

บทที่ 2

วิธีการที่ใช้ในการศึกษา

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Theophylline (anhydrous) (Lot.no.200509052, Labscan asia Co.,Ltd., China)
2. Microcrystalline cellulose (Avicel[®] PH102) (Lot.no.7552C, Onimax Co., Ltd., Brazil)
3. Flowlac[®] 100 (Lot.no. L0722 A4952, Herstellor/Molkerei MEGGLE Wasserburg GmbH&Co.KG, Germany)
4. Magnesium stearate (Batch no. 11012408, The Dow Chemical Company, USA)
5. Colloidal silicon dioxide (Aerosil[®] 200, Control no. 0060448, Degussa-Hüls AG, Belgium)
6. Hydroxypropyl methylcellulose (Anycoat-C[®] AN15, Batch no. CFN15-60622, Sumsung, Korea)
7. Sodium Bicarbonate (Batch no.0557083 และ 0437075, Fisher Scientific, UK)
8. Eudragit[®] RL 30D (Lot no. G100516088, Rohm GmbH&Co.KG, Germany)
9. Diethyl phthalate (DEP), 99.5% (Batch no. MKBB5232, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany)
10. Polyethylene glycol 6000 (PEG 6000, Lot no. 1174834 11405087, Fluka Chemie GmbH, Germany)
11. Hydrochloric acid 37% (Batch no. 09 03 0229, RCI Labscan Ltd., Thailand)
12. Talcum (Batch no. 6020, China Haicheng Doyo Talc Powder Factory, China)
13. Glyceryl monostearate (Batch no. CG91470001, Cognis Thai, Thailand)

เครื่องมือที่ใช้ทำการทดลอง

1. Analytical balance (Model 300A, Precisa, Switzerland)
2. Hot air oven (Model 500, Memmert GmbH, Germany)
3. single punch tableting machine (Model YH06, Yeo Heng Co., Ltd., Thailand)
4. Perforated pan coater (Model NR-COTA18® , N.R. Industries Co., Ltd, Thailand)
5. Feed pump (Serial no. 5100039, Watson-Marlow Limited, England)
6. Hot air oven (Model 500, Memmert GmbH, Germany)
7. Magnetic stirrer (Model RCT-B, KIKA, Germany)
8. pH meter (Mettler Toledo, FE20 FiveEasy™ pH, USA)
9. UV/Visible Spectrophotometer (Varian, Australia)
10. Thickness Tester, Micrometer Caliper (Model 730, Mitutoyo, Japan)
11. Stroke-Monsanto Hardness Tester (Vankel, U.S.A.)
12. Friabilator (Erweka Abrasion Tester) (Model 45-2200, Vankel, U.S.A.)
13. Laboratory test sieve (Mesh no.60, Hann, Germany)
14. Dissolution test unit (Model VK-7000, Venkel, U.S.A.)
15. Hand-blender (Moulinex® , France)
16. Laboraory test sieve (Mesh no.60, Haan, Germany)
17. Texture Analyser (TA.XT. plus Texture analyzer, Stable Micro Systems, England)
18. Thickness gauge (Minitest 600, Erichsen, Hemer, Germany)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เตรียมและประเมินคุณสมบัติของยาเม็ดแกน

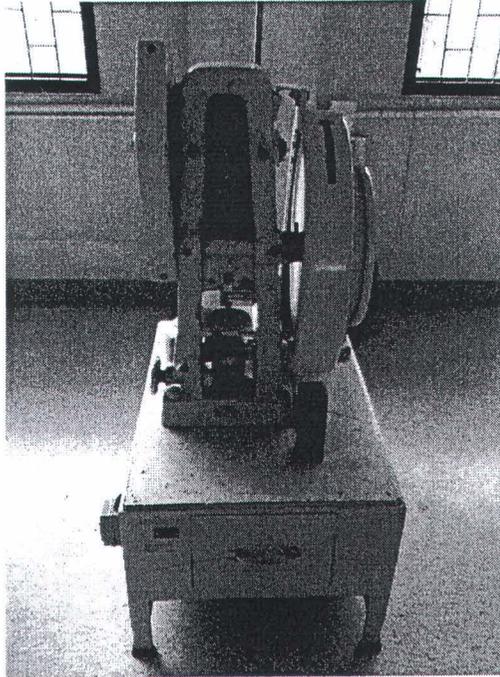
ยาเม็ดแกนเตรียมโดยวิธีการตอกโดยตรง (direct compression) โดยใช้ anhydrous theophylline เป็นยาต้นแบบ ใช้ lactose (Flowlac® 100) และ microcrystalline cellulose (Avicel® PH 102) เป็นสารเพิ่มปริมาณ ใช้ magnesium stearate และ Aerosil® 200 เป็นสารช่วยลื่น หลังจากผสมตัวยาและส่วนประกอบในตำรับเข้าด้วยกันแล้ว นำไปตอกเป็นยาเม็ดแกน ในการตอกยาเม็ดใช้เครื่องตอกแบบสากลเดี่ยวที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 9.53 มิลลิเมตร (ขนาด 3/8 นิ้ว) ให้เม็ดยามีน้ำหนักประมาณ 300 มิลลิกรัม มีความแข็งประมาณ 8-10 กิโลกรัม จากนั้นนำยาเม็ดแกนที่เตรียมได้ไปประเมินคุณสมบัติเบื้องต้น

สูตรตำรับของยาเม็ดแกน theophylline

Formula	amount/tab	working formula (g)
Anhydrous Theophylline	20 mg	66.67
Avicel® PH102	140 mg	466.67
Flowlac® 100	140 mg	466.67
Magnesium stearate	0.50%	5
Aerosil® 200	0.50%	5
total		1010

วิธีการเตรียมยาเม็ดแกน theophylline

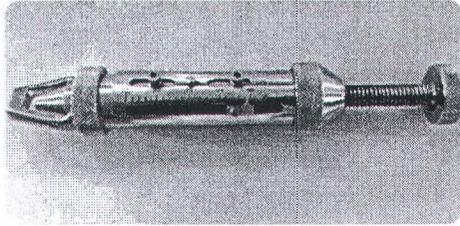
1. ชั่ง Anhydrous Theophylline, Avicel® PH102, และ Flowlac® 100 ที่ผ่านร่อนขนาด 60 mash แล้วตามน้ำหนักของ working formulation ที่คำนวณไว้
2. นำส่วนประกอบในข้อ 1 ผสมรวมกันตาม geometric dilution จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลานาน 10 นาที
3. ชั่ง magnesium stearate, Aerosil® 200 ร่อนผ่านร่อนขนาด 60 mash จากนั้นชั่งน้ำหนักมาตามปริมาณที่คำนวณได้ใน working formula
4. นำส่วนประกอบในข้อ 2 และ 3 ผสมรวมกันตาม geometric dilution จากนั้นทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลานาน 3-5 นาที
5. นำส่วนผสมที่ได้ทั้งหมดนำมาตอกด้วยเครื่องตอกแบบสากลเดี่ยว โดยกำหนดให้มีน้ำหนักเม็ดยาประมาณ 300 มิลลิกรัม และมีความแข็งประมาณ 8-10 กิโลกรัม



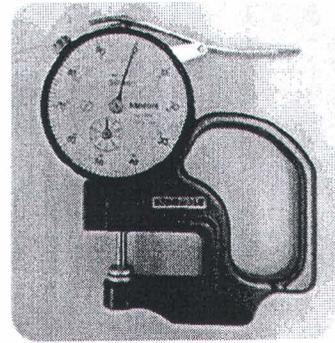
รูปที่ 2-1 เครื่องตอกยาเม็ด Single punch machine

การประเมินคุณสมบัติยาเม็ดแกน

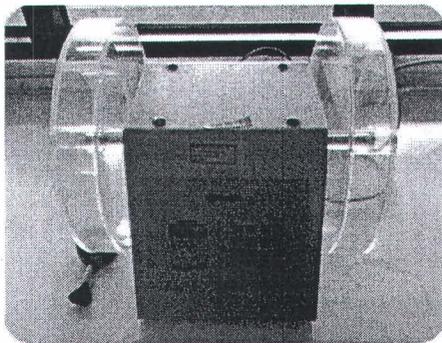
- ความแปรปรวนของน้ำหนัก (weight variation) ตาม USP XXIII ทำโดยการสุ่มตัวอย่างยาเม็ดที่เตรียมได้ ต่ำรับละ 20 เม็ด ซึ่งน้ำหนักจนครบ 20 เม็ด หาค่าเฉลี่ยและร้อยละของการเบี่ยงเบน
- ความแข็ง (hardness) ทำโดยสุ่มตัวอย่างยาเม็ดที่เตรียมได้ต่ำรับละ 10 เม็ด นำมาวัดความแข็งโดยใช้เครื่อง Stoke-Monsanto hardness tester แล้วหาค่าเฉลี่ยและร้อยละของการเบี่ยงเบน
- ความกร่อน (friability) ทำโดยสุ่มตัวอย่างยาเม็ดที่เตรียมได้ต่ำรับละ 20 เม็ด (น้ำหนักรวมไม่น้อยกว่า 6.5 กรัม) นำมาหาค่าความกร่อนโดยใช้เครื่อง friabilator ด้วยอัตราเร็ว 25 rpm เป็นเวลา 4 นาที หาน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไป แล้วนำมาคำนวณร้อยละของความกร่อน
- ความหนา (thickness) ทำโดยสุ่มตัวอย่างยาเม็ดที่เตรียมได้ต่ำรับละ 10 เม็ด นำมาวัดความหนาโดยใช้เครื่อง micrometer caliper แล้วหาค่าเฉลี่ยและร้อยละของการเบี่ยงเบน
- การแตกกระจายตัว (Disintegration) ทำการทดสอบการแตกกระจายตัว (disintegration study) ตาม USP XXIII โดยการสุ่มตัวอย่างยาเม็ดแกนต่ำรับละ 6 เม็ดมาทดสอบ บันทึกเวลาที่ยาเม็ดแตกกระจายตัวแล้วหาค่าเฉลี่ยและร้อยละของการเบี่ยงเบน
- Dissolution study ศึกษาการปลดปล่อยตัวยาออกจากยาเม็ดแกนที่เวลาต่างๆ ทดสอบในเครื่องวัดการละลาย (USP paddle dissolution apparatus)



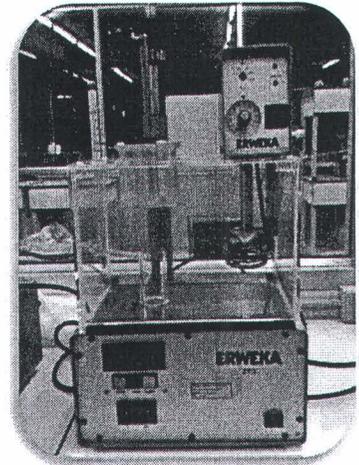
รูปที่ 2-2 เครื่องวัดความแข็งเม็ดทราย



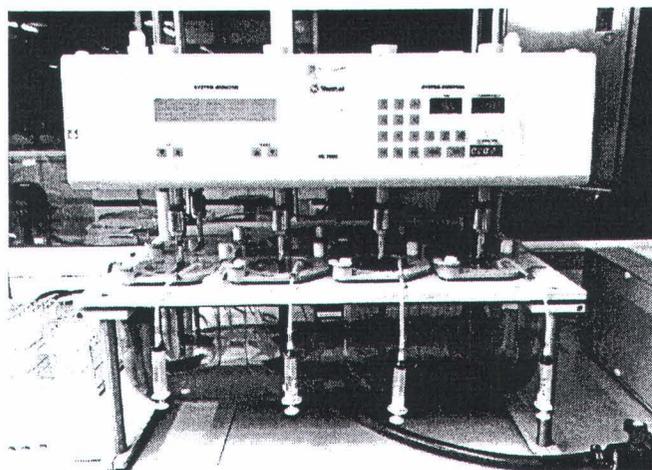
รูปที่ 2-3 เครื่องวัดความหนาเม็ดทราย



รูปที่ 2-4 เครื่องประเมินความกร่อนเม็ดทราย



รูปที่ 2-5 เครื่องทดสอบการแตกกระจายตัว



รูปที่ 2-6 เครื่องทดสอบการปลดปล่อยตัวยา

2. การเตรียมยาเม็ดคอลลอยด์และประเมินคุณสมบัติยาเม็ดคอลลอยด์

ศึกษาหาสภาวะการเคลือบที่เหมาะสม จากนั้นนำยาเม็ดแกนที่ได้มาทำการเคลือบด้วยชั้นเคลือบป้องกัน(protective layer) ชั้นเคลือบทำให้เกิดแก๊ส (gas forming layer) และชั้นเคลือบกักเก็บแก๊ส (gas-entrapped polymeric membrane) ตามลำดับ โดยใช้ perforated pan coater

- ชั้นเคลือบป้องกัน (protective layer) ประกอบด้วย hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) ซึ่งช่วยชะลอการปลดปล่อยตัวยา ไม่ให้มีการปลดปล่อยออกมาในอัตราที่รวดเร็วกเกินไป polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) ทำหน้าที่เป็น plasticizer และใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

สูตรน้ำยาเคลือบฟิล์มชั้น protective layer

		Working formula (g)
HPMC (Anycoat-C [®] AN15)	5% w/w	27.5
PEG 6000	10% based on HPMC weight	2.75
น้ำ	qs. to	550

สภาวะที่ใช้เคลือบชั้นเคลือบป้องกัน

สูตรน้ำยาที่ใช้มี solid content เท่ากับ 5% w/w

- Preheat (50°C) 30 min (pan speed 5 rpm)
- Batch size 1 kg
- Pan speed 15 rpm
- Inlet temperature 48 - 50°C
- Outlet temperature 39 - 410°C
- Nozzle diameter 1 mm
- Atomizing air pressure 2.5 bar
- Spray rate 5-10 ml/min



นำน้ำยาเคลือบมาทำการเคลือบโดยให้มีน้ำหนักของยาเม็ดเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 2 ของน้ำหนักยาเม็ดเดิม (2% weight gain) หลังจากเคลือบเสร็จแล้ว ลด pan speed ลงเหลือ 5 rpm และให้ความร้อนเพื่อให้เม็ดยาแห้งต่อไปที่ 50°C ประมาณ 30 นาที เมื่อทำการเคลือบฟิล์มชั้น protective layer เรียบร้อยแล้ว ในขั้นต่อไปคือการเคลือบชั้นเคลือบทำให้เกิดแก๊ส

- ชั้นเคลือบทำให้เกิดแก๊ส (gas forming layer) ประกอบด้วย sodium bicarbonate ซึ่งเป็นสารทำให้เกิดแก๊ส และใช้ HPMC เป็นสารช่วยยึดเกาะกับยาเม็ดแกน

สูตรน้ำยาเคลือบฟิล์มชั้น effervescent layer

		Working formula (g)
NaHCO ₃	80% w/w of solid content	96
HPMC	20% w/w of solid content	24
PEG 6000	10% w/w of HPMC	2.4
น้ำ	qs. to	1200

สภาวะที่ใช้เคลือบชั้น effervescent layer

- สูตรน้ำยาที่ใช้มี solid content เท่ากับ 10% w/w
- Preheat (50°C) 30 min (pan speed 5 rpm)
- Batch size 1 kg
- Pan speed 15 rpm
- Inlet temperature 48 - 50°C
- Outlet temperature 39 - 41°C
- Nozzle diameter 1 mm
- Atomizing air pressure 2.5 bar
- Spray rate 5-10 ml/min

นำมาทำการเคลือบโดยให้มีน้ำหนักของยาเม็ดเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 12 ของน้ำหนักยาเม็ดเดิม (12% weight gain of protective layer coated tablets) หลังจากทำการเคลือบฟิล์มในชั้น effervescent layer แล้วจะทำการเคลือบในขั้นต่อไป คือชั้นเคลือบกักเก็บแก๊ส



- ชั้นเคลือบกักเก็บแก๊ส (gas-entrapped membrane) ประกอบด้วยพอลิเมอร์อะคริลิก เช่น Eudragit® RL30D ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ให้ฟิล์มที่มีลักษณะมีความยืดหยุ่นสูงและทนต่อแรงดันที่เกิดจากแก๊สเหมาะสำหรับระบบนำส่งยาละลายตัว โดยใช้ diethyl phthalate (DEP) เป็น plasticizer ในชั้นนี้จะทำการเคลือบ 2 ระดับชั้นด้วยกัน คือ 5 และ 10% ของน้ำหนักเม็ดยาที่เคลือบชั้น effervescent layer (5 and 10% weight gain of effervescent coated tablets) ในชั้นนี้จะเติมสารกันติด (Anti-tacking agents) เพื่อช่วยลดปัญหาการเหนียวติดกันของชั้นเคลือบกักเก็บแก๊สของยาเม็ดละลายตัว โดยใช้สารกันติดชนิดต่างๆ เช่น magnesium stearate, talc, colloidal silicon dioxide และ glyceryl monostearate (GMS) ในปริมาณที่ต่างกัน คือ 5 10 20 และ 30% ของน้ำหนักเม็ดยาที่เคลือบชั้น effervescent layer (5, 10, 20 and 30% weight gain of solid polymer)

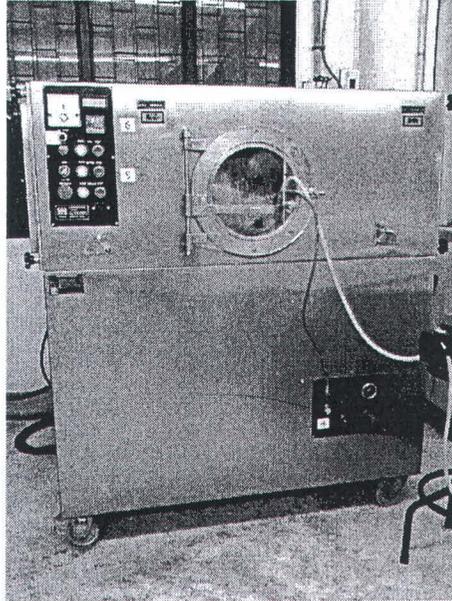
สูตรน้ำยาเคลือบในชั้น gas-entrapped membrane

		Working formula (g)
Eudragit® RL30D	15% w/w	166.67
Diethyl phthalate	20% based on Eudragit® weight	10
Anti-tacking agent	0 5 10 20 และ 30% based on Eudragit® weight	
น้ำ		166.67

สภาวะที่ใช้เคลือบ

- สูตรน้ำยาที่ใช้มี solid content เท่ากับ 15% w/w
- Preheat (50°C) 30 min (pan speed 5 rpm)
- Batch size 1 kg
- Pan speed 15 rpm
- Inlet temperature 48 - 50°C
- Outlet temperature 39 - 41°C
- Nozzle diameter 1 mm
- Atomizing air pressure 2.5 bar
- Spray rate 5-8 ml/min

นำมาทำการเคลือบโดยให้มีน้ำหนักของยาเม็ดเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 5 และ 10 ของน้ำหนักยาเม็ดเดิม (5 and 10% weight gain of effervescent coated tablets)



รูปที่ 2-7 เครื่องเคลือบยาเม็ด (Perforated pan coater)

การประเมินคุณสมบัติยาเม็ดลอยตัว

1. ความสามารถในการลอยตัว (floating ability) ใน 0.1 N HCl ได้แก่
 - ระยะเวลาที่ใช้ตั้งแต่เม็ดยาสัมผัสตัวกลางจนเริ่มลอยตัว (time to float)
 - ระยะเวลาที่เม็ดยาสามารถลอยตัวอยู่ได้ในตัวกลาง (floating time)

โดยจะทำการทดสอบตำรับละอย่างน้อย 3 เม็ด ทำการทดสอบด้วยเครื่องวัดการละลาย (USP paddle dissolution apparatus II) โดยยาจะถูกใส่ใน glass vessel ที่บรรจุตัวกลางคือ 0.1 N HCl (pH 1.2) ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิประมาณ 37.0 °C และอัตราเร็วการหมุนของ paddle เท่ากับ 50 rpm จากนั้นสังเกตและบันทึก time to float และ floating time

2. Dissolution study – ศึกษาการปลดปล่อยตัวยาออกจากยาเม็ดลอยตัว ทดสอบในเครื่องวัดการละลาย (USP paddle dissolution apparatus) โดยใช้ตัวกลางเป็น 0.1 N HCl

การศึกษการปลดปล่อยตัวยาของยาเม็ดลอยตัว มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2. การเตรียม standard curve ของยา theophylline ใน 0.1 N HCl solution (pH 1.2)

- 1.1 ชั่งผงยา theophylline จำนวน 250 mg ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 250 ml ละลายและปรับปริมาตรให้ครบด้วย 0.1 N HCl solution (pH 1.2) ผสมให้เข้ากัน สารละลาย theophylline ที่ได้ (stock solution) มีความเข้มข้น 1000 mcg/ml

- 1.2 บีบเปิดสารละลาย ในข้อ 1 มาจำนวน 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3 ml แล้วเจือจางด้วยสารละลาย 0.1 N HCl solution (pH 1.2) จนครบ 100 ml จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 mcg/ml ตามลำดับ
- 1.3 นำสารละลายที่ได้ในข้อ 2 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 270.00 nm โดยใช้ 0.1 N HCl solution (pH 1.2) เป็น blank และใช้ cuvette ขนาด 1 cm.
- 1.4 นำผลที่ได้มาสร้าง standard curve ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของยา theophylline (mcg/ml) สามารถคำนวณหาปริมาณยา theophylline ที่ถูกปลดปล่อยได้จาก standard curve นี้

การศึกษาการปลดปล่อยตัวยาสาคัญ

ชั่งน้ำหนักเม็ดยาที่เตรียมได้จากแต่ละตำรับ ทำการศึกษาตำรับละ 3 เม็ด นำมาวัดอัตราการปลดปล่อยตัวยาโดยใช้เครื่อง dissolution test ตามข้อกำหนด USP Apparatus II (paddle) โดยใช้ 0.1 N HCl 900 ml เป็น dissolution medium ที่อุณหภูมิ 37 ± 5 °C อัตราเร็วของ paddle เท่ากับ 50 rpm ใช้เวลาในการเก็บตัวอย่าง 8 ชั่วโมง คือ 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 420, 480 นาที แล้วทำการบดเม็ดยาด้วย hand homogenizer ให้ละเอียด แล้วเดินเครื่อง dissolution test ต่ออีก 15 นาที โดยใช้ความเร็วรอบของ paddle เท่ากับ 200 rpm เพื่อทำการหาปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมา 100% ในการเก็บตัวอย่างครั้งสุดท้าย จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดไปวัดค่าดูดกลืนแสง แล้วคำนวณหา % drug released โดยทำการคำนวณจากร้อยละของปริมาณยาที่เวลาต่าง ๆ เทียบกับปริมาณยาที่ปลดปล่อยออกมา 100%

3. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของยาเม็ดยาลอยตัว

ศึกษาปัจจัยต่างๆ โดยเฉพาะผลของการเติมสารกันติดที่มีผลต่อคุณสมบัติของยาเม็ดยาลอยตัว ได้แก่ ความสามารถลอยตัว และ การปลดปล่อยยา ตัวแปรที่ศึกษา เช่น

- ชนิดของสารกันติด
- ปริมาณของสารกันติด
- ความหนาชั้นเคลือบกักเก็บแก๊ส

4. การศึกษาผลของการเติมสารกันติดในชั้นเคลือบกักเก็บแก๊สต่อคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์

เตรียมแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์โดยนำ Eudragit® RL 30D ผสม DEP (plasticizer) (20% w/w ของ น้ำหนักพอลิเมอร์) บน magnetic stirrer อย่างน้อย 30 นาที เติมสารกันติดลงไปผสมกับ polymer dispersion ซึ่งได้ผสมกับ plasticizer ไว้ก่อนแล้ว พร้อมกับคนผสมเบาๆ ต่อเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเทลงไปใน Teflon sheet ซึ่งติดอยู่บนเพลทที่เรียบ ปล่อยให้แผ่นฟิล์มแห้ง (โดยการอบที่อุณหภูมิ 40 ± 1 °C) แล้วแกะแผ่นฟิล์มออก วัดความหนา (อย่างน้อย 5 ตำแหน่งด้วย thickness gauge) และนำไปทดสอบคุณสมบัติเชิงกล (mechanical properties) เช่น puncture strength (MPa), elongation (%), energy at break (MJ/m^3) ทั้งในสถานะแห้งโดยใช้เครื่อง Texture Analyser® ดังแสดงในรูปที่ 2-1 และ รูปที่ 2-2 และใช้สูตรต่อไปนี้ในการคำนวณ

$$\text{Puncture strength} = \frac{F}{A_{cs}}$$

เมื่อ F คือ load required for puncture

A_{cs} คือ cross-sectional area of the edge of the dry film located in the path of cylindrical opening of the film holder

$$A_{cs} = 2r\delta$$

เมื่อ r คือ the radius of the hole

δ คือ the thickness of the film

$$\% \text{Elongation} = \left[\frac{\{(r^2 + D^2)^{1/2} - r\}}{r} \right] \times 100$$

เมื่อ r คือ radius of the film exposed in the cylindrical hole of the film holder

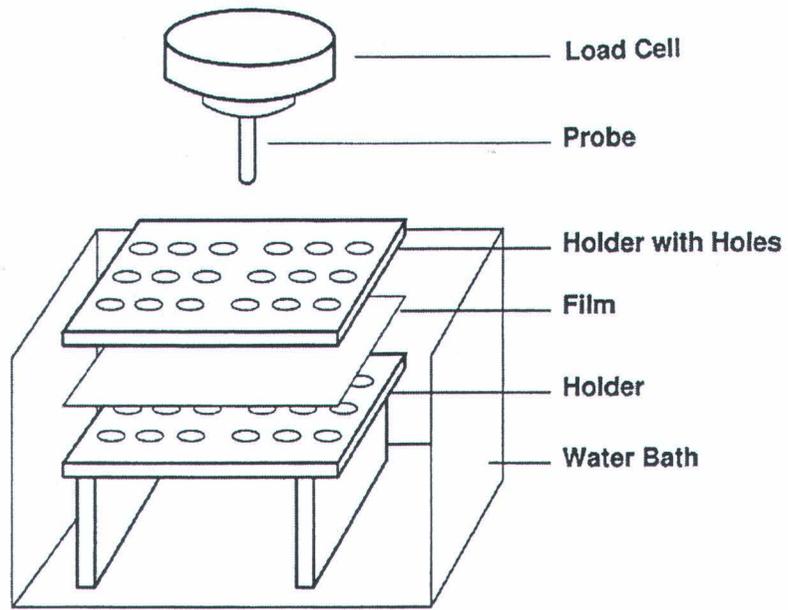
D คือ displacement of the probe from point of contact to point of film puncture

$$\text{Energy at break} = \frac{AUC}{V_c}$$

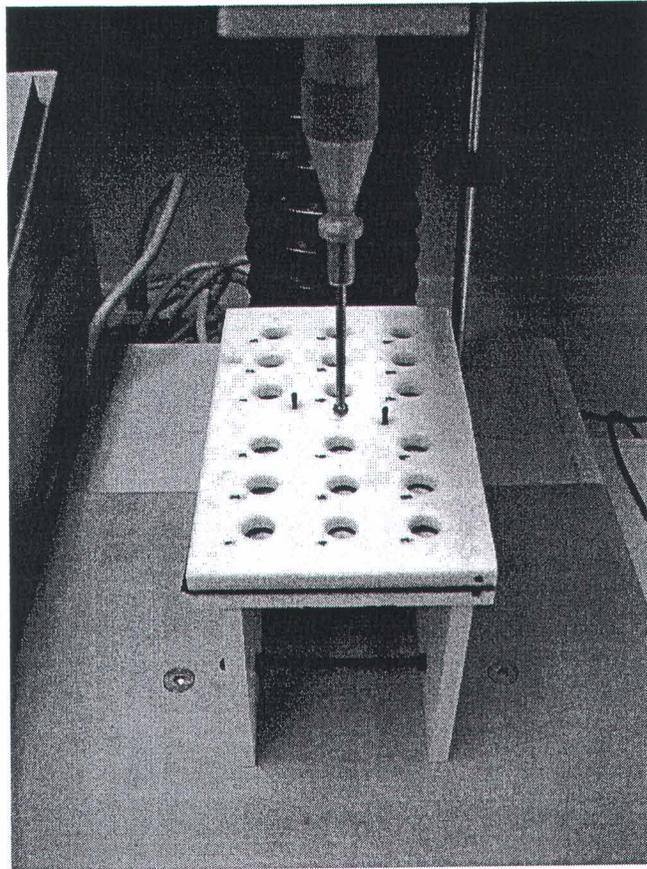
เมื่อ AUC คือ area under the force-displacement curve

V_c คือ the volume of the film sample within the film holder

$$V_c = \pi r^2 \delta$$



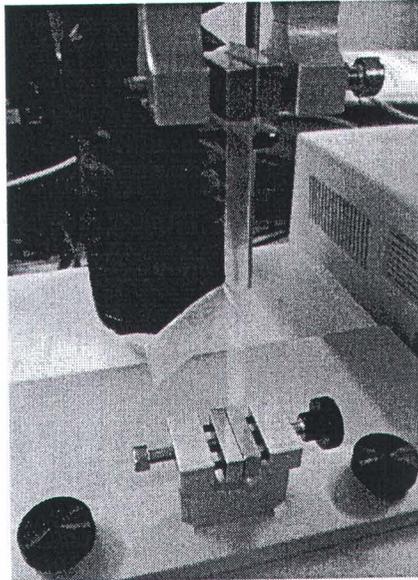
รูปที่ 2-8 แสดง diagram ของ puncture test device ซึ่งประกอบด้วย puncture probe และ film holder



รูปที่ 2-9 แสดง puncture test device ซึ่งประกอบด้วย puncture probe และ film holder

5. การศึกษาผลของการเติมสารกันติดต่อการเหนียวติดกันของแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์

นำแผ่นฟิล์มที่เตรียมได้มาตัดขนาด 2.0×7.0 ตารางเซนติเมตร แล้วนำแผ่นฟิล์มสองแผ่นมาติดทับกันด้วยน้ำหนัก 1000 กรัม ก่อนจะนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปล่อยให้ฟิล์มเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) จากนั้นทำการวัดแรงที่ใช้ในการแยกฟิล์มออกจากกัน (peeling force) โดยใช้เครื่อง Texture Analyzer[®] ทำการทดสอบอย่างน้อย 4 ตัวอย่างแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย



รูปที่ 2-10 แสดง Peeling test ซึ่งประกอบด้วย แผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ที่ประกบกัน และ tensile grips

6. การวิเคราะห์โดยใช้สถิติ

ใช้ Student T-test และ/หรือ One-way ANOVA ในการเปรียบเทียบความสามารถในการลอกตัว และการปลดปล่อยตัวของยาเม็ดลอกตัว รวมทั้งพารามิเตอร์อื่นๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%