บทที่ 4
อภิปรายผลการทดลอง

1. การศึกษาเทคนิคต่าง ๆ ในการเตรียมเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล

1.1 เทคนิคการเกิดโคอาเซอร์เวชั่น

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

เมื่อนำเตตานัสท็อกซอยด์มาทำให้กระจายตัว ในสารละลายเซลลูโลสอะซิเตททาเลท ซึ่งละลายในอะซิโตน จะเกิด W/O อิมัลชั่น ต่อมาเติมสารละลายของแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 35 เปอร์เซ็นต์ ลงไปจะเกิดการแยกเป็น 2 วัฏภาค เกิดโคอาเซอร์เวท (coacervate) ของเซลลูโลสอะซิเตท ทาเลท รอบตัวยา แต่การเกิดโคอาเซอร์เวชั่นนี้ไม่สมบูรณ์เนื่องจากปฏิกิริยาเป็นแบบ simple coacervation ซึ่งผันกลับได้ ทำให้ไมโครแคปซูลที่ได้ไม่คงตัว จับกันเป็นก้อนเหนียว

1.1.2 การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า Dielectric Constant 15-34

วิธีนี้เกิด โคอาเซอร์เวชั่นไม่สมบูรณ์ เนื่องจากอะซิโตนไม่สามารถระเหยไปได้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ควบคุมในการเตรียมเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล การเพิ่มอุณหภูมิในการทดลองอาจทำให้เกิดโคอาเซอร์เวทรอบเตตานัสท็อกซอยด์ได้ดีขึ้น และทำให้อะซิโตนระเหยไปได้มากขึ้นแต่จะทำให้สูญเสีย เตตานัสท็อกซอยด์ไปมากวิธีนี้จึงไม่เหมาะสมในการเตรียมเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล

1.1.3 การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า Dielectric Constant ต่ำกว่า 10

1.1.3.1 การใช้เมทิลีนคลอไรด์เป็นตัวทำละลายไฮดร็อกซีโปรปิลเมทิลเซลลูโลส ซึ่งใช้เป็นผนังหุ้มเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล เมื่อเติมเอทิลีนไกลคอลลงไปจะทำให้เกิดการแยกเป็น 2 วัฏภาค แต่การแยกวัฏภาคเกิดไม่สมบูรณ์ เนื่องจากเมทิลีคลอไรด์ละลายได้บ้างในเอทิลีนไกลคอล หลังจากการคนจะทำให้ผนังไมโครแคปซูลกลับมาจับกันเป็นก้อนเหนียวคล้ายวุ้น สารที่ใช้เป็นตัวทำละลายผนังหุ้มไมโครแคปซูลควรจะไม่ละลาย ในสารที่ทำให้เกิดการแยกวัฏภาค หรืออาจจะละลายได้แต่ไม่ควรเกิน 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

1.1.3.2 การใช้ส่วนผสมของเอทิลอะซิเตทกับคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:1 เป็นตัวทำละลายเอทิลเซลลูโลสซึ่งใช้เป็นผนังหุ้มไมโครแคปซูล และใช้เอทิลีนไกลคอลเป็นสารที่ทำให้การแยกเป็น 2 วัฏภาค จะทำให้เกิดการแยกวัฏภาคเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ เพราะเอทิลอะซิเตท กับคลอโรฟอร์มไร้สภาพขั้ว (non polar) ยิ่งกว่าเมที

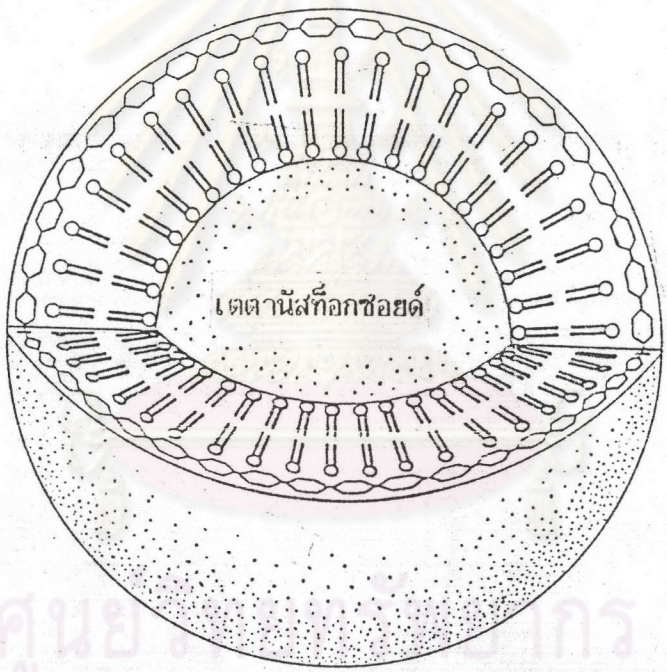
สีนคลอไรด์ ซึ่งใช้เป็นสารละลายผนังหุ้มไมโครแคปซูลในข้อ 1.1.3.1 เอทิลีนไกลคอลจึงไม่ละลายในส่วนผสมของเอทิลอะซีเตทและคลอโรฟอร์มทำให้โคอาเซอร์เวชั่นเกิดอย่างสมบูรณ์ ได้เตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลเกิดขึ้น

1.2 <u>การเตรียมเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลโดยใช้อินเตอร์เฟเชียลโพลีเมอร์ไรเซชั่นเทคนิค</u>

เตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลที่เตรียมได้จากอินเตอร์เฟเชียลโพลีเมอร์ไรเซชั่นเทคนิคนี้เกิดขึ้นได้เนื่องจาก ในขณะที่เกิด W/O อิมัลชั่นนั้น โมเลกุลของเลซิทินซึ่งเป็นฟอสโฟไลปิดชนิดหนึ่งเกิดการเรียงตัวโดยหันด้านมีขั้วของโมเลกุลเข้าหาส่วนที่เป็นน้ำ และหันด้านไม่มีขั้วเข้าหากันเอง จะเกิดเป็นฟอสโฟไลปิดไบแลย์ (phospholipid bilayer) หรืออาจเกิดเป็นหลาย ๆ ชั้น (multilayer) ก็ได้ เมื่อเติม W/O emulsion ลงไปในสารละลายคาร์บอกซีเมทิลไคทิน 0.2% เพื่อให้เกิด W/O/W emulsion จะเกิดปฏิกิริยา polymerization ระหว่างโมเลกุลของคาร์บอกซีเมทิลไคทิน กับส่วนที่มีขั้วที่โมเลกุลของเลซิทิน เกิดการเรียงตัวของคาร์บอกซีเมทิลไคทินเป็นตาข่ายรอบอนุภาคของเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูล ตามรูปที่ 12 ปฏิกิริยาจะเกิดได้ดีใน pH ต่ำ เพราะที่ pH ต่ำ เลซิทินจะมีประจุเป็นบวก และคาร์บอกซีเมทิลไคทิน มีประจุเป็นลบ ในการทดลองนี้ใช้ pH 7.4 เพื่อให้ใกล้เคียงกับ pH ของของเหลวในร่างกาย

ในขั้นตอนการคนเพื่อไล่ไดคลอโรมีเทนให้ระเหยไปต้องใช้เวลานานถึง 16 ชั่วโมง เนื่องจากต้องควบคุมอุณหภูมิที่เตรียมให้ได้ 0-4 องศาเซลเซียส ทำให้ได้คลอโรมีเทนระเหยช้า การแยกตะกอนที่ตกหลังจากใช้แรงหมุนเหวี่ยง 2000 รอบต่อนาทีจะทำให้ได้ไมโครแคปซูลมีขนาดเล็ก และสม่ำเสมอกระจายตัวอยู่ในของเหลว และสามารถผ่านเข้มฉีดยาเบอร์ 25 ได้ อย่างสะดวกตามข้อบังคับของการเตรียมยาฉีดแขวนตะกอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 12 โครงสร้างของเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครนคปซูลที่เตรียมได้จากวิธีอินเตอร์เฟเชียลโพลีเมอร์ไรเซชั่น

2. การพัฒนาวิธีที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 เพื่อหาวิธีเตรียมที่ดีที่สุด

จากเทคนิคการทดลองในขั้นตอนที่ 1 การทดลองที่ 1.1.3.2 ซึ่งให้ผลที่มีแนวโน้มว่าจะเตรียมไมโครแคปซูล ในขนาดที่เหมาะสมที่จะนำไปทำเป็นยาฉีดได้ จึงทดลองทำ Ternary Phase Diagram ของเอทิลเซลลูโลส, เอทิลอะซิเตท-คลอโรฟอร์ม (1:1) และเอทิลีนไกลคอล แล้วเตรียมไมโครแคปซูลโดยใช้อัตราส่วนทั้ง 3 ชนิด ในพื้นที่ที่มีสภาพการละลายเป็น Liquid-Gel ตามรูปที่ 7 และตารางที่ 8 จะเห็นว่าตำรับที่ 2.1.1 และ 2.1.2 ที่จุด C จะมีความเข้มข้นของเอทิลเซลลูโลสต่างกัน คือจุด A มีเอทิลเซลลูโลส 5% และจุด C มีเอทิลเซลลูโลส 10% แต่อัตราส่วนของเอทิลอะซีเตท-คลอโรฟอร์ม กับเอทิลีนไกลคอลใกล้เคียงกัน คือ 75:20 และ 70:20 ตามลำดับจะเห็นว่าที่จุด C มีความเข้มข้นของเอทิลเซลลูโลสสูงกว่าทำให้ความหนืดที่จุด C มีมากกว่า จุด A ดังนั้นการเกิดไมโครแคปซูลที่จุด C (35 ไมครอน) จะให้ขนาดอนุภาคที่ใหญ่กว่าที่จุด A (33 ไมครอน)

ส่วนตำรับที่ 2.1.3 จะมีเอทิล เซลลูโลส 10% ที่จุด E ซึ่งเท่ากับที่จุด C ในตำรับที่ 2.1.2 แต่ปริมาณของเอทิลอะซิเตท-คลอโรฟอร์ม ซึ่งเป็นตัวทำละลายของเอทิลเซลลูโลสจะน้อยกว่าที่จุด C ทำให้ความหนืดที่จุด E มีมากกว่าที่จุด C ดังนั้นการเกิดไมโครแคปซูลที่จุด E (45 ไมครอน) จะมีขนาดอนุภาคที่ใหญ่กว่าที่จุด C (35 ไมครอน)

ตำรับที่ 2.1.4 นั้น การเพิ่มความเข้มข้นของ เอทิลีไกลคอลซึ่งเป็นตัวทำให้เกิดการแยกวัฏภาค จะทำให้ขนาดของไมโครแคปซูลที่ได้เล็กลง (25 ไมครอน)

3. การทดสอบคุณภาพของไมโครแคปซูล

จากผลการทดลองวัดขนาด ของเตตาน์สท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลที่เตรียมได้โดยวิธีที่ 1.2 หรืออินเตอร์เฟเชียลโพลีเมอร์ไรเซชั่น ตามตารางที่ 9 และรูปที่ 10 พบว่าเตตาน์สท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลที่ได้ ให้ขนาดของไมโครแคปซูลที่มีค่าตัวกลางเลขคณิต 2.69 ไมครอน, มัธยฐาน 1.82 ไมครอน และฐานนิยม 2.2 ไมครอน มีส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐาน 1.54 ไมครอน และ 72% ของอนุภาคทั้งหมดมีขนาด 0-3 ไมครอนซึ่งสามารถผ่านเข็มฉีดยาเบอร์ 25 ได้ ส่วนเตตาน์สท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลที่เตรียมจากโคอาเซอร์เวชั่นเทคนิคตามข้อ 2.1.1 ถึง 2.1.4 มีขนาดไมโครแคปซูลใหญ่กว่ามีค่าตัวกลางเลขคณิต 33.01, 35.98, 44.52 และ 24.99 ไมครอน, มัธยฐาน 32.39, 38.24, 41.19, และ 23.29 ไมครอน, ฐานนิยม 25.50, 45.50, 35.50 และ 25.50 ไมครอน ตามลำดับ จากตารางที่ 10 ขนาดของอนุภาค 2-10 ไมครอน มีไม่เกิน 8% ดังนั้นเตตาน์สท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลที่เตรียมได้จากโคอาเซอร์เวชั่นเทคนิคทั้ง 4 วิธี ไม่

เหมาะที่จะนำไปทำเป็นยาฉีดแขวนตะกอน เพราะจะก่อให้เกิดความเจ็บปวดบริเวณที่ฉีด และอนุภาคผ่านเข็มฉีดยาเบอร์ 25 ไม่สะดวก

ดังนั้นจึงนำเฉพาะเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลที่เตรียมได้จากวิธีที่ 1.2 หรือ อินเตอร์เฟเชียลโพลีเมอร์ไรเซชั่นเทคนิคเท่านั้นไปทดสอบผลทางชีวภาพโดยใช้หนูถีบจักรเป็นสัตว์ทดลอง ซึ่งจะแบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ฉีดแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์ที่ทำให้เจือจางเป็น 1:30, 1:60 และ 1:120 อัตราส่วนละ 10 ตัว กลุ่มที่ 2 ฉีดส่วนผสมของเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลกับแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์ (อัตราส่วน 1:1) ที่ทำให้เจือจางเป็น 1:30, 1:60 และ 1:120 อัตราส่วนละ 10 ตัว กลุ่มที่ 3 ฉีดเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลที่ทำให้เจือจางเป็น 1:30, 1:60 และ 1:120 อัตราส่วนละ 10 ตัว เช่นเดียวกัน จากนั้น ฉีดพิษทับ หนูถีบจักรด้วยเตตานัสท็อกซิน 200 $LD_{50/ml}$ หลังการฉีดด้วยตัวอย่างท็อกซอยด์ในสัปดาห์ที่ 4, 12 และ 24 ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 12, 13 และ 14 ตามลำดับ

จากตารางที่ 12 เมื่อ ฉีดพิษทับ หนูถีบจักรด้วยเตตานัสท็อกซินหลังการฉีดท็อกซอยด์ชนิดต่าง ๆ 4 สัปดาห์ พบว่าหนูถีบจักรกลุ่มที่ 1 ซึ่งได้รับแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์ที่ทำให้เจือจาง 1:30 มีหนูถีบจักรรอด 8 ตัว ส่วนอัตราส่วน 1:60 มีหนูถีบจักรรอด 5 ตัว และอัตราส่วน 1:120 ไม่มีหนูถีบจักรรอด แสดงว่าอัตราส่วน 1:30 เท่านั้นที่สามารถคุ้มกันหนูถีบจักรจากเตตานัสท็อกซินได้เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งได้รับส่วนผสมของเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลกับแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์ (อัตราส่วน 1:1) ที่ทำให้เจือจางเป็น 1:30 มีหนูถีบจักรรอด 9 ตัว ส่วนอัตราส่วน 1:60 มีหนูถีบจักรรอด 4 ตัว และอัตราส่วน 1:120 ไม่มีหนูรอด ซึ่งให้ผลที่ใกล้เคียงกับกลุ่มที่ 1 มาก ภูมิคุ้มกันที่เกิดนี้ได้จากการกระตุ้นของแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์ และอาจมีผลของเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลร่วมด้วยเล็กน้อย ส่วนกลุ่มที่ 3 ซึ่งได้รับเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลที่ทำให้เจือจางเป็น 1:30 1:60 และ 1:120 พบว่าทั้ง 3 อัตราส่วนไม่มีหนูถีบจักรรอด แสดงว่าเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลยังปลดปล่อยท็อกซอยด์ออกมาน้อยจึงมีภูมิคุ้มกันบาดทะยักไม่เพียงพอ

จากตารางที่ 13 เมื่อ ฉีดพิษทับ หนูถีบจักรด้วยเตตานัสท็อกซินหลังการฉีดท็อกซอยด์ชนิดต่าง ๆ 12 สัปดาห์ พบว่า หนูถีบจักรกลุ่มที่ 1 ซึ่งได้รับแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์ที่ทำให้เจือจางเป็น 1:30 มีหนูถีบจักรรอด 5 ตัว ส่วนอัตราส่วน 1:60 และ 1:120 ไม่มีหนูถีบจักรรอดแสดงว่าแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์ สามารถให้ภูมิคุ้มกันบาดทะยักในหนูถีบจักรหลังการฉีด 4 สัปดาห์แต่ไม่ถึง 12 สัปดาห์ ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งได้รับส่วนผสม

ของเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลกับแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์ (อัตราส่วน 1:1) ที่ทำให้เจือจางมีหนูถีบจักรอดเป็น 1:30 มีหนูถีบจักรรอด 8 ตัว อัตราส่วน 1:60 มีหนูถีบจักรรอด 3 ตัว อัตราส่วน 1:120 ไม่มีหนูถีบจักรรอด แสดงว่า เตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลมีการปลอดปล่อยตัวยาออกมา และปริมาณที่ปลดปล่อยออกมาสามารถทดแทนส่วนของแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์ที่ถูกขจัดไปได้ทำให้สามารถป้องกันหนูถีบจักรจากบาดทะยักได้ถึงสัปดาห์ที่ 12 หลังการฉีด ส่วนในกลุ่มที่ 3 ซึ่งได้รับเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลที่ทำให้เจือจาง 1:30, 1:60 และ 1:120 ไม่มีหนูถีบจักรรอดทั้ง 3 อัตราส่วน แสดงว่าการให้เตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลเพียงอย่างเดียวนั้นภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจากการปลดปล่อยท็อกซอยด์จากไมโครแคปซูลอย่างช้า ๆ ยังไม่สูงพอที่จะคุ้มกันหนูถีบจักจากบาดทะยักได้

จากตารางที่ 14 เมื่อ ฉีดพิษทับ หนูถีบจักรด้วยเตตานัสท็อกซินหลังการฉีดท็อกซอยด์ชนิดต่างๆ 24 สัปดาห์ พบว่าหนูถีบจักรกลุ่มที่ 1 ซึ่งได้รับแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์ที่ทำให้เจือจางเป็น 1:30, 1:60 และ 1:120 ไม่มีหนูถีบจักรรอดทั้ง 3 อัตราส่วน ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งได้รับส่วนผสมของเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลกับแอดสอร์บเตตานัสท็อกซอยด์ (อัตราส่วน 1:1) ที่ทำให้เจือจางเป็น 1:30 มีหนูถีบจักรรอด 1 ตัว อัตราส่วน 1:60 และ 1:120 ไม่มีหนูถีบจักรรอด ในกลุ่มที่ 3 ซึ่งได้รับเตตานัสท็อกซอยด์ไมโครแคปซูลที่ทำให้เจือจางเป็น 1:30, 1:60 และ 1:120 ไม่มีหนูถีบจักรรอดทั้ง 3 อัตราส่วน แสดงว่าในสัปดาห์ที่ 24 หลัง การฉีดท็อกซอยด์ หนูทุกกลุ่มไม่มีภูมิคุ้มกันบาดทะยักเพียงพอ

เมื่อนำผลการทดลองไปทดสอบทางสถิติโดยใช้การแจกแจงแบบไค-สแควร์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สรุปได้ว่าจำนวนหนูถีบจักรที่รอดจากเตตานัสท็อกซินหลังจากได้รับการฉีดท็อกซอยด์ชนิดต่าง ๆ 4 สัปดาห์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนจำนวนหนูถีบจักรที่รอดหลังการฉีดท็อกซอยด์ชนิดต่าง ๆ 12 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และจำนวนหนูถีบจักรที่รอดหลังการฉีดท็อกซอยด์ชนิดต่าง ๆ 24 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ