecithin (E. Merck)

2.1.1.4 Bovine Serum Albumin (Sigma)

2.1.1.5 Monosodium Dihydrogen Phosphate (Carlo Erba)

2.1.1.6 Disodium Hydrogen Phosphate (Mallinckrodt)

2.1.1.7 N-Hexane (J.T. Baker Chemical LTD.)

2.1.1.8 Potassium Dichromate (May-Baker LTD.)

2.1.1.9 Sulfuric Acid (May-Baker LTD.)

2.1.1.10 Tridistilled Water (องค์การเภสัชกรรม)

2.1.1.11 Absolute Alcohol (องค์การเภสัชกรรม)

2.1.2 เครื่องมือ

2.1.2.1 Surface Tensiometer (Biolar Coorporation)

2.1.2.2 Teflon Coated Trough with Movable Barrier (CAHN Instrument)

2.1.2.3 Agla Micrometer Syringe (Wellcome Reagent Limited)

2.1.2.4 Suction Pump. (Tokyo Shibaura Electric Co. LTD.)

2.2 วิธีการวิจัย

2.2.1 หาค่าแรงตึงผิวของน้ำกลั่น 3 ครั้ง pH 5.9

2.2.1.1 เตรียมน้ำกลั่น 3 ครั้ง pH 5.9 โดยใช้ Sorensen's Phosphate Buffer[3,10]

2.2.1.2 วัดแรงตึงผิวของน้ำกลั่น 3 ครั้ง โดยใช้ Wilhelmy Plate Method [1,5,13,15-16]

การวัดแรงตึงผิวใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Surface Tensiometer ซึ่งประกอบด้วย Torsion Balance และมี Platinum Blade แขวนติดอยู่ บรรจุน้ำที่ต้องการจะวัดแรงตึงผิวลงในถาดให้เต็มพอดี ปรับระดับน้ำโดยใช้ suction pump. ถาดนี้สามารถเปลี่ยนแปลงพื้นที่ของผิวหน้าได้ตามต้องการด้วย movable barrier ปรับ Platinum Blade ให้จุ่มลงในน้ำ โดยขอบบนอยู่ใต้ผิวน้ำพอดี ซึ่งเข็มที่หน้าปัทม์ของ Torsion Balance จะอยู่ตรงขีดที่กำหนด ณ จุดนี้จะต้องปรับค่าแรงตึงผิวบนหน้าปัทม์ให้เป็นศูนย์ด้วย เมื่อต้องการจะวัดแรงตึงผิวให้หย่อย ๆ เพิ่มค่าที่หน้าปัทม์ ขณะเดียวกัน Platinum Blade จะถูกยกขึ้นจากน้ำ เข็มซึ่งเป็นตัวปรับระดับของ Platinum Blade จะเคลื่อนขึ้นอย่างช้า ๆ เมื่อ Platinum Blade ถูกยกขึ้นจากน้ำจนกระทั่งขอบบนถูกยกขึ้นเหนือผิวน้ำ เข็มจะเคลื่อนเร็วขึ้นกว่าเดิม ที่จุดนี้ค่าที่อ่านได้จากหน้าปัทม์จะเป็นค่าแรงตึงผิวของน้ำซึ่งมีหน่วยเป็น Milligram เมื่อคูณด้วย 0.198 จะได้ค่าที่มีหน่วยเป็น dyne/cm. เครื่องมือนี้สามารถวัดแรงตึงผิวที่เปลี่ยนแปลงได้ 0.0396 dyne/cm.

2.2.2 การเตรียมสารที่ใช้ในการสร้างเยื่อเซลล์ [19]

2.2.2.1 Egg Lecithin Solution

ละลาย Egg Lecithin 5 mg. ใน n-Hexane 25 ml. ต้องใช้สารละลายนี้ 0.026887 ml. ต่อพื้นที่ถาด 6.08×10^{17} A^{o2} ซึ่งจะเรียงตัวเต็มถาดในลักษณะ Monomolecular Film พอดี

2.2.2.2 Cholesterol Solution

ละลาย Cholesterol 5 mg. ใน n-Hexane 25 ml. ต้องใช้สารละลายที่ 0.0195235 ต่อพื้นที่ถาด 6.08×10^{17} A^{o2} ซึ่งจะเรียงตัวเต็มถาดในลักษณะ Monomolecular Film พอดี

053254

2.2.2.3 Bovine Serum Albumin Solution

ละลาย Bovine Serum Albumin 10 mg. ในน้ำกลั่น 3 ครั้ง 25 ml. ต้องใช้สารละลายนี้ 0.0152 ml. ต่อพื้นที่ถาด 6.08×10^{17} A^{o2} ซึ่งจะเรียงตัวเต็มถาดในลักษณะ Monomolecular Film พอดี

2.2.3 การสร้างเยื่อเซลล์

ใช้หลักการสร้างเยื่อเซลล์ของ Langmuir[1,8-9,11] โดยทดสอบความสะอาดของผิวน้ำด้วยการวัดแรงดึงผิวของน้ำในพื้นที่ผิว 100 % และ 30 % ค่าที่วัดได้จะต้องเท่ากัน [19] ใช้ Agla Micrometer Syringe ในการหยดสารละลายที่เตรียมไว้ดังในข้อ 2.2.2 เวลาหยดให้ถือ Micrometer Syringe สูงเหนือผิวน้ำประมาณ 2-3 และหยดลงอย่างช้า ๆ [8,19] ขณะเดียวกันนี้ Platinum Blade ต้องอยู่ใต้ผิวน้ำ

สำหรับการคำนวณปริมาตรของสารละลายที่ใช้จาก Micrometer Syringe นั้น สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$20M = V$$

M = ค่าที่อ่านได้จาก Micrometer Syringe

V = ปริมาตรของสารละลายเป็น Microliter

ดังนั้นเมื่อจะใช้ Egg Lecithin Solution จำนวน 0.02688 ml. จะต้องใช้ Micrometer Syringe 1.344 ช่อง หรือหมุน Holder ไป 2 รอบกับอีก 34.4 ขีด เนื่องจาก 1 รอบ มีปริมาตรสารละลายเท่ากับ 10 μl ซึ่งใช้คำนวณปริมาตรสารละลายอื่น ๆ ก็เป็นไปในทำนองเดียวกัน หลังจากหยดสารละลายลงไปแล้วทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้ n-Hexane ระเหยออกหมด และ Egg Lecithin เรียงตัวเป็นระเบียบค่อย ๆ ลดพื้นที่ถาดโดยใช้ Movable Barrier ในแต่ละพื้นที่วัดค่าแรงดึงผิว 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย ลดพื้นที่ถาดจนกระทั่งค่าแรงดึงผิวไม่เปลี่ยนแปลงหรือลดลง แสดงว่าฟิล์มจะเรียงตัวไม่เป็นระเบียบและเสียไป (Collapsing Point) นำค่าที่วัดได้มาสร้าง π-A curve (Surface Pressure-Surface Area curve) เมื่อ

$\pi = r_o - r$

π = ความดันผิว

r_o = แรงดึงผิวของน้ำ

r = แรงดึงผิวที่วัดได้ใน System

สร้างเยื่อเซลล์โดยใช้ Egg Lecithin, Cholesterol และ Bovine Serum Albumin ในอัตราส่วน 4:0:4, 1:3:4, 2:2:4 และ 1:3:4

2.2.4 ศึกษาผลของ Desomedine กับเยื่อเซลล์

2.2.4.1 เตรียมสารละลาย Desomedine

ผสม Desomedine ในน้ำกลั่น 3 ครั้ง ให้มีความเข้มข้น 0.1 %, 0.2 %, 0.5 %, 1.0 %, 1.5 % และ 2.0 %

2.2.4.2 ศึกษาผลของ Desomedine กับเยื่อเซลล์

สร้างเยื่อเซลล์ตามข้อ 2.2.3 บนน้ำกลั่น 3 ครั้ง pH 5.9 แล้วหยด Desomedine ในแต่ละระดับความเข้มข้นลงบนเยื่อเซลล์ 0.5 ml. ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้ววัดค่าแรงตึงผิวในแต่ละพื้นที่เปลี่ยนแปลง นำค่าที่ได้มาสร้าง π-A curve เปรียบเทียบกับ π-A curve ของเยื่อเซลล์ที่ไม่มี Desomedine ใน System เดียวกัน

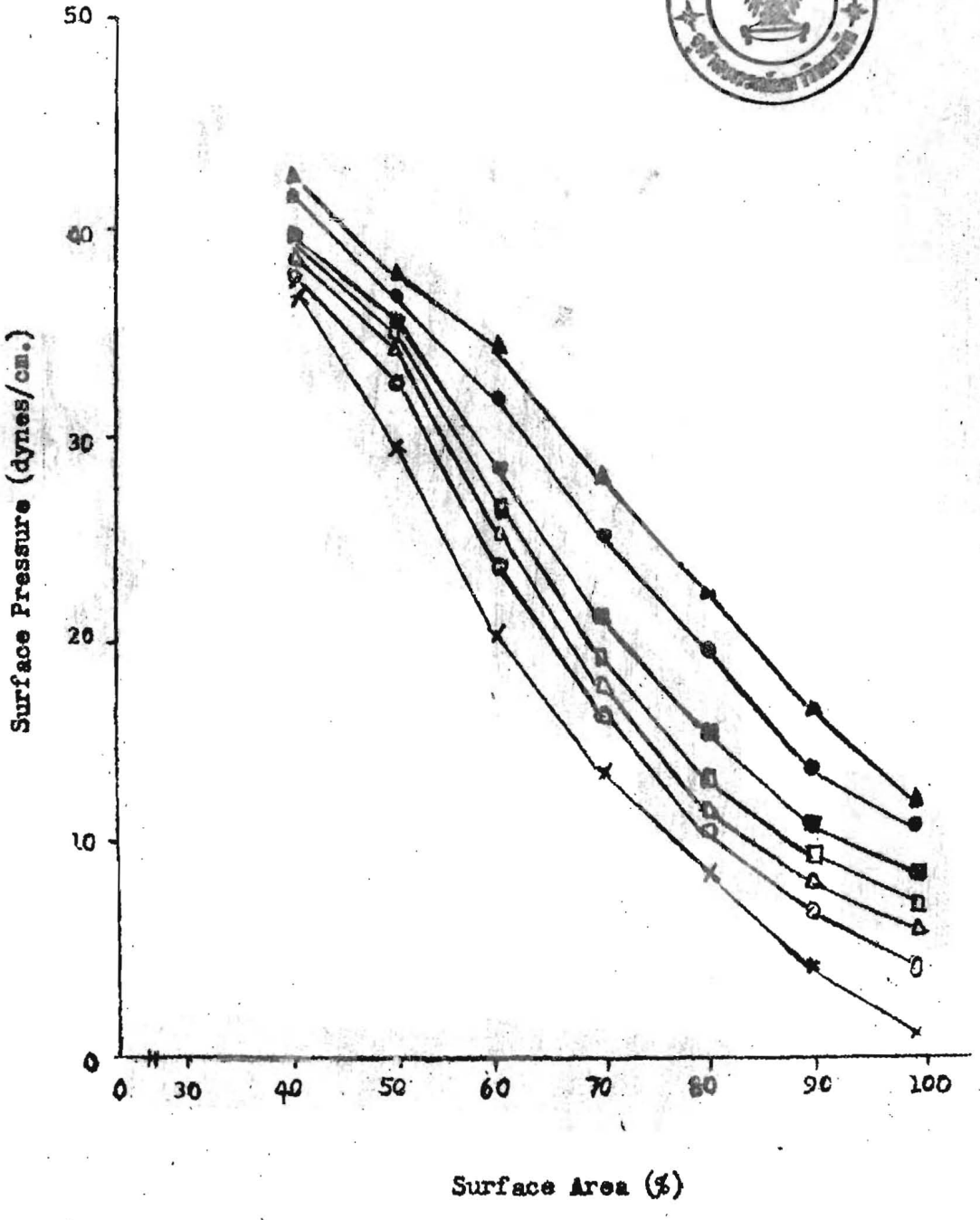
บทที่ 3.

ผลการวิจัย

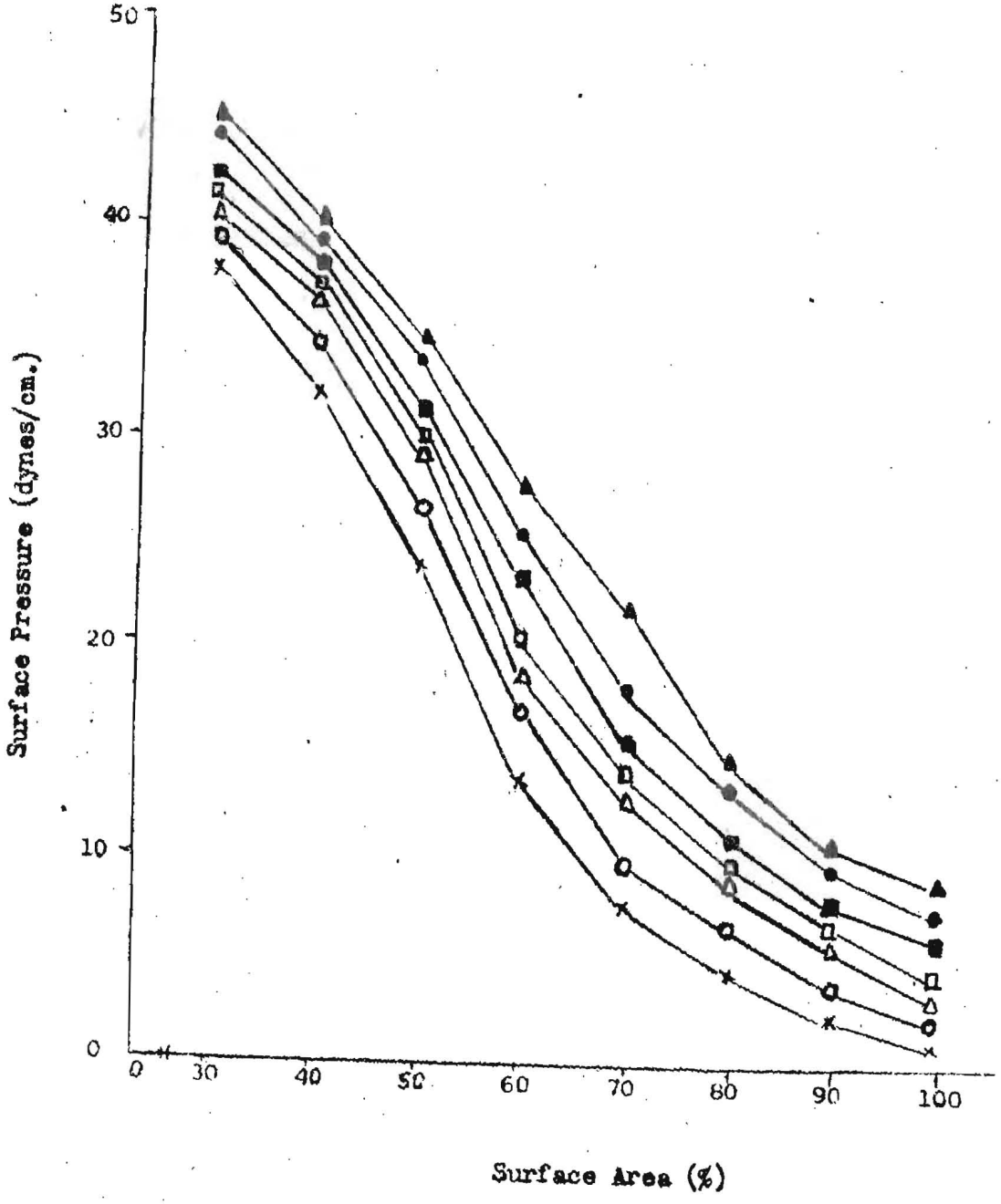
3.1 ผลการซึมผ่านและปฏิกิริยาของ Desomedine ระดับความเข้มข้น 0.1 %, 0.2 %, 0.5 %, 1.0 %, 1.5 % และ 2.0 % ต่อส่วนประกอบของ Egg Lecithin และ Cholesterol ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่ pH 5.9

รูปที่ 4 เมื่ออัตราส่วน Egg Lecithin : Cholesterol = 4:0 Desomedine ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.2 % และ 0.5 % จะไม่เกิดปฏิกิริยากับ Egg Lecithin เลย ส่วนระดับความเข้มข้น 1.0 %, 1.5 % และ 2.0 % จะเกิดปฏิกิริยากับ Egg Lecithin และปฏิกิริยามากน้อยจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ Desomedine ที่เพิ่มขึ้น

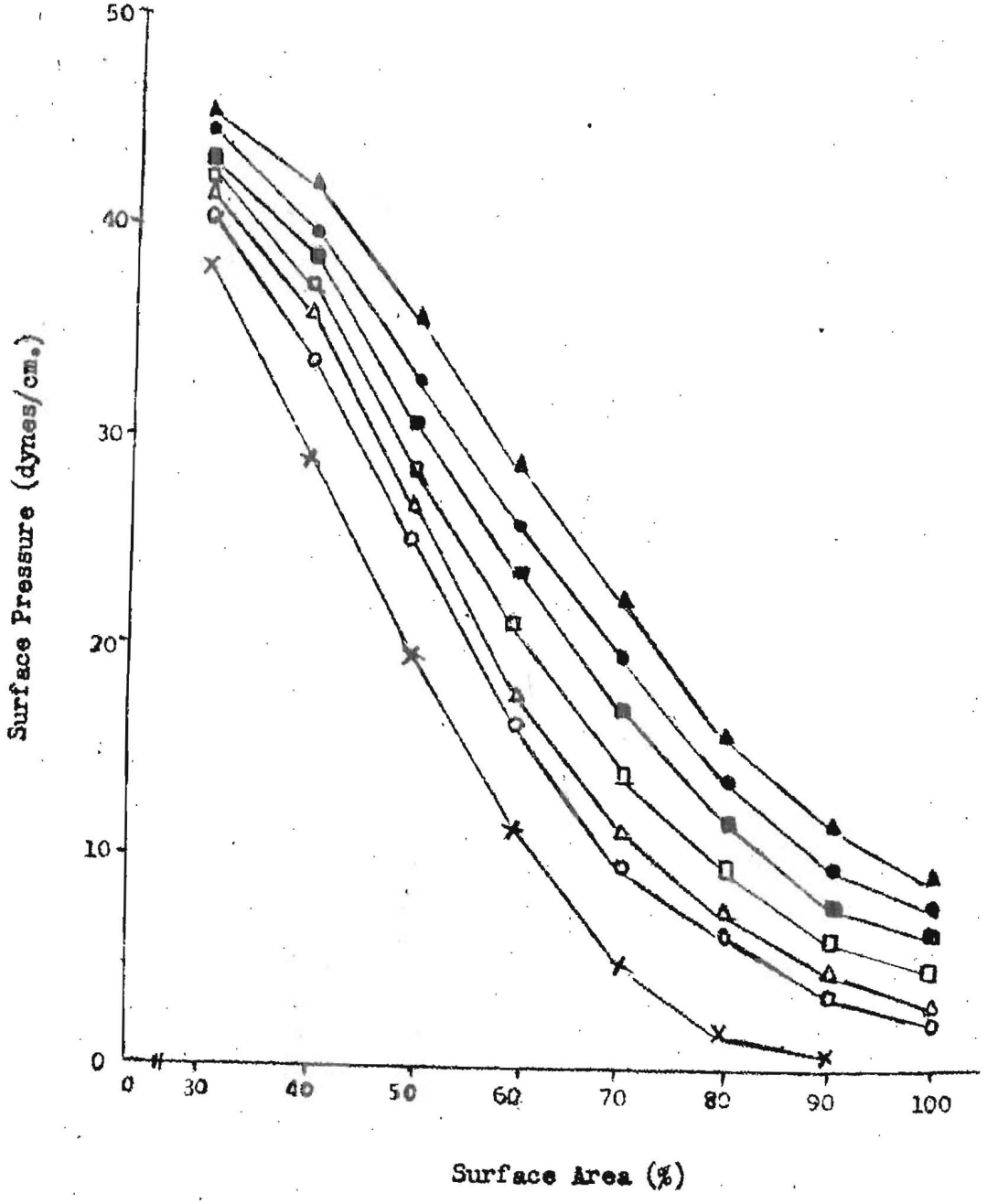
เมื่ออัตราส่วน Egg Lecithin : Cholesterol = 3:1, 2:2 และ 1:3 Desomedine ในทุกระดับความเข้มข้นจะมีการซึมผ่านน้อยลง และเกิดปฏิกิริยามากขึ้น โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามระดับความเข้มข้นเช่นกัน ซึ่งในอัตราส่วน Egg Lecithin : Cholesterol = 1:3 Desomedine ระดับความเข้มข้น 2.0 % จะเกิดปฏิกิริยาโดยไม่สามารถซึมผ่านได้เลย ดังแสดงในรูปที่ 5, 6 และ 7 ตามลำดับ



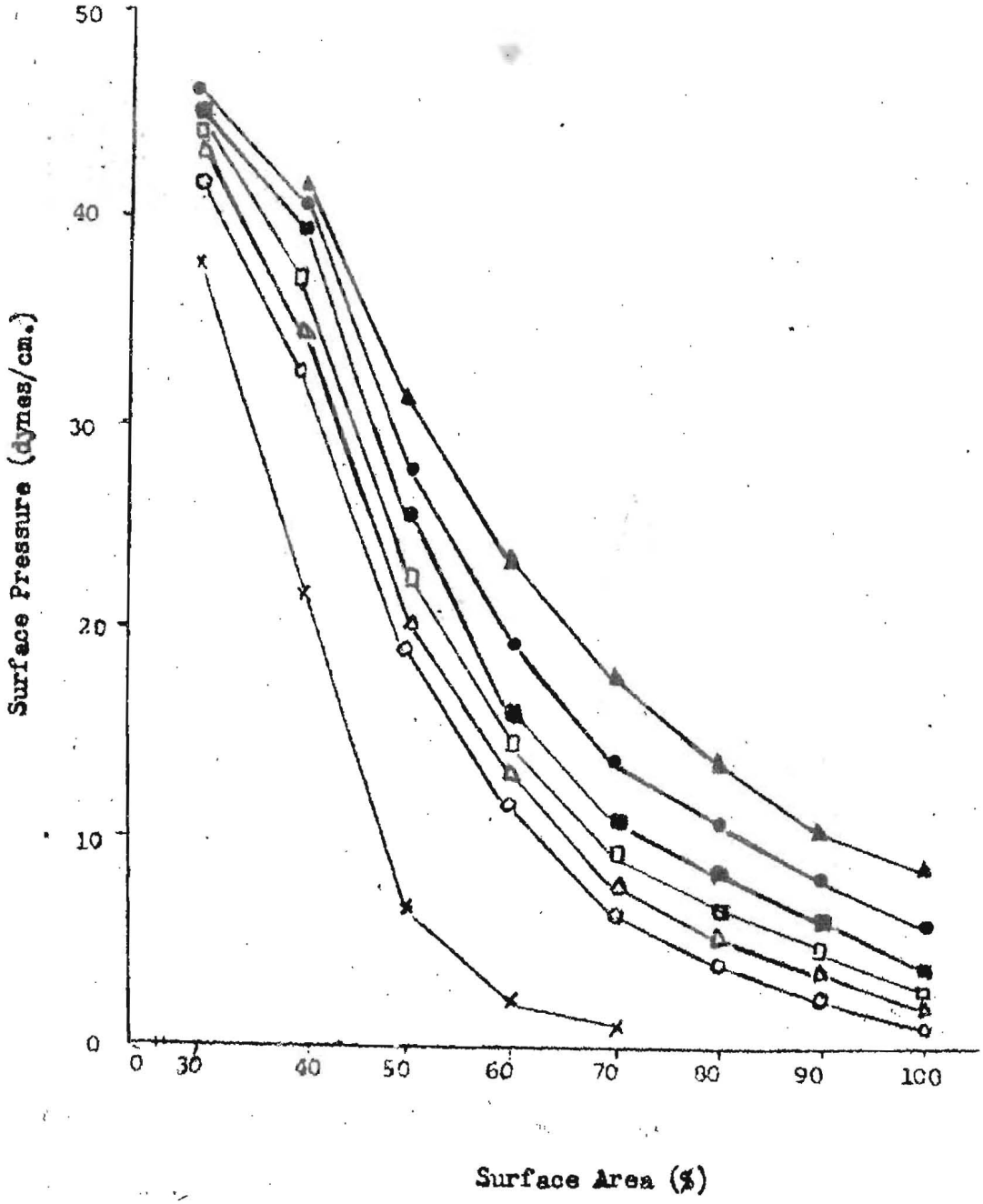
รูปที่ 4. Surface Pressure-Surface Area (π -A) curves ของ Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin อัตราส่วน 4:0:0 pH 5.9 เมื่อไม่มี Desomedine (X) เมื่อมี Desomedine 0.1 % (0), 0.2 % (△), 0.5 % (□), 1.0 % (■), 1.5 % (●) และ 2.0 % (▲)



รูปที่ 5. Surface Pressure-Surface Area (π-A) curves ของ Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin อัตราส่วน 3:1:0 pH 5.9 เมื่อไม่มี Desomedine (X), เมื่อมี Desomedine 0.1 % (0), 0.2 % (△), 0.5 % (□), 1.0 % (■), 1.5 % (●) และ 2.0 % (▲)



รูปที่ 6. Surface Pressure-Surface Area (π-A) curves ของ Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin อัตราส่วน 2:2:0 ที่ pH 5.9 เมื่อไม่มี Desomedine (X), เมื่อมี Desomedine 0.1 % (○), 0.2 % (△), 0.5 % (□), 1.0 % (■), 1.5 % (●) และ 2.0 % (▲)



รูปที่ 7. Surface Pressure-Surface Area (π -A) curves ของ Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin อัตราส่วน 1:3:0 ที่ pH 5.9 เมื่อไม่มี Desomedine (X), เมื่อมี Desomedine 0.1 % (○), 0.2 % (△), 0.5 % (□), 1.0 % (■), 1.5 % (●) และ 2.0 % (▲)

ตารางที่ 1.

สรุปผลการซึมผ่านและปฏิกิริยาของ Desomedine ต่อเยื่อเซลล์ที่ pH 5.9

(Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin = 4:0:0, 3:1:0, 2:2:0 และ 1:3:0)

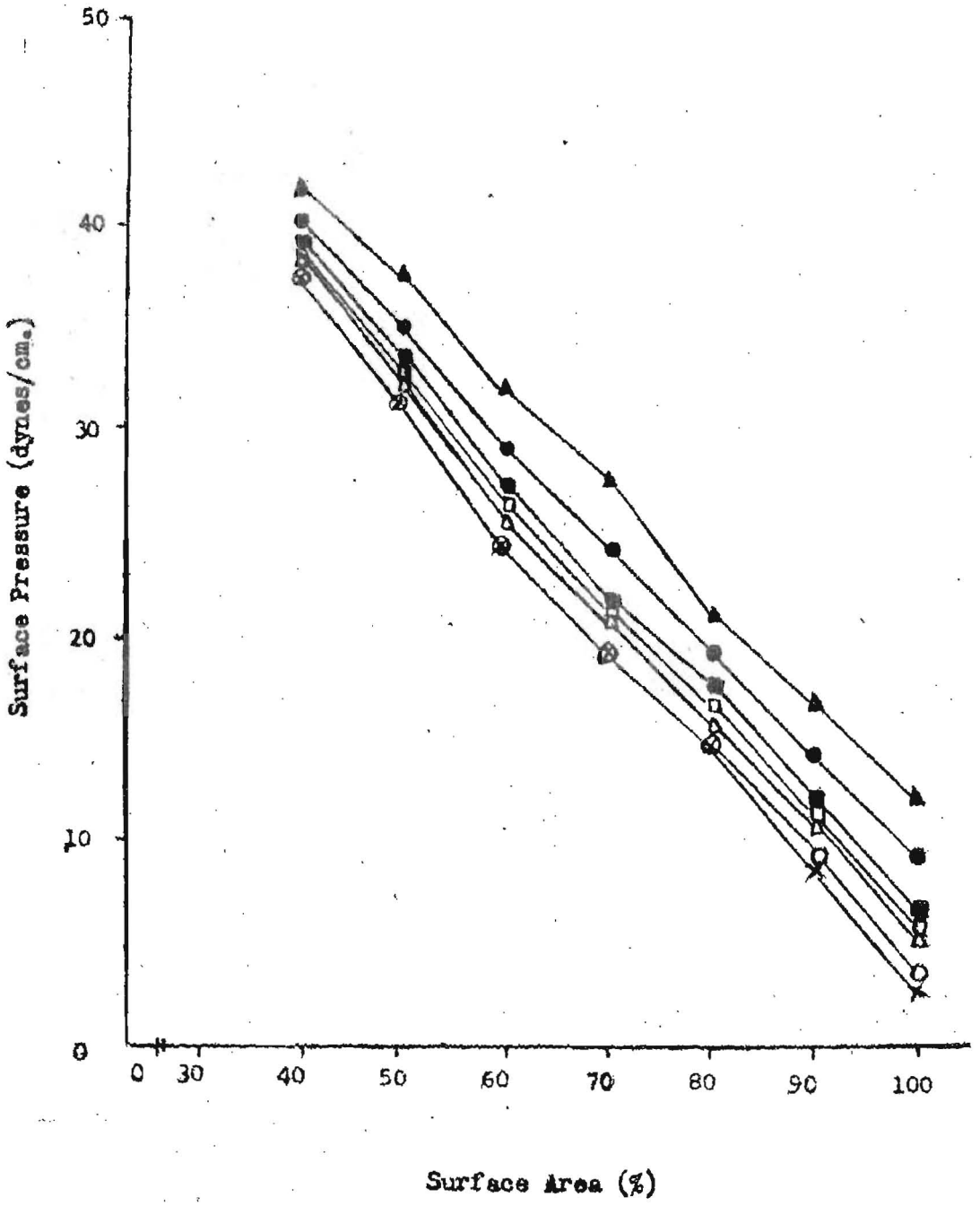
อัตราส่วนของ E.L:Chol:B.S.A.	ความเข้มข้นของ Desomedine (%)	ค่า Π ที่ Surface Area 100 % (dynes/cm.)	ค่า Π ที่จุด Film Collapse (dynes/cm.)	Surface Area ที่จุด Film Collapse
4:0:0	0	0.97	37.83	40
	0.1	4.30	38.02	40
	0.2	5.72	38.54	40
	0.5	6.91	38.96	40
	1.0	8.52	40.20	40
	1.5	11.29	41.65	40
	2.0	12.18	42.51	40
3:1:0	0	0.78	38.23	30
	0.1	2.19	39.50	30
	0.2	2.95	40.57	30
	0.5	4.07	41.32	30
	1.0	5.90	43.20	30
	1.5	7.09	44.35	30
	2.0	8.51	45.27	30
2:2:0	0	0	38.19	30
	0.1	2.18	40.65	30
	0.2	2.82	41.59	30
	0.5	4.10	42.51	30
	1.0	6.53	43.36	30
	1.5	7.72	44.38	30
	2.0	9.11	45.41	30
1:3:0	0	0	30.92	30
	0.1	0.98	41.81	30
	0.2	1.72	43.08	30
	0.5	2.69	44.12	30
	1.0	3.75	45.24	30
	1.5	5.60	45.96	30
	2.0	8.43	40.24	40

3.2 ผลการซึมผ่านและปฏิกิริยาของ Desomedine ระดับความเข้มข้น 0.1 %, 0.2 %, 0.5 %, 1.0 %, 1.5 % และ 2.0 % ต่อเยื่อเซลล์ที่สร้างจาก Egg Lecithin, Cholesterol และ Bovine Serum Albumin ในอัตราส่วนต่าง ๆ ที่ pH 5.9 ดังแสดงในรูปที่ 8, 9, 10 และ 11

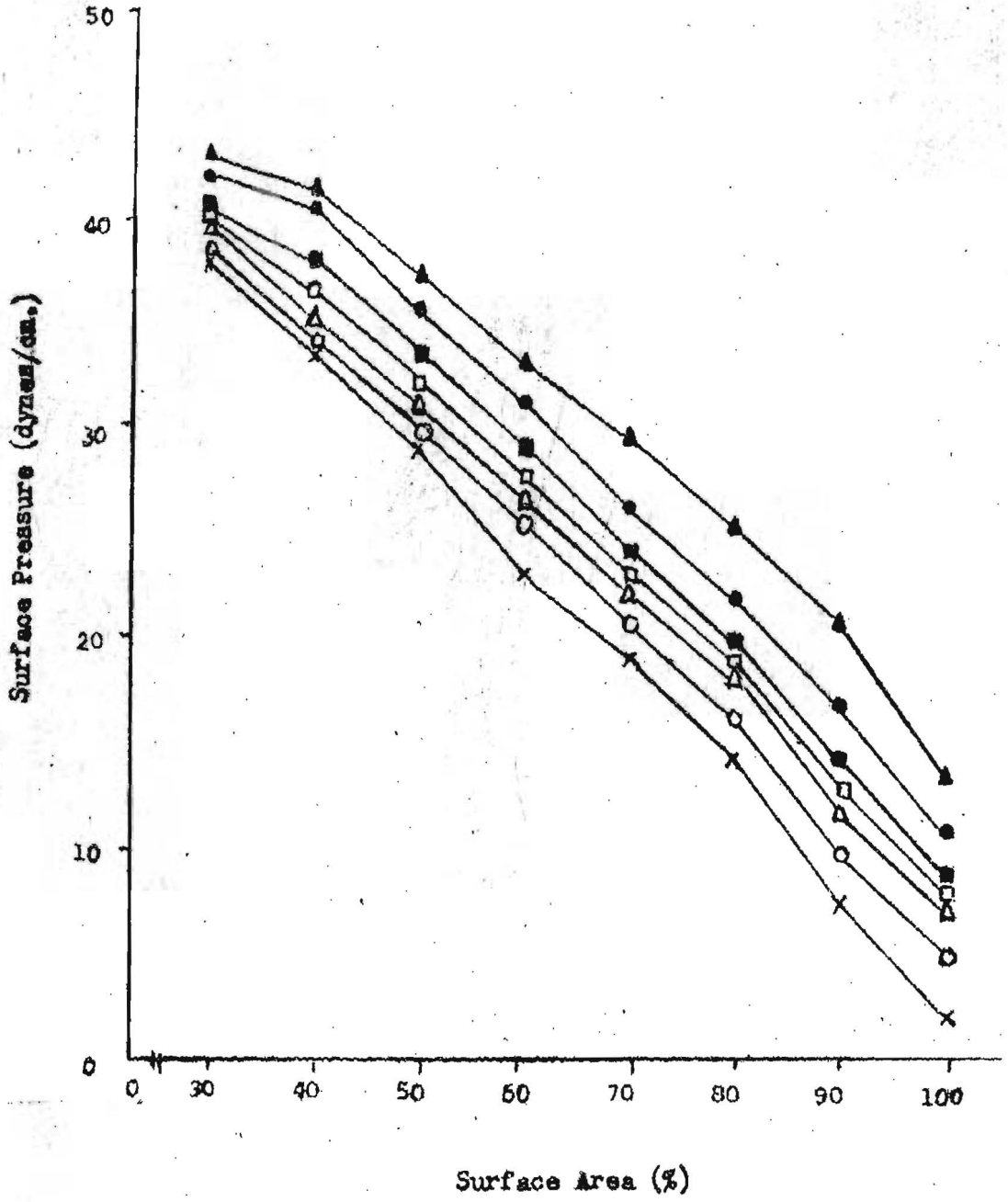
Desomedine ระดับความเข้มข้น 0.1 % สามารถซึมผ่านได้ดีในทุกอัตราส่วนโดยไม่เกิดปฏิกิริยากับเยื่อเซลล์เลย

Desomedine ระดับความเข้มข้น 0.2 % สามารถซึมผ่านได้ดีโดยไม่เกิดปฏิกิริยากับเยื่อเซลล์เลยในอัตราส่วน Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin = 4:0:4 และในอัตราส่วนอื่น ๆ การซึมผ่านจะน้อยลงแต่จะเกิดปฏิกิริยากับเยื่อเซลล์

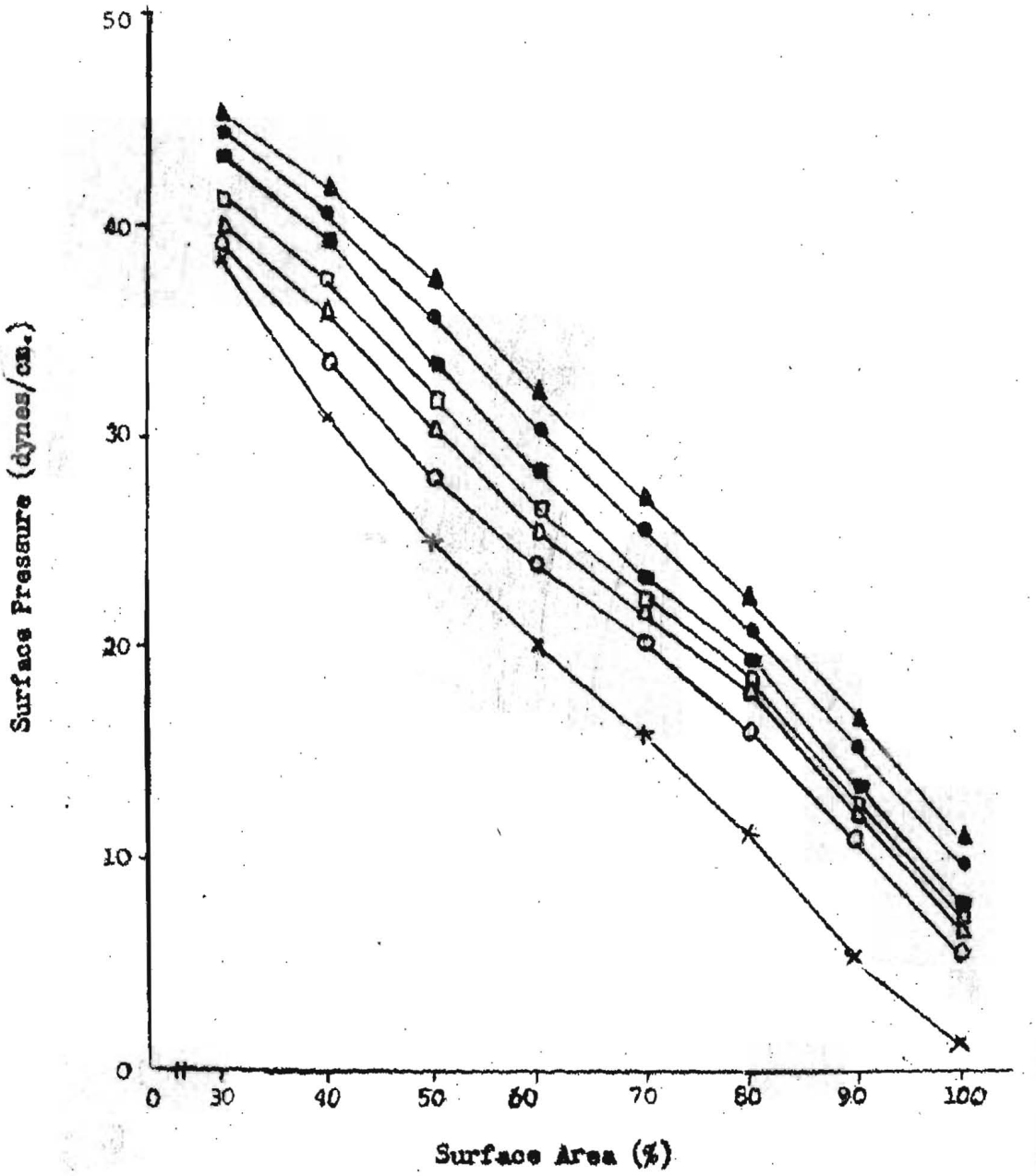
Desomedine ระดับความเข้มข้น 0.5 %, 1.0 %, 1.5 % และ 2.0 % จะมีการซึมผ่านน้อยลงและเกิดปฏิกิริยากับเยื่อเซลล์มากขึ้นในทุกอัตราส่วนของเยื่อเซลล์ โดยปฏิกิริยาที่เกิดจะแปรผันตามระดับความเข้มข้นของ Desomedine ซึ่ง Desomedine ระดับความเข้มข้น 2.0 % จะเกิดปฏิกิริยากับเยื่อเซลล์ที่มีอัตราส่วน Egg Lecithin : Cholesterol: Bovine Serum Albumin = 1:3:4 โดยไม่สามารถซึมผ่านเยื่อเซลล์ได้เลย



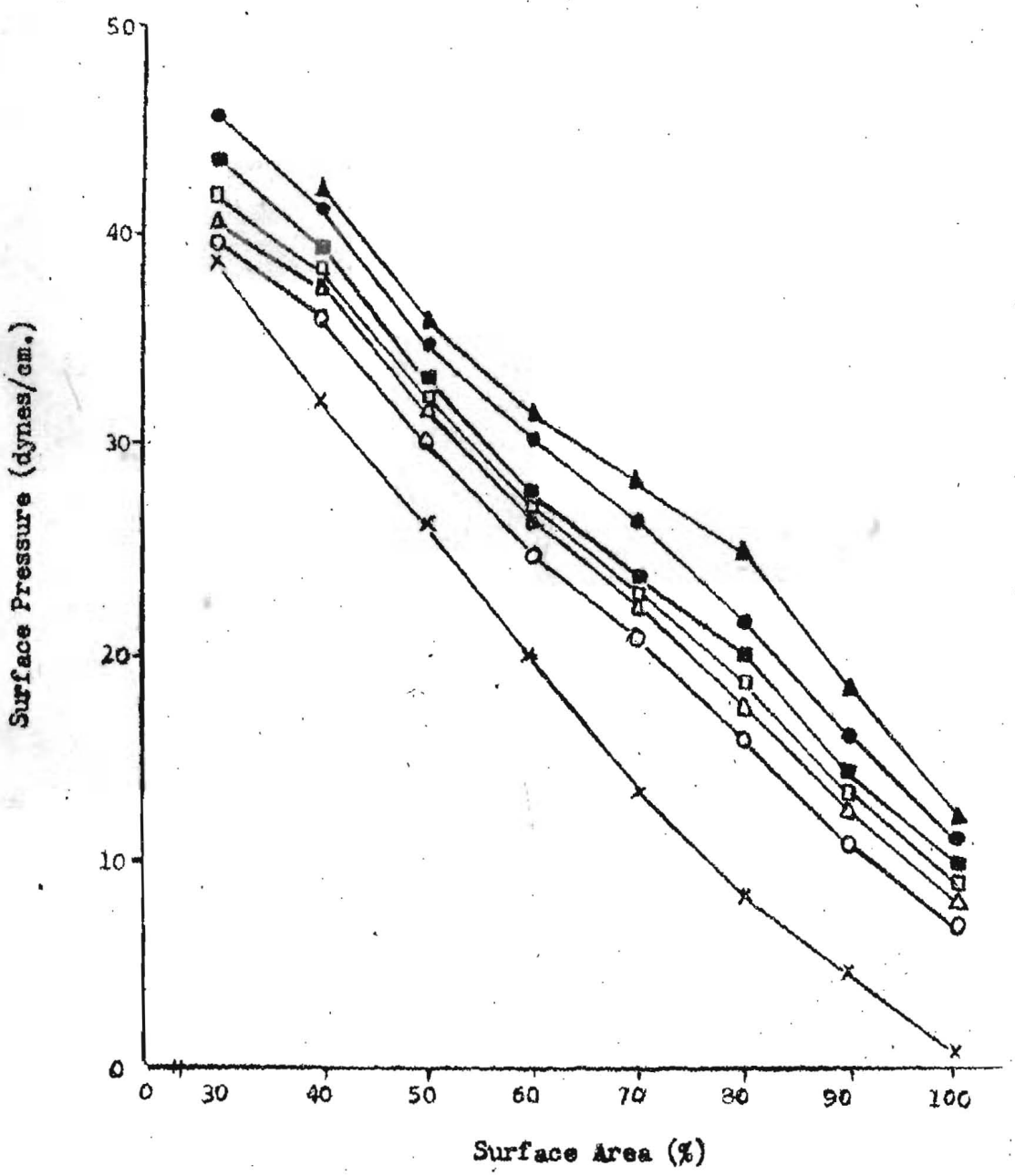
รูปที่ 8. Surface Pressure-Surface Area (π-A) curves ของ Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin อัตราส่วน 4:0:4 ที่ pH 5.9 เมื่อไม่มี Desomedine (X), เมื่อมี Desomedine 0.1 % (O), 0.2 % (△), 0.5 % (□), 1.0 % (■), 1.5 % (●) และ 2.0 % (▲)



รูปที่ 9. Surface Pressure-Surface Area (π-A) curves ของ Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin อัตราส่วน 3:1:4 ที่ pH 5.9 เมื่อไม่มี Desomedine (X), เมื่อมี Desomedine 0.1 % (○), 0.2 % (△), 0.5 % (□), 1.0 % (■), 1.5 % (●) และ 2.0 % (▲)



รูปที่ 10. Surface Pressure-Surface Area (π -A) curves ของ Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin อัตราส่วน 2:2:4 ที่ pH 5.9 เมื่อไม่มี Desomedine (X), เมื่อมี Desomedine 0.1 % (○), 0.2 % (△), 0.5 % (□), 1.0 % (■), 1.5 % (●) และ 2.0 % (▲)



รูปที่ 11. Surface Pressure-Surface Area (π -A) curves ของ Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin อัตราส่วน 1:3:4 ที่ pH 5.9 เมื่อไม่มี Desomedine (X), เมื่อมี Desomedine 0.1 % (0), 0.2 % (△), 0.5 % (□), 1.0 % (■), 1.5 % (●) และ 2.0 % (▲)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.

สรุปผลการซึมผ่านและปฏิกิริยาของ Desomedine ต่อเยื่อเซลล์ที่ pH 5.9

(Egg Lecithin : Cholesterol : Bovine Serum Albumin = 4:0:4, 3:1:4, 2:2:4 และ 1:3:4)

อัตราส่วนของ E.L:Chol:B.S.A	ความเข้มข้นของ Desomedine (%)	ค่า π ที่ Surface Area 100 % (dynes/cm.)	ค่า π ที่จุด Film Collapse (dynes/cm.)	Surface Area ที่จุด Film Collapse
4:0:4	0	2.55	37.40	40
	0.1	3.34	37.75	40
	0.2	6.12	37.90	40
	0.5	6.40	38.60	40
	1.0	6.89	39.38	40
	1.5	9.03	40.15	40
	2.0	12.08	41.67	40
3:1:4	0	1.79	38.04	30
	0.1	4.74	38.46	30
	0.2	7.35	39.35	30
	0.5	8.01	39.96	30
	1.0	8.87	40.58	30
	1.5	10.48	41.95	30
	2.0	13.45	43.60	30
2:2:4	0	1.36	38.63	30
	0.1	5.53	38.78	30
	0.2	6.19	40.16	30
	0.5	7.05	41.35	30
	1.0	7.84	43.26	30
	1.5	9.52	44.45	30
	2.0	10.13	45.24	30
1:3:4	0	0.60	38.85	30
	0.1	6.87	39.76	30
	0.2	7.50	40.63	30
	0.5	8.60	42.02	30
	1.0	9.71	43.59	30
	1.5	10.83	45.81	30
	2.0	11.47	42.36	40

บทที่ 4.

การอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาการซึมผ่านและปฏิกิริยาของ Desomedine กับเยื่อเซลล์ผิวหนัง (pH 5.9) พบว่าเมื่อมีเฉพาะ Egg Lecithin นั้น Desomedine ระดับความเข้มข้นต่ำจะซึมผ่านได้ดี แต่ถ้าระดับความเข้มข้นสูงการซึมผ่านจะลดลง และมีปฏิกิริยาเกิดขึ้น เมื่อมี Cholesterol มาประกอบด้วย จะทำให้ Desomedine มีการซึมผ่านน้อยลงและมีปฏิกิริยามากขึ้นตามปริมาณของ Cholesterol ที่เพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มโปรตีนเข้าไปในเยื่อเซลล์ก็ได้ผลเช่นเดียวกันคือถ้ามีเฉพาะ Egg Lecithin และ Bovine Serum Albumin Desomedine ระดับความเข้มข้นต่ำ จะซึมผ่านได้ดี แต่ถ้าระดับความเข้มข้นสูงจะมีปฏิกิริยาเกิดขึ้นและการซึมผ่านลดลง และเมื่อเพิ่ม Cholesterol ลงไปในเยื่อเซลล์จะทำให้มีปฏิกิริยามากขึ้นตามปริมาณของ Cholesterol ที่เพิ่มขึ้น พบว่ามีปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง Desomedine กับส่วนประกอบของเยื่อเซลล์ที่มีแต่ไขมันจะมากกว่ากับเยื่อเซลล์ที่มีทั้งไขมัน และโปรตีน ซึ่งแสดงว่า โปรตีนในเยื่อเซลล์จะช่วยลดปฏิกิริยาของ Desomedine กับไขมันได้บ้าง แต่อย่างไรก็ตามสามารถสรุปได้ว่า Desomedine จะมีปฏิกิริยากับ Cholesterol เป็นส่วนมาก และปฏิกิริยาที่เกิดจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ Desomedine ที่เพิ่มขึ้น การแทรกตัวเข้าไปมีปฏิกิริยาของ Desomedine กับ Cholesterol ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อเซลล์ อาจจะมีผลทำให้โครงสร้างของเยื่อเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากปกติ อันอาจจะก่อให้เกิดความผิดปกติทั้งในแง่โครงสร้างและการซึมซ่านผ่านได้ของเซลล์ ดังผลการวิจัยของ Wein, Harrison และ Freeman[18] ที่ศึกษาผลของ Diamidine ชนิดต่าง ๆ ต่อผิวหนังของหนูตะเภา โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง พบว่ามีผลทำให้เกิด Erythema หรือ Necrosis ขึ้น ซึ่งผลที่ได้ก็สอดคล้องกับรายงานที่พบว่าฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของ Desomedine จะลดลงเมื่อสัมผัสกับผิวหนังเป็นเวลานาน[14] ซึ่งเกิดจากการที่ Desomedine ไปมีปฏิกิริยากับ Cholesterol ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อเซลล์

บทที่ 5.

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยสามารถสรุปได้ดังนี้คือ

1. การซึมผ่านและปฏิกิริยาของ Desomedine กับเยื่อเซลล์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ Desomedine

2. ปฏิกิริยาส่วนใหญ่ของ Desomedine จะเกิดกับ Cholesterol และปฏิกิริยาจะเกิดมากขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ Desomedine

ดังนั้นในการนำ Desomedine มาใช้ในยาและเครื่องสำอางที่ใช้กับผิวหนังควรพิจารณาถึงความเหมาะสม ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่า Desomedine ในระดับความเข้มข้น 0.1 % นั้น ก่อให้เกิดปฏิกิริยากับเยื่อเซลล์น้อยที่สุด และยังคงมีคุณสมบัติเป็นยาฆ่าเชื้อได้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Adamson, Arthur W. Physical Chemistry of Surfaces. New York : Interscience Publishers, 1960.

2. Bernheim, Frederick "The Effect of Propamidine on Bacterial Metabolism." Science 1943; 3;223.

3. Chase, G.D. et al. Remington's Pharmaceutical Sciences, 14th ed. Easton : Mack Publishing 1967.

4. Colocicco, Gluseppe "Applications of monolayer techniques to biological system symptoms of specific lipid-protein interaction" Journal of colloid and Interface Sciences. 1969, 29;345-363.

5. Eggers, D.F. et al. Physical Chemistry. 2nd ed. New York : John Wiley and Sons, 1965.

6. Elson William O "The Antibacterial and Fungistatic Properties of Propamidine". Journal of Infecticus Disease 1945, 76 ; 193-197.

7. Felmeister Alvin "Relationship between surface activity and biological activity of drugs" Journal of Pharmaceutical Sciences 1972, 61; 151-164.

8. Felmeister A. ; Tsia D. ; and Weiner N.D. "Interaction of 3, 4 Benzpyrene with Monomolecular Film." Journal of Pharmaceutical Sciences 1972, 61 : 1065-1068.

9. Langmuir Irving. "The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids." Journal of the American Chemical Society. 1917, 39 ; 1848-1906.

10. Lynch Matthew J. et al. Medical Laboratory Technology and Clinical Pathology. 2nd ed. Philadelphia : W.B. Saunders Company, 1969.

11. Malcolm, B.R. , and Davies, S.R. "A Film Balance for Use with The Langmuir Trough." Journal of Scientific Instrument 1965, 42 ; 359-360.

12. Nystrom, Richard A. Membrane Physiology. New Jersy : Prentice-Hall, 1973.

13. Pike, F. Phillips and Bonnet. Julio C. "The End-Correction in The Wilhelmy Technique for Surface Tension Measurements." Journal of Colloid and Interface Science. 1970, 34 ; 597-605.

14. Rhone-Poulene, S.A. "Standards and Analytical Methods for Hexamidine Diisethionate in Direction Des Recherches Et Du Development." Paris (March 1976) : 1-3, (November 1977) : 1-10.

15. Rose, J. Dynamic Physical Chemistry. London : Sir Isaac Pitman & Sons LTD. ; 1961.

16. Ruch, Theodore C. and Patton, Harry D. Physiology and Biophysic 19th ed. Philadelphia : W.B. Saunders Company. 1965.

17. Weiner Norman D. , Chawdry Iftikhar and Felmeister Alvin. "Interaction of 3-Methylcholanthrene with lecithin and cholesterol mixed films." Journal of Pharmaceutical Sciences 1971, 60 : 425-428.

18. Wein, R. ; Harrison, J. ; and Freeman, W.A. "Diamidines as Antibacterial Compounds." British Journal of Pharmacology 1948, 3 ; 211-218.

19. Weiner N.D. ; Lu, M.Y. ; and Rosoff, M. "Interaction of Dimethyl Sulfoxide with Lipid and Protein Monolayers." Journal of Pharmaceutical Sciences 1972, 61 ; 1098-1101.

20. Zografi George and Suslander David E. "Surface activity of chlorpromazine and chlorpromazine sulfoxide in the presence of insoluble monomolecular films." Journal of Pharmaceutical Sciences 1965, 54 ; 1313-1318.