บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการทดลอง

1. Clindamycin Hydrochloride U.S.P. XX (Upjohn)
2. White Ointment U.S.P. XXI
3. Hydrophilic Petrolatum U.S.P. XXI
4. Hydrophilic Ointment U.S.P. XXI
5. Polyethylene Glycol Ointment U.S.P. XXI
6. Disodium Phosphate (BDH)
7. Sodium Acid Phosphate (BDH)
8. Sodium Chloride (BDH)
9. Isopropyl Alcohol (Merck)
10. Propylene Glycol (วิทยาศรม)
11. Brain Heart Infusion Broth (Difco)
12. Brain Heart Infusion Agar (Difco)
13. Propionibacterium acnes (CDC # 14369 or ATCC # 6919)
14. Staphylococcus aureus (ATCC # 25923)
15. Pseudomonas aeruginosa (ATCC # 27853)
16. Cellulose Membrane D 2130 (Cellulose Dialyzer Tubing : Arthur H Thomas Co.)
17. Cellophane paper
18. Adhesive tape (Transpore^{R})
19. Sensitivity Tested Medium (Al - Test^{R})

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. Analytical Balance (Metler H 51 AR)
2. Diffusion Cell Used for Release Experiments (Derived From Diffusion Technique Developed by Betorri et al)
3. Automatic Pipette (Socorex)
4. Spectophotometer (Spectronic 2000)
5. Anaerobic Incubator in Anaerobic Glove Box
6. Incubator (Memmert)
7. pH - meter (El-Hana Instruments)
8. Dissolution Apparatus (Hanson Research)
9. Petri - Dish
10. Tuberculin Syringe (Terumo)
11. เครื่องเจาะวุ้น

ขั้นตอนในการทดลอง

1. การหาการปลดปล่อยตัวยาคลินดามัยซินออกจากยาขี้ผึ้งตำรับต่าง ๆ โดยวิธีดิฟฟิวชั่น

1.1 การเตรียมยาเตรียมขี้ผึ้งคลินดามัยซิน

1.1.1 เตรียมยาพื้นขี้ผึ้งตำรับต่าง ๆ ได้แก่

1.1.1.1 ยาพื้นขี้ผึ้งชนิดที่เป็นมันได้แก่ White Ointment U.S.P. XXI

1.1.1.2 ยาพื้นขี้ผึ้งชนิดดูดซับน้ำได้แก่ Hydrophilic Petrolatum U.S.P. XXI

1.1.1.3 ยาพื้นขี้ผึ้งชนิดอิมัลชันได้แก่ Hydrophilic Ointment U.S.P. XXI

1.1.1.4 ยาพื้นขี้ผึ้งชนิดละลายน้ำ ได้แก่ Polyethylene Glycol Ointment U.S.P. XXI

หมายเหตุ สูตรและวิธีเตรียมยาพื้นขี้ผึ้งตำรับต่าง ๆ นี้ได้แล่าวไว้ในภาคผนวก ก.

1.1.2 ผสมตัวยาคลินดามัยซินเข้ากับยาพื้นขี้ผึ้งตำรับต่าง ๆ ในข้อ 1.1.1 ให้มีความแรง 1% W/W ในยาพื้นเหล่านั้น จะได้ยาเตรียมขี้ผึ้งคลินดามัยซิน 4 ตำรับ

1.2 การเตรียมตัวทำละลายที่ใช้ในการทดสอบการปลดปล่อยตัวยาออกจากยาพื้นขี้ผึ้ง

1.2.1 ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดสอบการปลดปล่อยตัวยาออกจากยาพื้นขี้ผึ้งที่ใช้ในการวิจัยนี้คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer) ซึ่งเตรียมได้ดังนี้

1.2.1.1 เตรียมสารละลายโซเดียมเอซิดฟอสเฟต (Sodium Acid Phosphate Solution) ความเข้มข้น 1/15 โมลาร์ (Molar)

1.2.1.2 เตรียมสารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต (Disodium Phosphate Solution ความเข้มข้น 1/15 โมลาร์

1.2.1.3 นำสารละลายในข้อ 1.2.1.1 ผสมกับสารละลายในข้อ 1.2.1.2 ในอัตราส่วน 9 : 1 ให้เป็นสารละลายใสเนื้อเดียวกัน

1.2.1.4 เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride) จำนวน 0.52%W/V ของสารละลาย ลงในสารละลายในข้อ 1.2.1.3 แล้วละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะได้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ตามต้องการ

1.2.2 นำสารละลายที่ได้ในข้อ 1.2.1.4. ไปวัด pH ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด ด่าง (pH - Meter) จะได้ค่า pH 5.4

1.3 การสร้างเส้นโค้งมาตรฐานของคลินดามัยซิน (Standard Curve)

1.3.1 ละลายคลินดามัยซินที่ใช้ในการทดลอง ในตัวกลางทำละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2.1.4 ให้มีความเข้มข้น 10, 15, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัม ในสารละลาย 1.0 มิลลิลิตร

1.3.2 นำสารละลายคลินดามัยซินที่เตรียมได้ในข้อ 1.3.1 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต (Ultra - violet Absorption) ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 201.8 นาโนเมตร (Nano-

meter) โดยใช้ควอตซ์เซล (Quartz Cell) ขนาด 10 มิลลิเมตร และสารละลายที่ใช้เปรียบเทียบคือ ตัวทำละลายในข้อ 1.2.1.4

1.3.3 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่อ่านได้ (ค่าเฉลี่ย 6 ครั้ง) กับความเข้มข้นของสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 1.3.1 จะได้เส้นโค้งมาตรฐานตามต้องการ

1.4 การหาการปลดปล่อยตัวยาออกจากยาพื้นขี้ผึ้ง

1.4.1 การหาการปลดปล่อยตัวยาคลินดามัยซินออกจากยาพื้นขี้ผึ้งในการวิจัยนี้ใช้วิธีดิฟฟิวชัน (Diffusion Technique) ซึ่งดัดแปลงโดย Botarri และคณะ (54) ทำได้ดังนี้

1.4.1.1 ชั่งหาน้ำหนักของไดอะไลซิสเซล (Dialysis Cell) ซึ่งทำด้วยเฟลกซีกลาส ดังแสดงในรูปที่ 8 แล้วบรรจุยาขี้ผึ้งในข้อ 1.1.1 และ 1.1.2 ลงในไดอะไลซิสเซลที่ทราบน้ำหนักแล้ว ให้เต็มเซลและไม่ให้มีฟองอากาศ แล้วปาดยาขี้ผึ้งที่มากเกินไปออก ทำให้ผิวหน้าของยาขี้ผึ้งที่บรรจุในเซลดังกล่าวเรียบเป็นแนวระดับเดียวกับขอบของเซล จากนั้นนำเซลที่บรรจุยาขี้ผึ้งแล้วนี้ไปชั่งหาน้ำหนักอีกครั้ง จะทำให้ทราบน้ำหนักยาขี้ผึ้งที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งสามารถนำมาคำนวนหาปริมาณตัวยาคลินดามัยซินทั้งหมดในยาขี้ผึ้งที่ใช้ในการทดลอง

1.4.1.2 นำเซลลูโลสเมนเบรน (Cellulose Membrane) ซึ่งแช่ในตัวทำละลายในข้อ 1.2.1.4 แล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วางบนผิวหน้าของยาขี้ผึ้งที่บรรจุในเซล ให้แนบเรียบกับผิวหน้าของยาขี้ผึ้งโดยไม่ให้มีฟองอากาศแทรกอยู่ ยึดเมมเบรนให้ติดอยู่กับเซลด้วยวง - แหวนพลาสติกทับที่ข้างบน และหมุนทวนสกรูที่ใช้ยึดส่วนประกอบของเซลให้แน่น นำเซลทั้งหมดนี้จุ่มลงในตัว

ทำละลาย 900 มิลลิลิตรในภาชนะแก้วทรงกระบอกก้นกลมตามมาตรฐานเภสัชตำรับของสหรัฐอเมริกา (Type II) ที่จุ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37° ± 1°C คนตัวทำละลายในภาชนะแก้วก้นกลมด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที (3,55) เพื่อให้เกิดการหมุนเวียนของสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันตลอดเวลา

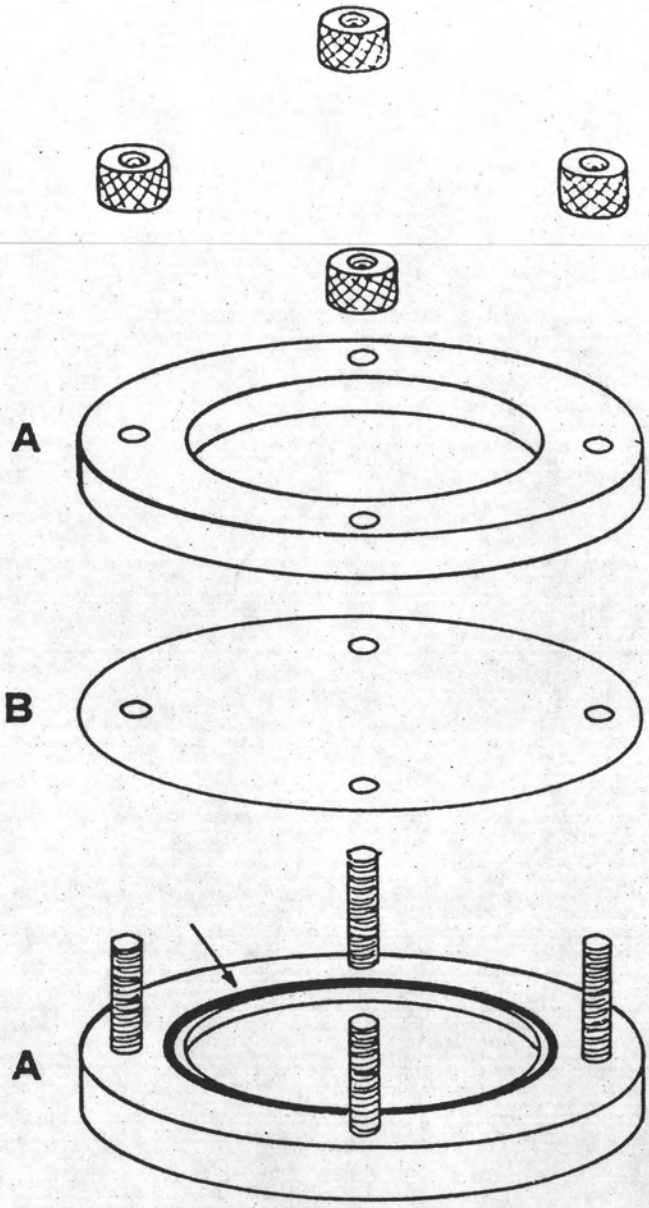
1.4.1.3 เริ่มจับเวลาทันทีที่จุ่มเซลลงในตัวกลางทำละลายในภาชนะแก้วก้นกลมที่มีการหมุนเวียนของสารละลายด้วยความเร็วสม่ำเสมอเก็บตัวอย่างออกมาครั้งละ 5 มิลลิลิตร ในนาทีที่ 15,30,45,60,90,120, 150 และ 180 ด้วยเครื่องดูดสารละลายอัตโนมัติ (Socorex Autopipette) เติมตัวทำละลายให้ปริมาตรคงเดิม ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างออกแล้ว

1.4.1.4 นำตัวอย่างที่เก็บออกมาจากการปลดปล่อยออกจากยาเตรียมขี้ผึ้งคลินดามัยซินในข้อ 1.1.2 ที่เวลาต่าง ๆ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 201.8 นาโนเมตร โดยใช้ควอตซ์-เซลขนาด 10 มิลลิเมตร และใช้ตัวอย่างที่เก็บออกจากการปลดปล่อยออกจากยาพื้นขี้ผึ้งในข้อ 1.1.1 ซึ่งเป็นชนิดเดียวกันกับยาพื้นขี้ผึ้งของยาเตรียมขี้ผึ้งคลินดามัยซินนั้นที่เวลาเดียวกันเป็นสารละลายอ้างอิงเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นี้จะเป็นค่าการดูดกลืนแสงอุล-ตราไวโอเลตของคลินดามัยซินที่ปลดปล่อยออกจากยาพื้นขี้ผึ้งในตัวอย่างที่เก็บออกมาได้

1.4.1.5 จากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ในข้อ 1.4.1.4 จะทราบความเข้มข้นของคลินดามัยซินเป็นไมโครกรัมใน 1.0 มิลลิลิตรได้โดยอาศัยเส้นโค้งมาตรฐานของคลินดามัย-ซินซึ่งทำไว้แล้วในข้อ 1.3.3

1.4.2 คำนวณค่าอัตราการปลดปล่อยตัวยาคลินดามัยซินออกจากยาพื้นขี้ผึ้งตำรับต่าง ๆ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ เป็นร้อยละของตัวยาคลินดามัยซินทั้งหมดในยาพื้นขี้ผึ้งที่ใช้ในการทดลอง โดยนำค่าความเข้มข้นของคลินดามัยซินเป็นไมโครกรัมใน 1.0 มิลลิลิตร คำนวณเป็นปริมาณตัวยาคลินดามัยซินในตัวทำละลาย 900 มิลลิลิตร แล้วนำค่าที่ได้นี้ไปเปรียบเทียบเป็นร้อยละของปริมาณคลินดามัยซินที่คำนวณไว้แล้วในข้อ 1.4.1.1 (ดูภาคผนวก ข)

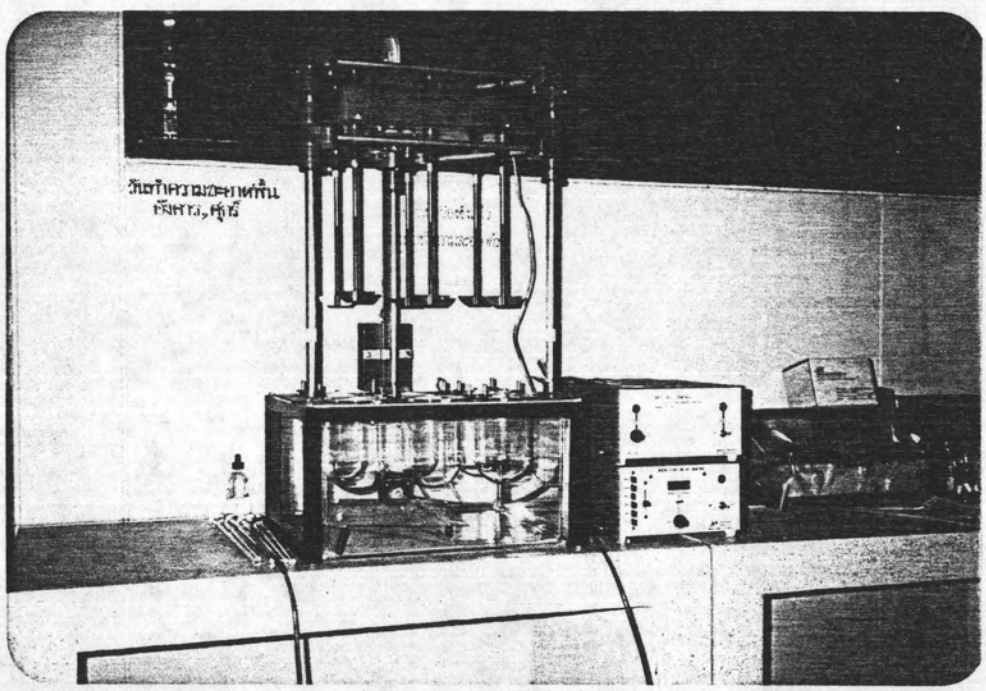
1.4.3 เขียนกราฟระหว่างค่าอัตราร้อยละการปลดปล่อยตัวยาคลินดามัยซินออกจากยาพื้นขี้ผึ้งตำรับต่าง ๆ กับเวลาต่าง ๆ



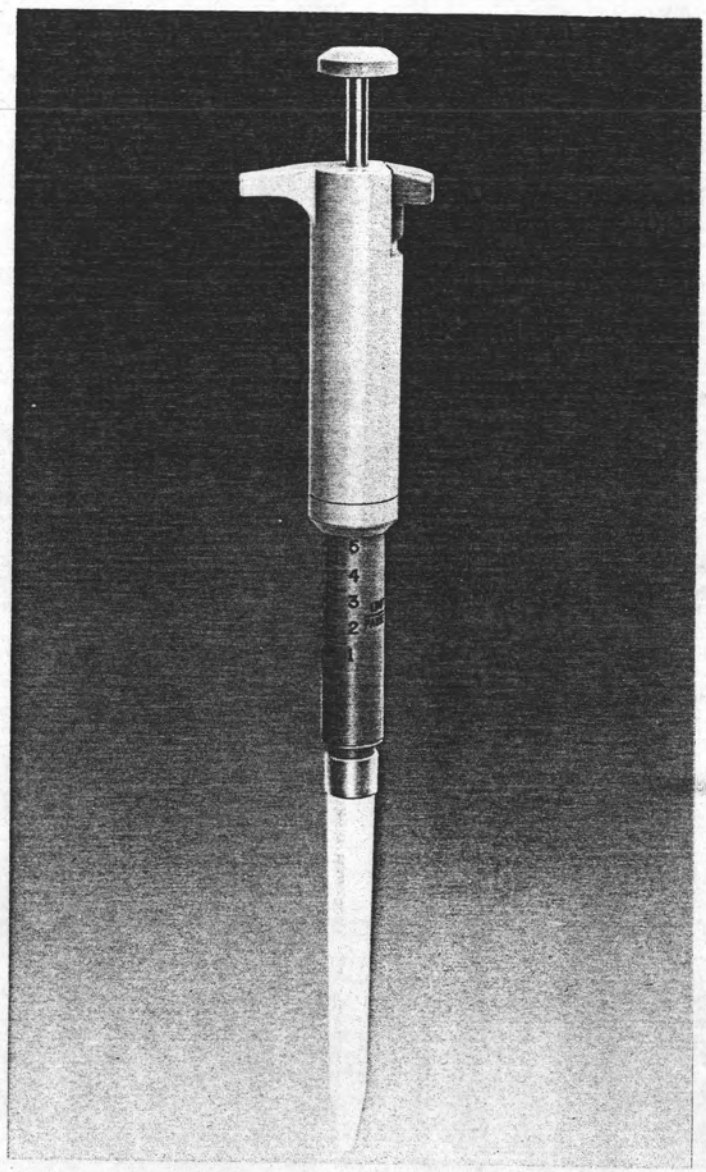
รูปที่ 8 ส่วนประกอบของไดอะไลซิสเซลที่ใช้ทดสอบการหาการปลดปล่อยตัวยาออกจากยาพื้นขี้ผึ้ง

A = Plastic cell body and plate

B = Cellulose membrane



รูปที่ 9 ชุดเครื่องมือหาการปลดปล่อยตัวยาออกจากยาพื้นขี้ผึ้ง



รูปที่ 10 เครื่องมือดูดสารละลายอัตโนมัติ (Socorex)

รูปที่ 11 Spectrophotometer (Spectronic 2000)

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การทดสอบความคงตัวของยาเตรียมขี้ผึ้งคลินดามัยซิน

2.1 การทดสอบความคงตัวทางกายภาพของยาเตรียมขี้ผึ้งคลินดามัยซิน โดยนำยาพื้นขี้ผึ้งตำรับต่าง ๆ ที่เตรียมตามข้อ 1.1.1 และยาเตรียมขี้ผึ้งคลินดามัยซินทั้ง 4 ตำรับที่เตรียมตามข้อ 1.1.2 มาสังเกตและบันทึกผลทางกายภาพ ได้แก่

2.1.1 ความแข็งหรือความเหนียวของขี้ผึ้ง (Stiffeness or Consistency)

2.1.2 สี (Color)

2.1.3 กลิ่น (Odor)

2.1.4 การแยกชั้น (Cracking and Sedimentation)

หลังจากสังเกตผลทางกายภาพดังกล่าวแล้ว นำยาขี้ผึ้งตำรับต่าง ๆ ดังกล่าวไปเข้าวงจรฟรีสต์และทอว์ 5 รอบ (5 - Freeze & Thaw Cycles) ซึ่งวงจรแต่ละรอบทำโดยอบยาขี้ผึ้งในตู้อบอุณหภูมิ 45 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนมาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -10 °C นาน 24 ชั่วโมง และในระหว่างทำการทดลองนี้ต้องไม่คนหรือเขย่าขวดขี้ผึ้ง (53)

เมื่อเข้าวงจรของฟรีสต์และทอว์จำนวน 5 รอบแล้ว ให้สังเกตและบันทึกผลทางกายภาพเช่นเดียวกันกับก่อนเข้าวงจรฟรีสต์และทอว์

2.2 การทดสอบความคงตัวทางจุลชีววิทยาของยาเตรียมขี้ผึ้งคลินดามัยซิน โดยวิธีดิฟฟิวชัน (Diffusion Method) โดยนำยาเตรียมขี้ผึ้งคลินดามัยซินทั้ง 4 ตำรับที่เตรียมตามข้อ 1.1.2 ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียต่อไปนี้

2.2.1 Propionibacterium acnes CDC # 14369

2.2.2 Staphylococcus aureus ATCC # 25923

2.2.3 Pseudomonas aeruginosa ATCC # 27853

หลังจากนั้นนำยาขี้ผึ้งตำรับต่าง ๆ ดังกล่าวไปเข้าวงจรฟรีสต์และทอว์จำนวน 5 รอบแล้ว ให้นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวแล้วเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสามของยาขี้ผึ้งก่อนและหลังจากเข้าวงจรฟรีสต์และทอว์

2.3 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียของยาเตรียมขี้ผึ้งคลินดามัยซินในระยะเวลาต่าง ๆ โดยนำยาเตรียมขี้ผึ้งคลินดามัยซินที่เตรียมตามข้อ 1.1.2 ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิปกติ เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 0-3 เดือน ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเช่นเดียวกับข้อ 3.3

3. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ทำโดยบรรจุยาขี้ผึ้งลงในเข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร (Tuberculin Syringe) ฉีดยาขี้ผึ้งลงไปบรรจุในหลุมบนจานวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้แล้ว ปริมาณหลุมละ 0.05 ± 0.01 มิลลิลิตร (หรือประมาณ 0.05 ± 0.01 กรัม) เมื่อบรรจุยาขี้ผึ้งลงในหลุมเรียบร้อยแล้ว นำจานวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงในตู้อบเลี้ยงเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เชื้อ Propionibacterium acnes ซึ่งเป็นเชื้อแอนแอโรบิคแบคทีเรีย ให้เพาะเลี้ยงเชื้อแอนแอโรบิคใน Anaerobic Incubator เป็นเวลา 2 วัน ส่วนเชื้อ Staphylococcus aureus และเชื้อ Pseudomonas aeruginosa ให้เพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อธรรมดาเป็นเวลา 1 วัน

หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อตามเวลาที่กำหนดแล้ว จึงนำจานวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาอ่านผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย โดยการอ่านค่าเป็นพื้นที่ที่เชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญเติบโต (Inhibition Zone) ในการอ่านผลนี้ทำได้โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของพื้นที่ดังกล่าวทั้ง 2 แนวที่ตั้งฉากกัน

3.1 การเตรียมวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการวิจัยนี้ใช้เบรนฮาร์ทอินฟิวชันเอการ์ (Brain Heart Infusion Agar) (52) ทำได้โดยชั่งผงยาเบรนฮาร์ทอินฟิวชันเอการ์ จำนวน 1.04 กรัม เติมน้ำกลั่นจำนวน 20 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดเพื่อให้ผงยาละลายอย่างสมบูรณ์ และได้สารละลายวุ้นที่ใส นำสารละลายวุ้นไปทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterilize) ในหม้อนึ่งอัดความดัน (Autoclave) ใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงนำไปเทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri-dish) ได้ 1 จาน ให้ได้ผิวหน้าที่มีระดับสม่ำเสมอ และมีความหนาประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้เย็น เมื่อวุ้นแข็งให้คว่ำจานเพาะเลี้ยงเชื้อลง เพื่อให้น้ำระเหยออกหมด

3.2 การเตรียมสารละลายเจือจางของเชื้อแบคทีเรีย (Inoculum) ต่อไปนี้

3.2.1 Propionibacterium acnes CDC # 14369

3.2.2 Staphylococcus aureus ATCC # 25923

3.2.3 Pseudomonas aeruginosa ATCC # 27853

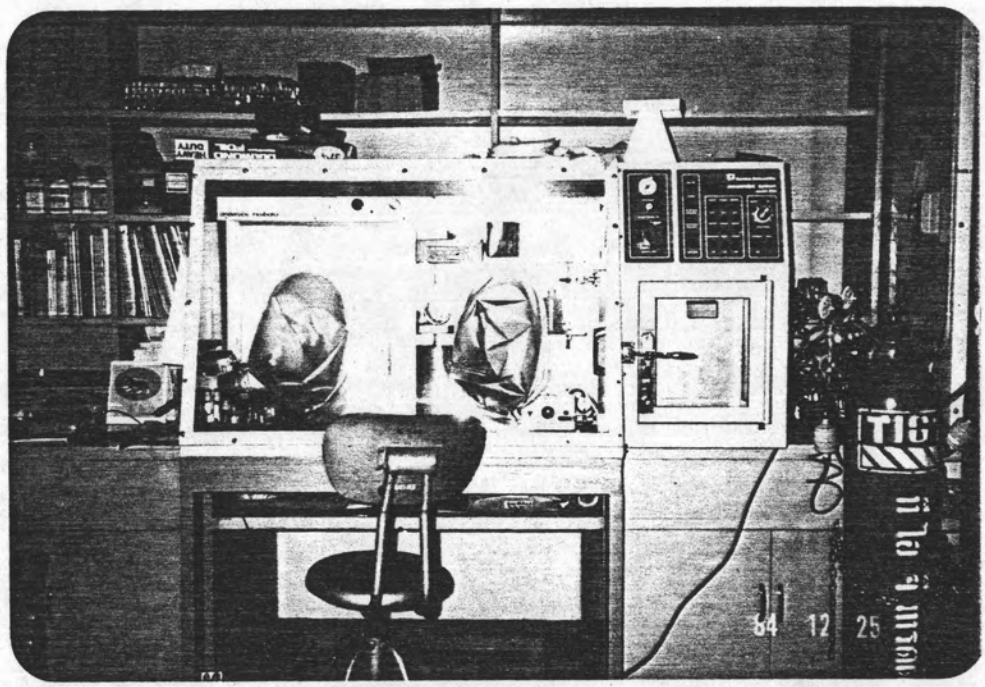
ทำได้โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Wire loop) เขี่ยเชื้อที่ต้องการไปป้ายบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันเอการ์ในข้อ 3.1 เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ตามเทคนิคทางจุลชีว-

วิทยา และนำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 วัน เชื้อจะแยกออกเป็นกลุ่ม ๆ (Colony) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเลือกเขี่ยกลุ่มเชื้อที่คล้ายกัน 3-4 กลุ่ม ไปละลายในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันบรอท (Brain Heart Infusion Broth) (56) ซึ่งเตรียมได้เช่นเดียวกับวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 3.1 ต่างกันที่ใช้ผงเบรนฮาร์ทอินฟิวชันบรอท 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร และนำไปทำให้ปราศจากเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที จึงนำมาใช้ได้ เมื่อละลายเชื้อที่ต้องการลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันบรอทแล้ว นำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบเลี้ยงเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ Staphylococcus aureus และ Pseudomonas aeruginosa ส่วน Propionibacterium acnes นำไปเพาะเลี้ยงใน Anaerobic Incubator ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้สารละลายเจือจางของเชื้อแบคทีเรีย 10^{-5} C.F.U./ml[*2] ตามต้องการ

3.3 นำจานวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่แข็งและน้ำระเหยออกหมดในข้อ 3.1 ไปเจาะเป็นหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ด้วยเครื่องเจาะวุ้นที่เป็นแท่งอลูมิเนียมที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ (Sterile Swab) จุ่มลงในสารละลายเจือจางของเชื้อแบคทีเรียในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2 ปั่นไม้พันสำลีนั้นรอบ ๆ ผนังด้านในของหลอดทดลอง เพื่อไม่ให้ไม้พันสำลีจุ่มสารละลายของเชื้อแบคทีเรียมากเกินไป เอาไม้พันสำลีดังกล่าวไปป้าย (Streak) ลงบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อเบรนฮาร์ทอินฟิวชันเอการ์ที่เจาะหลุมไว้แล้ว ให้ทั่วตามเทคนิคทางจุลชีววิทยา ภายใต้สภาวะปราศจากเชื้อใน U.V.Chamber จะได้จานวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียนั้น ๆ ของยาเตรียมขี้ผึ้งคลินดามัยซินตามต้องการ

---

*2 C.F.U./ml = Colony Forming Unit per Millilitre



รูปที่ 12 ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อพวกแอนแอโรบิคแบคทีเรีย ในตู้ควบคุมสภาวะไร้ออกซิเจน (Anaerobic Glove Box)

4. การทดสอบการแทรกซึม (Penetrate) ของยาขี้ผึ้งคลินดามัยซิน เข้าสู่ผิวหนัง ทำได้โดย

4.1 นำกระดาษเซลโลเฟน (Cellophane) ขนาดพอเหมาะไปชั่งหาน้ำหนัก

4.2 ชั่งยาขี้ผึ้งตำรับต่าง ๆ จำนวนประมาณ 0.50 ± 0.05 กรัม ลงบนกระดาษเซลโลเฟนที่ทราบน้ำหนักแล้ว

4.3 นำพลาสเตอร์ชนิดไม่เปียกน้ำ (Transpore) ที่เจาะรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.5 เซนติเมตรไว้แล้ว ปิดลงบนผิวหนังบริเวณท้องแขนส่วนปลาย ทั้งแขนซ้ายและแขนขวาของอาสาสมัคร โดยปิดข้างละ 2 ชิ้น แต่ละชิ้นห่างกันประมาณ 4 เซนติเมตร ทั้งนี้ใช้อาสาสมัครในการทดลองนี้ประมาณ 50 คน ทั้งชายและหญิง อายุประมาณ 17 -34 ปี

4.4 เอายาขี้ผึ้งที่ชั่งไว้แล้วบนกระดาษเซลโลเฟน ปิดที่ผิวหนังบริเวณท้องแขนส่วนปลายที่ปิดพลาสเตอร์เจาะรูไว้แล้ว ทาขี้ผึ้งบนผิวหนังให้ทั่ว แล้วใช้พลาสเตอร์แถบเล็ก ๆ ปิดทับกระดาษเซลโลเฟนบนผิวหนังนั้นไม่ให้หลุดไปได้

4.5 ให้อาสาสมัครพักหลังจากปิดยาขี้ผึ้งบนท้องแขนส่วนปลายทั้ง 4 ชิ้น เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำกระดาษเซลโลเฟนออกจากผิวหนัง และรวบรวมยาขี้ผึ้งทั้งหมดที่ไม่แทรกซึมผ่านผิวหนังไปชั่งหาน้ำหนัก

4.6 ทำการทดลองเช่นนี้กับอาสาสมัครแต่ละคนเป็นจำนวน 3 ครั้ง โดยระยะเวลาการทดลองแต่ละครั้งห่างกันประมาณ 1 สัปดาห์

แบบที่	ยาขี้ผึ้งที่ใช้		แบบที่	ยาขี้ผึ้งที่ใช้	
	แขนซ้าย	แขนขวา		แขนซ้าย	แขนขวา
1	O	E	5	E	O
	A	W		W	A
2	O	W	6	W	O
	A	E		E	A
3	A	E	7	E	A
	O	W		W	O
4	A	W	8	W	A
	O	E		E	O

O = White Ointment (Oleaginous Ointment)

A = Hydrophilic Petrolatum (Absorption Ointment)

E = Hydrophilic Ointment (Emulsion Ointment)

W = Polyethylene Glycol Ointment (Water Soluble Ointment)

รูปที่ 13 ตำแหน่งบนผิวหนังบริเวณท้องแขนส่วนปลาย ที่ทำการทดสอบการแทรกซึมของยาขี้ผึ้งคลินดามัยซินเข้าสู่ผิวหนัง แบบต่าง ๆ ทั้งหมด 8 แบบ

5. <u>การทดสอบการระคายเคือง</u> ใช้อาสาสมัครในการทดลองนี้จำนวน 200 คน เป็นอย่างน้อย ทั้งชายและหญิง อายุประมาณ 17 - 57 ปี โดยดำเนินการวิจัยดังนี้

5.1 การทำแพตช์ของยาขี้ผึ้ง ทำโดยป้ายยาขี้ผึ้งที่จะทดสอบ 0.05 กรัมลงบนแผ่นทดสอบการระคายเคือง (Al-test) จากนั้นจึงนำแผ่นทดสอบนั้นไปติดลงบนพลาสเตอร์ชนิดไม่เปียกน้ำ โดยเอาด้านที่ไม่ได้ป้ายยาติดบนพลาสเตอร์

5.2 นำแพตช์ของยาขี้ผึ้งที่เตรียมไว้แล้ว ปิดลงบนผิวหนังปริเวณแผ่นหลังอาสาสมัครแต่ละคน คนละ 8 จุด โดยทุกๆ จุดห่างกันประมาณ 5 เซนติเมตร

5.3 หลังจากนั้น 1 วัน จึงแกะแพตช์ออก บันทึกความผิดปกติที่เกิดขึ้นทันทีต่อไปนี้

5.3.1 การเกิดอาการร้อนแดงของผิวหนัง (Erythema)

5.3.2 การเกิดตุ่มเล็ก ๆ กลมแข็งบนผิวหนัง (Papules)

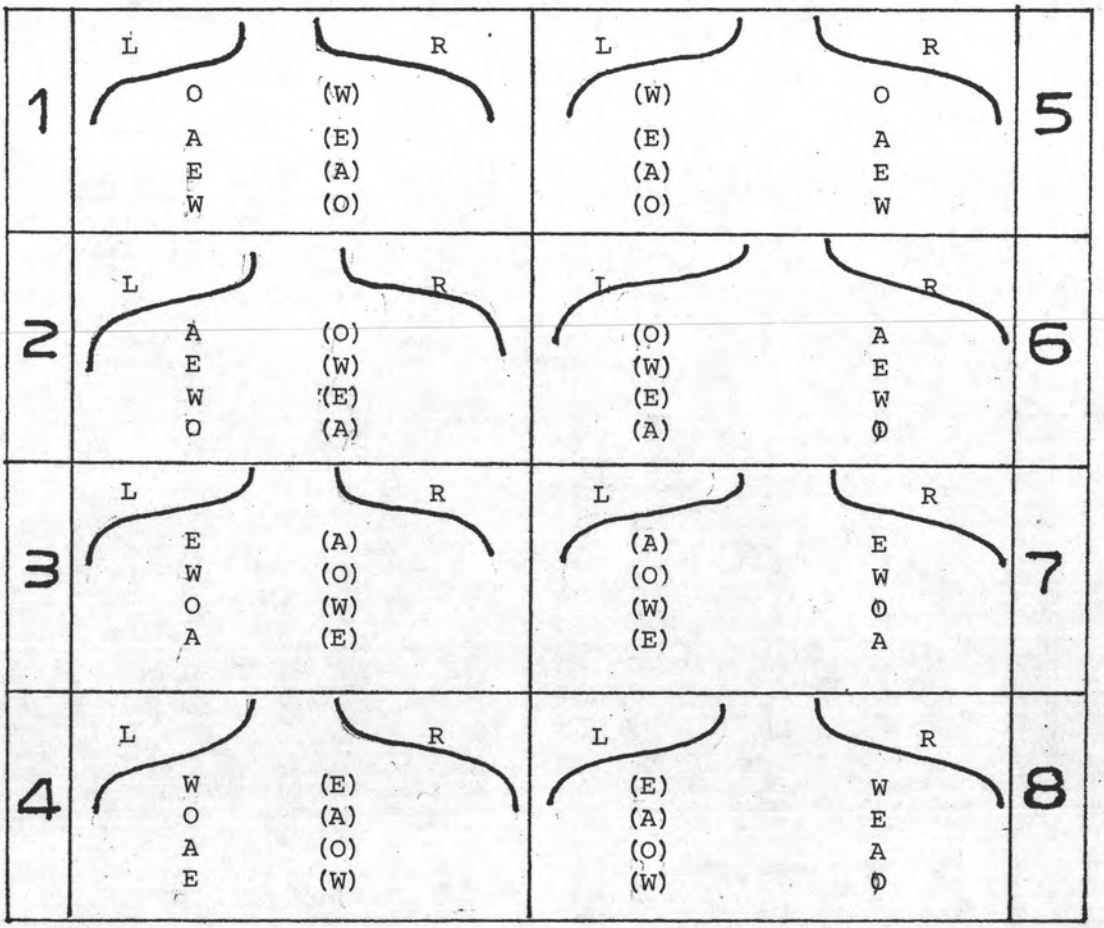
5.3.3 การเกิดตุ่มใส (Vesicles)

5.3.4 การบวมน้ำ (Edema)

5.3.5 อื่น ๆ

และต่อจากนี้อีก 3 วัน และ 7 วัน ก็บันทึกผลความผิดปกติที่เกิดขึ้นดังกล่าวอีกครั้ง

5.4 ในกรณีที่อาสาสมัครไม่มีอาการผิดปกติดังกล่าว ก็ให้ทำการทดสอบซ้ำอีกครั้งหนึ่งในบริเวณเดิมที่ทำการทดสอบนั้น โดยเว้นระยะห่างจากการทดสอบครั้งแรกเป็นเวลา 1 สัปดาห์



O = White Ointment (Oleaginous Ointment Base)

A = Hydrophilic Petrolatum (Absorption Ointment Base)

E = Hydrophilic Ointment (Emulsion Ointment Base)

W = Polyethylene Glycol Ointment (Water Soluble Ointment Base)

(O)= Clindamycin 1% W/W in White Ointment

(A)= Clindamycin 1% W/W in Hydrophilic Petrolatum

(E)= Clindamycin 1% W/W in Hydrophilic Ointment

(W)= Clindamycin 1% W/W in Polyethylene Glycol Ointment

L = Left

R = Right

รูปที่ 14 ตำแหน่งบนผิวหนังแผ่นหลังที่ปิดแพตช์ เพื่อทดสอบการระคาย เคือง ผิวหนัง แบบต่าง ๆ ทั้งหมด 8 แบบ