

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

สารที่ใช้ในการทดลอง

1. ตัวยาอินโดเมธาซิน (Indomethacin) ของบริษัท Ferro Metal & Chem.
2. อาเคเซีย (Acacia powder BP)
3. เจลละตินชนิด 140 bloom
4. เจลละตินชนิด 250 bloom
5. กลีเซอริน (glycerine USP xx)
6. ฟอรัมาลดีไฮด์ (Formaldehyde nim 37 % pro analysi) ของบริษัท E. merck
7. กรดเกลือ (Hydrochloric acid; AR grade)
8. ไอโซโพรพานอล (Isopropanol; AR grade) ของ Riedel-de-haenag
9. แอลกอฮอล์ (Alcohol USP)
10. ก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen gas)
11. Tween 80
12. โพแทสเซียมฟอสเฟต (Potassium phosphate monobasic; AR grade) ของ Mallinckrodt
13. โซเดียมฟอสเฟต (Sodium phosphate dibasic anhydrous ชนิด granular; AR grade) ของ Mallinckrodt
14. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, AR grade)
15. คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate, AR grade)
16. น้ำมันพาราฟิน (Mineral oil)



เครื่องมือที่ใช้ทดลอง

1. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Julabo V)
2. เครื่องคนซึ่งสามารถปรับความเร็วได้ (Virtis mixer)
3. เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ
4. เครื่องชั่งอย่างละเอียด (Single pan and analytical balance) ของ Mettler และ Sauter
5. เต้าไฟฟ้า
6. เครื่องวัด pH
7. โกร่งเคลือบ
8. แร้งขนาดต่าง ๆ พร้อมทั้งเครื่องเขย่า (Fisher)
9. เครื่องมือสำหรับกลั่นสกัด (Reflux apparatus)
10. กล้องจุลทรรศน์ทั้งชนิดธรรมดาและชนิดอิเล็กทรอนิกส์แบบ Scanning (JSM-35 CF Scanning microscope)
11. เครื่องมือสำหรับวัดอัตราการปลดปล่อยด้วยยาตาม USP xx (Dissolution Apparatus USP XX method II)
12. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectronic 2000 ของ Bausch & Lomb)
13. เครื่องอุปกรณ์จ่ายแก๊สไนโตรเจน (Nitrogen gas supplier)

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยแบ่งการทดลองเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. การทดลองขั้นพื้นฐานเพื่อหาสภาวะเหมาะสมในการเตรียมไมโครแคปซูล
2. การเตรียมไมโครแคปซูลตามผลที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 และศึกษาผลต่าง ๆ ที่มีต่อ

คุณภาพของไมโครแคปซูล โดยศึกษาถึง

- 2.1 การใช้อัตราส่วนของตัวยา : สารเคลือบ ต่าง ๆ กัน
- 2.2 การใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารที่ทำให้ผนังไมโครแคปซูลแข็งตัว
- 2.3 การใช้เวลาในการทำให้แข็งตัวต่าง ๆ กัน

3. ทดสอบคุณภาพของไมโครแคปซูลที่เตรียมจากขั้นตอนที่ 2 โดยศึกษาถึง
 - 3.1 ปริมาณยาเป็นเปอร์เซ็นต์ที่มีอยู่ในไมโครแคปซูล
 - 3.2 ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคของไมโครแคปซูล
 - 3.3 อัตราการปลดปล่อยตัวยาออกจากไมโครแคปซูล
1. การทดลองขั้นพื้นฐานเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไมโครแคปซูล

สภาวะที่มีผลต่อการเตรียมไมโครแคปซูลที่จะศึกษา มีดังนี้คือ

ความเข้มข้นของเจลละติน และอะเคเซีย pH ในการเกิดโคอาเซอร์เวท
ระยะเวลาในการเกิดโคอาเซอร์เวทที่สมบูรณ์ การใช้สารที่ทำให้ผนังไมโครแคปซูลแข็งตัว
และระยะเวลาที่ใช้ การปรับสภาพ pH ภายหลังจากทำให้ผนังแข็งตัว

สภาวะที่ต้องควบคุมให้เกิดโคอาเซอร์เวท มีดังนี้

สารเคลือบ : ใช้อะเคเซียและเจลละติน ในอัตราส่วนเท่ากันคือ 1:1

การควบคุมอุณหภูมิ : 40 ± 1 องศาเซลเซียส

อัตราเร็วในการคน : 350 รอบต่อนาที

อุณหภูมิในการแข็งตัว : 10 องศาเซลเซียส

การเตรียมน้ำยาต่าง ๆ ปรากฏในภาคผนวก ค

1.1 การทดลองใช้เจลละตินชนิด 250 bloom

1.1.1 ความเข้มข้นของสารเคลือบ ใช้สารละลายของเจลละตินและ
อะเคเซียในความเข้มข้นที่เท่ากัน คือ 2 % , 3 % และ 5 % ตามลำดับ pH ด้วยกรด
เกลืออย่างเจือจาง ให้มี pH 4.0 เพื่อให้เกิดโคอาเซอร์เวท สุ่มตัวอย่างไปส่องกล้อง
จุลทรรศน์ สังเกตการเกิดโคอาเซอร์เวทรอบผงยา

1.1.2 pH ในการเกิดโคอาเซอร์เวท ใช้กรดเกลืออย่างเจือจาง
ปรับพีเอชให้เป็น 3.0, 4.0 และ 5.0 ตามลำดับ นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตการ
เกิดโคอาเซอร์เวท

1.1.3 เวลาในการเกิดโคอาเซอร์เวทที่สมบูรณ์ ภายหลังจากปรับ
pH ด้วยกรดเกลืออย่างเจือจางแล้ว ปล่อยให้ปั่นนาน 15, 30, 45 และ 60 นาที ตามลำดับ

ลุ่มตัวอย่างตามเวลาที่กำหนดไปส่องกล้องจุลทรรศน์ สังเกตลักษณะของโคอาเซอร์เวทที่เกิดว่ามี ความคงสภาพหรือไม่

1.1.4 การใช้สารที่ทำให้ผนังไมโครแคปซูลแข็งตัวและระยะเวลาที่ใช้ ภายหลังจากโคอาเซอร์เวทเกิดสมบูรณ์ เติมสารละลายอิมตัวของฟอร์มัลดีไฮด์ (37 % w/w) ลงไป โดยใช้ความเข้มข้น 2.5 %, 5.0 % และ 10.0 % ตามลำดับ ระยะเวลาในการทำให้แข็งตัวคือ 0.5, 1.0 และ 2.0 ชั่วโมง ตามลำดับ ลุ่มตัวอย่างไปส่อง กล้องจุลทรรศน์ สังเกตดูความแข็งแรงและความคงสภาพของผนังของไมโครแคปซูล นอกจากนี้ ยังใช้สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 5 % ในการทำให้เกิดการแข็งตัวแทนสารละลายอิมตัว ของฟอร์มัลดีไฮด์ จากนั้นสังเกตผลที่เกิดขึ้น

1.1.5 การใช้สารช่วยการแขวนกระจายของผงยา ทดลองใช้ กลีเซอรินจำนวนเล็กน้อย บดกระจายผงยาก่อนนำไปแขวนกระจายในสารละลายของฮาเคเซีย ดูผลเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่ใช้กลีเซอริน

1.1.6 การปรับสภาพ pH ให้เป็นด่างภายหลังจากที่ผนังของไมโครแคปซูล แข็งตัว ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ หยดลงไปเพื่อปรับสภาพ pH เป็น 9.0 ภายหลังจากการแข็งตัว ของไมโครแคปซูล สังเกตการเปลี่ยนแปลง

1.2 การทดลองใช้เจลดินชนิด 140 bloom ศึกษาผลต่าง ๆ เช่นเดียวกับ เจลดินชนิด 250 bloom

2. เตรียมไมโครแคปซูลของอินโคเมธาซินตามผลในข้อ 1

เตรียมไมโครแคปซูลตามวิธีในแผนภาพ ซึ่งได้ผลจากข้อ 1 โดยเตรียมครั้งละ 400 มิลลิลิตร กำหนดปริมาณสารเคลือบในจำนวนแน่นอน คือ ฮาเคเซียและเจลดินอย่างละ 4.0 กรัม ปริมาณตัวยาลดลงตามอัตราส่วนตัวยาต่อสารเคลือบที่ต้องการ เพื่อควบคุมความหนืด ให้คงที่ ซึ่งจะมีผลต่อการเกิดโคอาเซอร์เวทและคุณสมบัติของผนัง ทำการศึกษาผลต่าง ๆ ดังนี้

2.1 อัตราส่วนของตัวยาต่อสารเคลือบ ใช้อัตราส่วนตัวยาต่อสารเคลือบ 1:1, 1:2, 1:4 และ 1:8 ตามลำดับ

2.2 ความเข้มข้นของสารที่ทำให้ผนังไมโครแคปซูลแข็งตัว ใช้สารละลาย อิมตัวของฟอร์มัลดีไฮด์ ในความเข้มข้น 2.5, 5.0 และ 10.0 % ตามลำดับ

แผนภาพแสดงการเตรียมอินโดเมธาซินไมโครแคปซูล

สารละลายของอะเคเชีย 2 % w/v

อุ่นให้มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

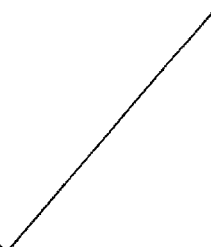


ผงยาอินโดเมธาซิน ซึ่งทำให้เปียก

ทั่วด้วยกลีเซอริน

สารละลายของเจละติน 2 % w/v

อุ่นให้มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



- ผสมรวมกันแล้วอุ่นไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งมีอุณหภูมิ 40 + 1 องศาเซลเซียส
- ปั่นด้วยเครื่องผสมที่มีความเร็ว 350 รอบต่อนาที
- เติมกรดเกลือเจือจางที่ละลายจนวัด pH ของสารผสมได้ 4.0
- ปล่องยให้ปั่นต่อเนื่อง 45 นาที

ได้โคอาเซอร์เวทที่สมบูรณ์เกิดขึ้นรอบผงยา

- เติมสารละลายอิมพัชของฟอร์มัลดีไฮด์
- ทำให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 10 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำแข็ง
- ปั่นต่อไปเรื่อย ๆ ตามเวลาที่กำหนด

ได้ไมโครแคปซูลของยาเกิดขึ้นเป็นเม็ดเล็ก ๆ

- ล้างด้วยน้ำ 3 ครั้ง
- ล้างด้วยไอโซโพรพานอล 5 ครั้ง

ได้ไมโครแคปซูลที่ปราศจากน้ำ

- เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน

ได้อินโดเมธาซินไมโครแคปซูลที่เป็นผงแห้ง

ลักษณะคล้ายแกรนูล (granules)

2.3 ระยะเวลาในการแข็งตัว ใช้เวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำไมโครแคปซูลแห้งที่เตรียมได้ทั้งหมด $4 \times 3 \times 2 = 24$ ตำรับ ตามตารางที่ 1 ไปทดสอบเพื่อประเมินคุณภาพตามข้อ 3 ต่อไป (แต่ละตำรับเตรียมซ้ำกัน 3 ครั้ง)

การเตรียมไมโครแคปซูลของอินโดเมธาซินนี้ ต้องบดผงยาและนำไปแรงผ่านร่งขนาด 80 mesh ก่อน เพื่อควบคุมขนาดของผงยามีให้มีงที่หยาบเกินไป จากนั้นนำผงที่ร่งแล้วมาชั่งตามจำนวนที่ต้องการนำไปตกับกลีเซอรินจำนวนเล็กน้อยในโกร่งเมื่อผงยาเปียกทั่วแล้ว จึงบดรวมกับสารละลายของอะเคเซีย นำไปลุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 40 ± 1 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเติมสารละลายของเจละดินซึ่งลุ่นให้มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเช่นกัน ภาชนะที่ใส่ใช้ขนาด 500 มิลลิลิตร ตลอดการทดลอง

3. การประเมินคุณภาพของไมโครแคปซูล

3.1 การหาปริมาณเนื้อหาของที่มีอยู่ในไมโครแคปซูล ชั่งไมโครแคปซูลแห้งให้ได้ปริมาณ 200 มิลลิกรัม นำมาบดในโกร่งเพื่อทำลายผนังของไมโครแคปซูล จากนั้นถ่ายใส่ขวดแก้วก้นกลม (round bottom flask) ที่มีขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมแอลกอฮอล์ (alcohol USP) ลงไปจำนวน 100 มิลลิลิตร นำไปต่อเข้ากับเครื่องมือกลั่นสกัด (reflux apparatus) ทำการกลั่นสกัดนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น กรองเอาแต่น้ำใส (filtrate) นำไปวิเคราะห์หาปริมาณของตัวยาอินโดเมธาซิน โดยการวัดค่าการดูดแสง (absorbance) ที่ความยาวช่วงคลื่น 318.5 nm ⁽⁴¹⁾ ด้วยเครื่องมือสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectronic 2000) เปรียบเทียบกับค่าการดูดแสงของแอลกอฮอล์ ซึ่งใช้เป็น blank โดยการเทียบเส้นโค้งมาตรฐานจะทราบค่าความเข้มข้นของตัวยาออกมา นำมาคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของเนื้อหาของที่มีอยู่ในไมโครแคปซูล

3.2 การหาขนาดและการกระจายขนาดของอินโดเมธาซินไมโครแคปซูลตลอดจนการศึกษาลักษณะพื้นผิวของผนังไมโครแคปซูล

3.2.1 การหาขนาดและการกระจายขนาด ใช้วิธีส่องกล้องจุลทรรศน์ (microscopic method) โดยดัดแปลงมาจาก BP^(51,52) ดังนี้คือ นำไมโครแคปซูลแห้งมากระจายตัวอย่างเจือจางในน้ำมันพาราฟิน (mineral oil) จากนั้นหยดบนแผ่นสไลด์ (slide) ปิดด้วย cover slid นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ที่มีสเกลบอกขนาดติดอยู่ เลื่อนสไลด์ไปทีละ 4 มิลลิเมตร ตามความกว้างและยาวจนครบ 25 พื้นที่ ในแต่ละพื้นที่ก็นับขนาด

ตารางที่ 1 แสดงถึงสารประกอบต่าง ๆ รวมทั้งระยะเวลาในการแข็งตัวของตำรับต่าง ๆ ที่เตรียมในข้อ 2

ตำรับ	อัตราส่วนตัวยา : สารเคลือบ	% พอร์มาลดีไฮด์	ระยะเวลาในการแข็งตัว (ชั่วโมง)
1	1:1	2.5	1
2	1:1	5.0	1
3	1:1	10.0	1
4	1:1	2.5	2
5	1:1	5.0	2
6	1:1	10.0	2
7	1:2	2.5	1
8	1:2	5.0	1
9	1:2	10.0	1
10	1:2	2.5	2
11	1:2	5.0	2
12	1:2	10.0	2
13	1:4	2.5	1
14	1:4	5.0	1
15	1:4	10.0	1
16	1:4	2.5	2
17	1:4	5.0	2
18	1:4	10.0	2
19	1:8	2.5	1
20	1:8	5.0	1
21	1:8	10.0	1
22	1:8	2.5	2
23	1:8	5.0	2
24	1:8	10.0	2

อนุภาคของผงยาที่เห็นออกมาเป็นช่วง ๆ บันทึกความถี่ในแต่ละช่วง การนับต้องอ่านจำนวนอนุภาคทั้งหมดได้อย่างน้อยไม่ต่ำกว่า 625 อนุภาค จากนั้นนำค่าความถี่ (frequency) และช่วงขนาด (size range) มาสร้างกราฟเปอร์เซ็นต์ความถี่สะสม (cumulative % undersize) เทียบกับขนาดของอนุภาค (particle size) เพื่อนำมาหาค่าตัวกลางมัธยฐาน (median) นอกจากนี้ข้อมูลยังนำมาคำนวณหาค่าตัวกลางเลขคณิต (mean) และฐานนิยม (mode) ด้วย

3.2.2 การศึกษาลักษณะพื้นผิวของไมโครแคปซูล นำไมโครแคปซูลแห้งที่ต้องการศึกษา มาฉาบด้วยทอง-พาลาเดียม (gold-Paladium coat) แล้วนำไปถ่ายภาพดูลักษณะพื้นผิวของไมโครแคปซูลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนนิ่ง (Scanning Electron microscope) ของ JSM-35 CF Scanning microscope ภาพถ่ายใช้กำลังขยาย 6000 เท่า

3.3 ศึกษาการปลดปล่อยตัวยาออกจากไมโครแคปซูล

การทดลองใช้วิธีวัดอัตราการละลายของตัวยาโดยเครื่องมือสำหรับหาอัตราการปลดปล่อยตัวยาตาม USP XX จะสามารถนำข้อมูลมาอธิบายการปลดปล่อยตัวยายอกจากไมโครแคปซูลได้^(22,43)

การทดลองนี้ดัดแปลงมาจากการวัดอัตราการละลายของตัวยาที่กำหนดไว้ในเภสัชตำรับ USP XX NF XV method II ตามปรากฏในภาคผนวก ข

เครื่องมือที่ใช้ทดลองคือ เครื่องวัดอัตราการละลายที่เข้ามาตรฐาน USP XX NF XV method II ส่วนสารละลายที่ใช้ทดสอบคือ Sorensen's phosphate buffer pH 7.2 ซึ่งมี tween 80 0.02 % ปริมาณ 750 มิลลิลิตร^(50,53,54) อัตราเร็วในการคนคือ 100 รอบต่อนาที ระยะเวลาในการลุ่มตัวอย่างใช้ 10 ช่วง คือ 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 150 และ 180 นาที ตามลำดับ สภาวะในการทดลองเป็นแบบ sink condition⁽²⁸⁾

วิธีดำเนินการทดลอง คือ ชั่งไมโครแคปซูลจำนวน 200 มิลลิกรัมอย่างแน่นอน (accurate) นำมาใส่ในสารละลายที่ใช้ทดสอบดังกล่าวข้างต้น ซึ่งอุณหภูมิ 37 ± 0.5 องศาเซลเซียส คนด้วยใบพัดที่มีอัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที ตลอดการทดลอง ลุ่มตัวอย่างตาม

ช่วงเวลาย่างต้นผ่านเครื่องกรองครึ่งละ 5 มิลลิตร จากนั้นนำไปใส่หลอดทดลอง ทุกครั้งที่มีการ
 สุ่มตัวอย่างออกมาจะต้องเติมสารละลายลงไปทดแทนในปริมาณเท่ากับที่ดูดขึ้นมา นำตัวอย่าง
 ทั้งหมดที่ได้ ไปทำให้เจือจางในความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการวัดค่าการดูดแสง
 (absorbance) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณตัวยา ที่ความยาวช่วงคลื่น 318.5 nm⁽⁴¹⁾
 วัดเปรียบเทียบโดยใช้ตัวทำละลาย (dissolution medium) เป็น blank

ข้อมูลต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ได้จะนำมาคำนวณเป็น % การปลดปล่อยตัวยา แล้วสร้าง
 กราฟเทียบกับเวลาและ เวลา² เพื่อนำไปหาค่าคงที่ในการปลดปล่อยตัวยา เพื่อเปรียบ
 เทียบการปลดปล่อยตัวยาของไมโครแคปซูลตำรับต่าง ๆ