บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมีและสารมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้อยู่ในระดับ Analytical grade หรือ HPLC grade ดังแสดง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
น้ำมันรำข้าว ตราไรซ์ลี่ โอรีซานอล 8000 ppm	บริษัท น้ำมันบริโภคไทย จำกัด
Absolute ethanol	Merck
Acetic acid (HPLC grade)	Merck
Acetone	Labscan
Acetronitrite (HPLC grade)	Labscan
Bovine serum albumin	Sigma
Carboxymethyl cellulose sodium	ACROS Organics
Cell proliferation reagent WST-1	Roche
Colloidal silicon dioxide, Aerosil®	Bio-Chemical Technology Co.,Ltd.
Curcumin	Sigma
Dichloromethane (HPLC grade)	Merck
Diocotyl ester of sodium sulphosuccinic acid	BDH Chemical, LTD.
Croscarmellose sodium (Ac-Di-Sol®)	FMC Biopolymer
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen
Ethyl acetate	J.T. Baker
Ethylenediaminetetraacetate (EDTA)	Fisher
Eudragit® L 30 D-55	Evonik industries
Eudragit® NE 30 D	Evonik industries
Ferrous sulphate	Sigma
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco
Folin-Ciocalteu reagent	Merck
Gamma-oryzanol	Wako

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Gelatin Type A	Union Sciences Co. Ltd.
Glutaraldehyde (Ucarcide 25 ™)	DOW Chemical
Glycine	Riedel-de Haen AG
Hydrochloric acid	Merck
Human total iNOS-2 immunoassay	R&D System
Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)	เอกตรงเคมีภัณฑ์
Interferon-γ (IFN-γ)	Sigma
Isopropanol AnalaR®	BDH
Lactose	Merck
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma
Magnesium stearate	Linghu Xinwang Chemical Co.,LTD
Methanol (HPLC grade)	Labscan
Microcrystalline Cellulose, Avicel® pH 101	Sigma
Naphthylethylenediamine dihydrochloride	Fluka
p-Nitrophenyl sulphate	Sigma
Pectin (Rapid)	Union Science Co. Ltd.
Phenylmethylsulfonyl fluoride	Sigma
Phosphate buffer saline	Invitrogen
Phosphate buffer saline without Ca^{2+} and Mg^{2+}	Invitrogen
Polyvinylpyrrolidone K90	Fluka Analytical
Prosolv® SMCC (Silicified Microcrystalline Cellulose)	JRS PHARMA
RPMI medium	Invitrogen
Simethicone Emulsion	เคมพลัส เทรดดิ้ง
di-Sodiumdihydrogen orthophosphate (Na_2HPO_4)	AjexFinechem
Sodium hydroxide	Merck
Sodium nitroprusside	Fisher
Sodium sulphate anhydrous	Rankem
Sulfanilamide	Fisher
Talcum powder, micronized	Union Science Co.,Ltd.
1,1,3,3-Tetramethoxypropane	Sigma

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Thiobarbituric acid	Fisher
Trichloroacetic acid	Fisher
Tumor necrosis factor-α	Life Science
Tween 80	เอกตรงเคมีภัณฑ์จำกัด

3.2 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย ดังแสดง

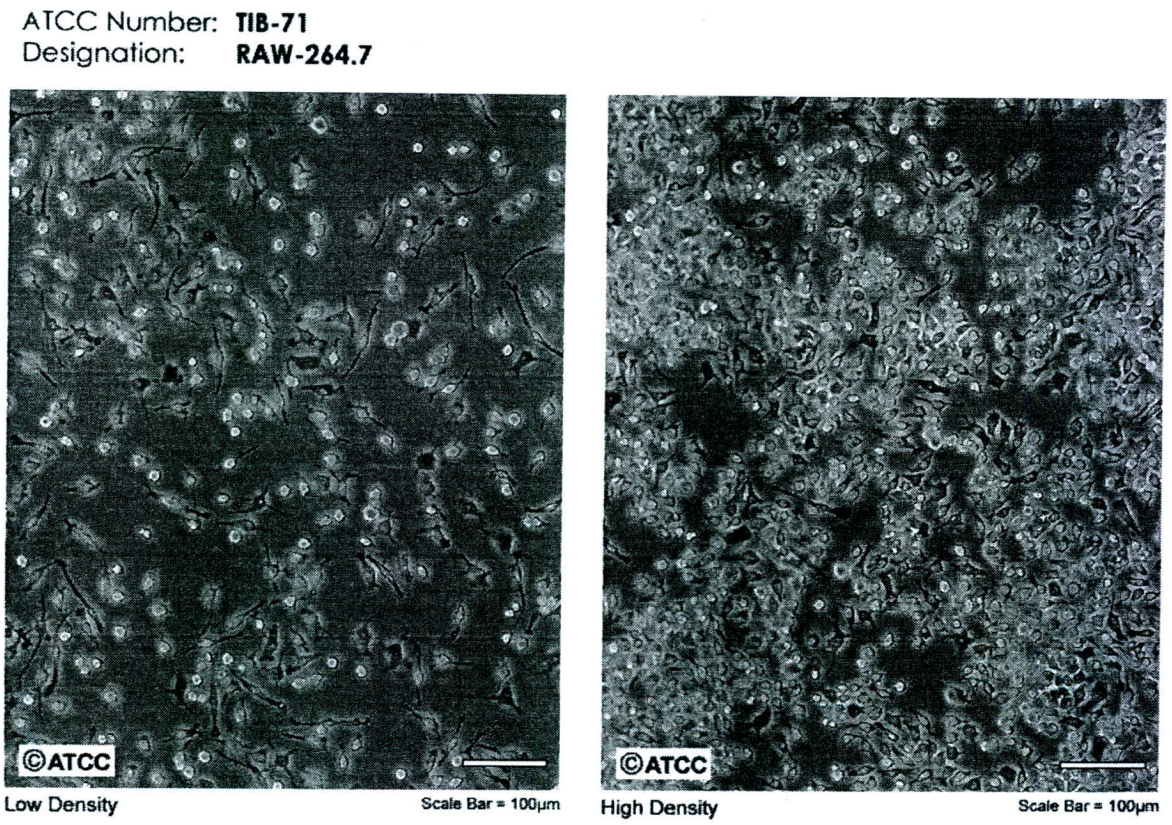
เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)	Shimadzu
เครื่องระเหยโดยการลดความดัน	Buchi
เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance)	Sartorious
ตะแกรงร่อน (Test sieves) ขนาดรูเปิดต่างๆ	USA Standard testing Sieve
เครื่องทดสอบการละลายของยาเม็ด SR8PLUS	Hanson Virtual
เครื่องวัดการแตกตัวของเม็ดยา	PharmaTest
เครื่องทดสอบความกร่อนของยาเม็ด	Pharma Test
เครื่องตอกยาเม็ดแบบหมุนรอบ TYPE B3B	England
เครื่องตอกยาเม็ดแบบไฮดรอลิก Model "C"	FREDS CARVER INC.
เครื่องชั่งวิเคราะห์ Sartorius, Analytical AC2105	Germany
เครื่องชั่งไฟฟ้าสองตำแหน่ง ScoutPro, SPS202	OHAUS
เครื่องปั่น, Polytron® PT-MR3000	Kinematica AG
ตู้อบแกรนูล	**บริษัทกันเสรีกลการ**
Monsanto tablet Hardness tester Model:C-MHT 20	Scilution Co., Ltd.
Analytical Balance, SBC31	SCALTEC
Biohazard hood	CTL
Cell culture flask	Falcon
Centrifuge	Hermle
CO_2 Incubator	Memmert
Homogenizer, Polytron (Polytron PT 3000)	Kinematica AG
Hot Air Oven (Type UL 40)	Memmert

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Infrared Thermometer, OAKTON®Temp®IR	China
Jolting volumeter, JEL STAMPFVOLMETER STAV2003	Meditron Co.,Ltd.
Magnetic stirrer (REMIM RSM-4DR)	AS ONE Japan
Microcentrifuge	Hanil
Micropipette	Gilson
Micropipette 100-1000 µl. BOE 921 1100	BOECO
Microplate reader	Beckman
Mixer	Heidolph
Moisture Analyzer Sartorius Mechatronics, MA500	Germany
Optical Microscope (Olympus CH-2 , Model CHS)	Japan
pH meter	Metrohm
pH/Temperature meter AZ-8686	Taiwan
Scanning Electron Microscope	JEOL JSM-5910LV
Spectrophotometer	Jasco
THAI COATER 15	PMS Supply Ltd.
Timer, QT9017-A	CITIZEN
Ultrasonicating bath	Transsonic Digitals
Water bath temperature controller	Memmert
เครื่อง Supercritical carbon dioxide extractor	THORN®

3.3 เซลล์เพาะเลี้ยง

3.3.1 Mouse macrophage cell line RAW 264.7 มีข้อมูลพื้นฐานของเซลล์มะเร็งจากสถาบัน American Type Culture Collection (ATCC) รายละเอียดดังนี้

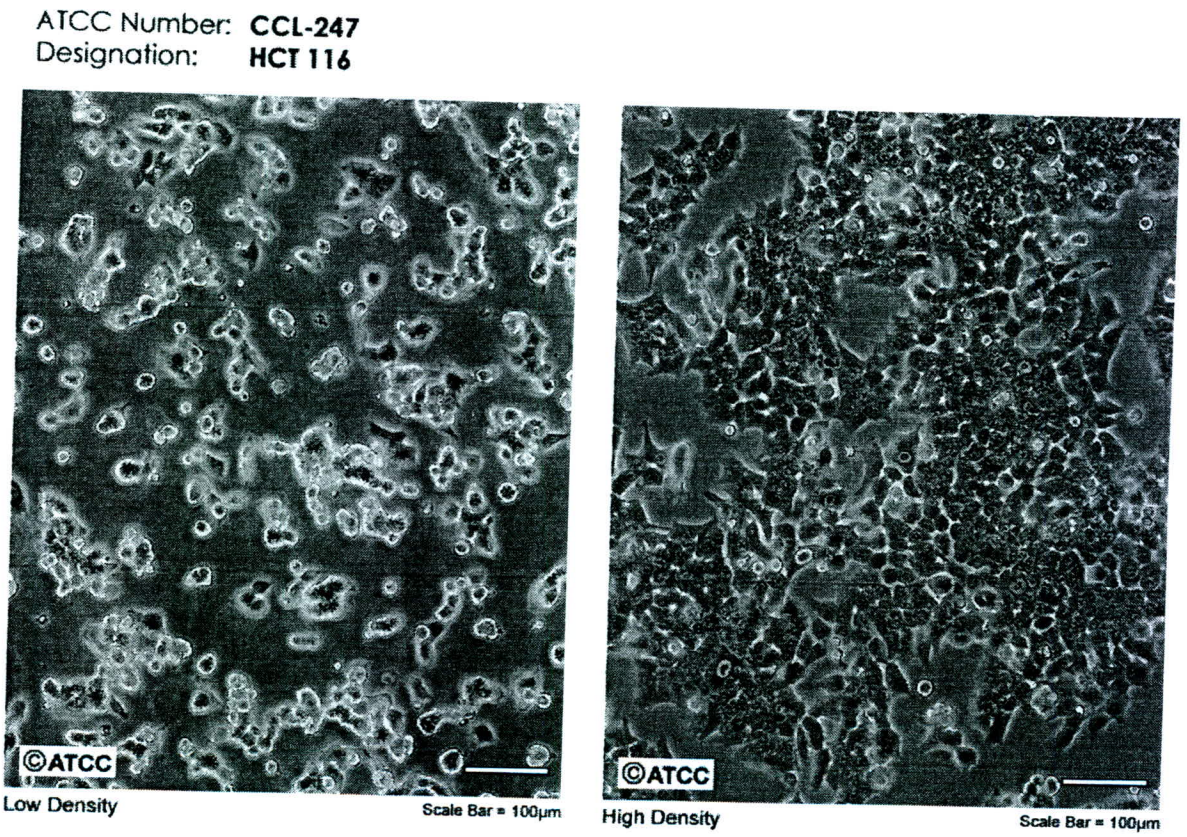
ATCC® Number	TIB-71™
สถาบัน	ATCC
Cell type	Macrophage, Abelson murine leukemia virus transformed
Disease	Abelson murine leukemia virus-induced tumor
Growth properties	adherent
Organism	*Mus musculus* (mouse)
Incubation	37 °C with 5% CO_2



รูปที่ 3.1 เซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟลาจหนู (Mouse macrophage cell line RAW264.7)

3.3.2 Colorectal carcinoma cell line HCT 116 มีข้อมูลพื้นฐานของเซลล์มะเร็งจากสถาบัน American Type Culture Collection (ATCC) ดังนี้

ATCC® Number	CCL-247™
สถาบัน	ATCC
Tissue	Colon; Colorectal carcinoma
Growth properties	adherent
Organism	*Homo sapiens* (human)
Incubation	37 °C with 5% CO_2



รูปที่ 3.2 เซลล์เพาะเลี้ยงลำไส้ใหญ่และไส้ตรง (colorectal carcinoma cell line, HCT 116)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การสกัดและเตรียมตัวอย่างสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

คัดเลือกข้าวก่ำสายพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือที่มีฤทธิ์ป้องกันการก่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงจำนวน 2 ตัวอย่างจากโครงการวิจัย "การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณและกลไกการป้องกันการก่อมะเร็งของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวไทย" ซึ่งประกอบด้วยข้าวก่ำปิ้งและข้าวก่ำต่อ และอีก 1 ตัวอย่างคือข้าวก่ำลืมผัว จากแผนงานวิจัย "การใช้ประโยชน์จากข้าวสายพันธุ์ท้องถิ่นภาคเหนือเพื่อเป็นวัตถุเติมอาหาร สารช่วยทางเภสัชกรรม และอาหารเสริมสุขภาพปรับสมดุลระบบทางเดินอาหารและป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ ในรูปแบบแป้งข้าวต้านทานการย่อย ส่วนสกัดข้าวที่ผ่านการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพและผลิตภัณฑ์คล้ายโยเกิร์ตหมักจากข้าว" นำตัวอย่างข้าวทั้งสามชนิดมากะเทาะเปลือกออกเพื่อให้ได้เป็นข้าวกล้องเก็บตัวอย่างที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาสกัดตามแผนภูมิ

บดเม็ดข้าวตัวอย่างให้ได้ผงละเอียด

⇓

ตัวอย่างผงข้าวกล้อง 50 กรัม

⇓

สกัดด้วยเทคนิคคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด (supercritical carbon dioxide extraction)

⇓

เปรียบเทียบที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส และที่ความดัน 200, 300 และ 450 bars

⇓

สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

⇓

ชั่งน้ำหนักสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่ได้ คำนวณหา %Yield

เก็บในขวดป้องกันแสงและที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-โอไรซานอล

นำสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลมาวิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) โดยใช้วิธีของ Zullaikah และคณะ (2009) ที่มีการดัดแปลงให้เหมาะสมกับการทดลองครั้งนี้ โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอล อะเซทโตรไนไตรล์ ไดคลอโรมีเธนและกรดอะซีติกในอัตราส่วน 50:44:3:3 โดยปริมาตร และใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร จากนั้นจึงคำนวณหาปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลจากพื้นที่ใต้กราฟจาก HPLC โครมาโทแกรมของสารสำคัญ

หลักทั้ง 4 ชนิดคือ cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartanyl ferulate, campesteryl ferulate, และ sitosteryl ferulate หลังจากรู้ปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลในสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล จึงทำ standardization สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลเพื่อปรับให้มีปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลเท่ากัน จากนั้นนำมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 และฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง iNOS ในเซลล์ colorectal carcinoma HCT 116

3.4.3 การเตรียมเซลล์มะเร็งสำหรับการทดลอง

3.4.3.1 การเลี้ยงเซลล์

ทำการเลี้ยงเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 (ATCC TIB-71™) และ colorectal carcinoma HCT 116 ในภาชนะพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์ (tissue culture flask) ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ complete D-MEM แล้วนำภาชนะพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้อบชนิดมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% ในบรรยากาศที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เซลล์จะเรียงตัวเป็น monolayer ทำการแบ่งเซลล์ (subculture) เมื่อดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับแล้วพบว่าเซลล์มีการเจริญและแบ่งตัวในภาชนะพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์แล้ว 60-80%

3.4.3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 และ HCT 116 มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบในช่วงความเข้มข้นของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 และการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HCT 116 โดยใช้ cell proliferation reagent (WST-1) เป็นสารที่ใช้วิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาเช่นเดียวกับ 3-(4,5-dimehtylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) แต่ไม่จำเป็นต้องอาศัยตัวทำละลายผลึก formazan เหมือนกับการใช้ MTT ทั้งยังเกิดปฏิกิริยาได้เร็วกว่า MTT และสีที่เกิดขึ้นยังมีความคงตัวนานกว่า 12 ชั่วโมง สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 และ HCT 116 โดยใช้ cell proliferation reagent WST-1 (Saenjum *et al.*, 2012) มีวิธีการดังนี้

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 จำนวน 10,000 cells/well
หรือ HCT 116 จำนวน 5,000 cells/well ใน 96-wells plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

⇓

บ่มสารละลายของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลในความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ทดสอบ
กับเซลล์ RAW 264.7 และ HCT 116 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

⇓

เติม cell proliferation reagent WST-1 จากนั้นนำ plate ไปบ่มใน
CO_2 Incubator ต่อเป็นเวลา 45 นาที

⇓

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 455 นาโนเมตร

⇓

วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตจากค่าการดูดกลืนแสง

3.4.3.3 การกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์

ในการกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์จะใช้ Lipopolysaccharide (LPS) และ Interferon-γ (IFN-γ) เป็นตัวกระตุ้น ดัดแปลงจาก Hu และคณะ (2003) ดังนี้

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 จำนวน 10,000 cells/well
ใน 96-wells plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

⇓

ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล
ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นบ่มใน CO_2 Incubator นาน 1 ชั่วโมง

⇓

เติมสารละลาย LPS 50 ng/mL และ IFN-γ 100 ng/mL หลุมละ 10 μL
หลุมที่ไม่ได้เติมกำหนดให้เป็นชุดควบคุม

⇓

นำไปบ่มใน CO_2 Incubator นาน 24 ชั่วโมง

⇓

แบ่งสารละลายหลุมละ 100 μL ลงใน 96-wells plate ใหม่เพื่อ
วิเคราะห์ปริมาณไนตริกออกไซด์

3.4.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณไนตริกออกไซด์

อนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ที่สร้างมาจากเซลล์ RAW 264.7 นั้น จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นไนไตรท์ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วย Griess reagent ที่ประกอบด้วย sulfanilamide และ naphthyletylenediamine dihydrochloride ในอัตราส่วน 1:1 (Sreejayan & Rao, 1997) โดยมีรายละเอียดดังนี้

ผสมสารละลาย sulfanilamide และ naphthyletylenediamine dihydrochloride
ในอัตราส่วน 1:1 (Griess reagent)
⇓
เติม Griess reagent ลงหลุมละ 100 μL ใน 96-wells plate
รวมทั้งหลุมที่เติม KNO_2 ซึ่งเป็นหลุมสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน
⇓
วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
⇓
สร้างกราฟมาตรฐาน %Inhibition และคำนวณหาค่า
50% inhibition concentration

3.4.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ iNOS

การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ iNOS ใช้ชุดวิเคราะห์ Human total iNOS Immunoassay โดยดัดแปลงจาก Hong และคณะ (2002) และ Kim และคณะ (2004) มีรายละเอียดดังนี้

เลี้ยงเซลล์ลำไส้ใหญ่และไส้ตรง HCT 116 ใน Black 96-well plate
หลุมละ 5,000 เซลล์
⇓
บ่มในสภาวะ 5% CO_2 เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง
⇓
เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีส่วนประกอบของ LPS (2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
และ IFN-γ (50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)
⇓
เติมสารละลายสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐานในความเข้มข้นต่างๆ
⇓
บ่มในสภาวะ 5% CO_2 เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

⇓

เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีส่วนประกอบของ 4% Formaldehyde

⇓

บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 20 นาที

⇓

ล้างด้วย 1X PBS จำนวน 4 ครั้ง

⇓

เติม iNOS conjugate 200 ไมโครลิตรแล้วบ่มเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง

⇓

ล้างด้วย 1X PBS จำนวน 4 ครั้ง

⇓

เติม Substrate solution 200 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที

⇓

เติม Stop solution 50 ไมโครลิตร

⇓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

⇓

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976)

⇓

คำนวณค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ iNOS

ได้ร้อยละ 50 โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

3.4.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณ NF-KB (p65)

การวิเคราะห์ปริมาณ NF-KB (p65) ใช้ชุดวิเคราะห์ Human total NF-KB Immunoassay โดยดัดแปลงจาก O'Gorman และคณะ (2010) โดยมีรายละเอียดดังนี้

เลี้ยงเซลล์ลำไส้ใหญ่และไส้ตรง HCT 116 ใน 6-well plate

หลุมละ 1×10^5 เซลล์

⇓

บ่มในสภาวะ 5% CO_2 เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง

⇓

เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีส่วนประกอบของ LPS (2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

และ IFN-γ (50 นาโนกรัมต่อมิลลิลตร)

⇓

เติมสารละลายสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐานในความเข้มข้นต่างๆ

⇓

บ่มในสภาวะ 5% CO_2 เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

⇓

ล้างด้วย 1X PBS ที่เย็นจำนวน 2 ครั้ง เพื่อล้าง supernatant

⇓

เก็บเซลล์ที่ได้แล้วถ่ายใส่ pre-chilled microcentrifuge tube

⇓

resuspend ด้วย 1X hypotonic buffer เก็บบนน้ำแข็งนาน 15 นาที

⇓

เติม 10% NP40 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

⇓

ปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

⇓

นำ pellet ที่ได้มา resuspend ด้วย cell extraction buffer

⇓

เก็บบนน้ำแข็งนาน 30 นาที โดยปั่นทุก 10 นาที

⇓

ปั่นเหวี่ยงที่ 20,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

⇓

เก็บ supernatant ที่ได้

⇓

เติม standards และ supernatant ที่ได้ปริมาตร 100 µL

⇓

เก็บที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง

⇓

ล้างด้วย 1X PBS จำนวน 4 ครั้ง

⇓

เติม total NF-ĸB (p65) detection antibody solution ปริมาตร 100 µL

⇓

เก็บที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง

⇓

ล้างด้วย 1X PBS จำนวน 4 ครั้ง

⇓

เติม anti-rabbit IgG HRP working solution

⇓

เก็บที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที

⇓

ล้างด้วย 1X PBS จำนวน 4 ครั้ง

⇓

เติม stabilized chromogen ปริมาตร 100 µL

⇓

เก็บที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที

⇓

เติม stop solution ปริมาตร 100 µL

⇓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

3.5 การศึกษาสมบัติพื้นฐานของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

3.5.1 หาความหนาแน่น

3.5.2 หาความหนืด โดยใช้ Ostwald viscometer

3.6 การเตรียมไมโครแคปซูลของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลโดยวิธีโคอาเซอเวชัน-เชิงซ้อน

เตรียมไมโครแคปซูลของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจำนวน 8 ตำรับ (F01-F08) โดยวิธีโคอาเซอเวชันเชิงซ้อน (complex coacervation) ประกอบด้วยสารที่เป็นเปลือกของไมโครแคปซูล คือ เพคตินและเจลาติน (gelatin Type A) อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักและส่วนแกนของไมโครแคปซูล คือ สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลและน้ำมันรำข้าว ในอัตราส่วนโดยน้ำหนัก 1:1 ขั้นตอนหลักของการเตรียมมีดังนี้

ขั้นตอน A: เพื่อให้สารแกนกลาง กระจายตัวเป็นหยดที่มีขนาดสม่ำเสมอและถูกหุ้มด้วยสารที่เป็นเปลือก (shell/coat) อย่างสมบูรณ์

ขั้นตอน B และ C: การปรับลด pH และอุณหภูมิเพื่อให้การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนทางประจุของสารที่เป็นเปลือกเกิดได้สมบูรณ์

ขั้นตอน D: การเติมสารช่วยกระจายตัว (sodium carboxymethylcellulose) ป้องกันการยึดเกาะกันของไมโครแคปซูล

ขั้นตอน E: การเติมสารที่ทำให้เปลือกไมโครแคปซูลแข็ง (rigidization)

ขั้นตอน F: การเติม glycine เพื่อหยุดการเชื่อมข้าม (cross-link) ของสารที่เป็นเปลือกไมโครแคปซูล

โดยรายละเอียดของการเตรียม มีดังนี้

1. เตรียมสารละลายเจลาตินความเข้มข้น 2.5% และสารละลายเพคติน ความเข้มข้น 2.5% จำนวน อย่างละ 100 มิลลิลิตร ทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส วัด pH ของสารละลาย

2. ปรับ pH ของสารละลายทั้งสอง ให้เท่ากับ 7.5 $\pm$ 0.05 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 นอร์มอล

3. ผสมสารละลายเจลาติน สารละลายเพคตินกับน้ำมันรำข้าว 5.0 กรัม กรณีเตรียมไมโครแคปซูลที่ไม่มีสารสกัดหรือสารผสมของน้ำมันรำข้าวกับสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลอัตราส่วนโดยน้ำหนัก 1:1 จำนวน 5.0 กรัม ในการเตรียมไมโครแคปซูลที่มีสารสกัด นำสารผสมที่ได้ปั่นด้วยเครื่องผสมแบบใบพัด (propeller mixer) หรือเครื่อง homogenizer (Polytron) ที่ความเร็วรอบและระยะเวลา (A) ตามตารางที่ 3.1

4. ปรับลด pH ของสารผสมให้เท่ากับ 4.0 ด้วย dilute HCl และปั่นด้วยเครื่องผสมแบบใบพัดที่ความเร็วรอบและระยะเวลา (B) ตามตารางที่ 3.1

5. ลดอุณหภูมิสารผสมลงให้เท่ากับ 5.0 องศาเซลเซียสและปั่นด้วยเครื่องผสมแบบใบพัดที่ความเร็วรอบและระยะเวลา (C) ตามตารางที่ 3.1

6. เติมสารละลาย sodium carboxymethylcellulose ความเข้มข้น 1 % จำนวน 20 มิลลิลิตร และปั่นด้วยเครื่องผสมแบบใบพัดที่ความเร็วรอบและระยะเวลา (D) ตามตารางที่ 3.1

7. เติมสารละลาย glutaraldehyde ความเข้มข้น 50% จำนวน 2 มิลลิลิตร และปั่นด้วยเครื่องผสมแบบใบพัดที่ความเร็วรอบและระยะเวลา (E) ตามตารางที่ 3.1

8. เติมสารละลาย glycine ความเข้มข้น 1M จำนวน 8 มิลลิลิตร และปั่นด้วยเครื่องผสมแบบใบพัดที่ความเร็วรอบและระยะเวลา (F) ตามตารางที่ 3.1

9. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 1 คืน รินเพื่อแยกสารละลายข้างบนออกจากตะกอน

10. ทำให้ตะกอนแห้ง โดยการล้างด้วย acetone แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และโดยวิธีการ freeze drying

ตารางที่ 3.1 แสดงการหาสภาวะที่เหมาะสมของอัตราเร็วและเวลาสำหรับการเกิดโคอาเซอเวชันเชิงซ้อน เพื่อให้ได้ไมโครแคปซูลที่มี รูปร่างทรงกลม และมีขนาดเล็กและสม่ำเสมอ

Formula	Coacervation Conditions					Mixer type
	Step	rpm	T, °C	pH	Time	
F-01	A	500	40	7.5	5 min	M
	B	500	40	4.0	5 min	M
	C	500	5	4.0	5 min	M
	D	500	5	4.0	1 hr	M
	E	500	RT	4.0	4 hr	M
	F	500	RT	4.0	15 min	M

M = Mixer (Propeller-type); RT = อุณหภูมิห้อง

Formula	Coacervation Conditions					Mixer type
	Step	rpm	T, °C	pH	Time	
F-02	A	1000	40	7.5	5 min	M
	B	1000	40	4.0	5 min	M
	C	1000	5	4.0	5 min	M
	D	1000	5	4.0	1 hr	M
	E	1000	RT	4.0	4 hr	M
	F	1000	RT	4.0	15 min	M

Formula	Coacervation Conditions					Mixer type
	Step	rpm	T, °C	pH	Time	
F-03	A	**5000**	40	7.5	**7 min**	**H**
	B	1000	40	4.0	5 min	M
	C	1000	5	4.0	5 min	M
	D	1000	5	4.0	1 hr	M
	E	1000	RT	4.0	4 hr	M
	F	1000	RT	4.0	15 min	M

Formula	Coacervation Conditions					Mixer type
	Step	rpm	T, °C	pH	Time	
F-04	A	5000	40	7.5	**15 min**	H
	B	1500	40	4.0	5 min	M
	C	1500	5	4.0	5 min	M
	D	1500	5	4.0	1 hr	M
	E	1000	RT	4.0	4 hr	M
	F	1000	RT	4.0	15 min	M

Formula	Coacervation Conditions					Mixer type
	Step	rpm	T, °C	pH	Time	
F-05	A	5000	40	7.5	**30 min**	H
	B	1500	40	4.0	5 min	M
	C	1500	5	4.0	5 min	M
	D	1500	5	4.0	1 hr	M
	E	1500	RT	4.0	4 hr	M
	F	1500	RT	4.0	15 min	M

Formula	Coacervation Conditions					Mixer type
	Step	rpm	T, °C	pH	Time	
F-06	A	**8000**	40	7.5	**15 min**	H
	B	1300	40	4.0	5 min	M
	C	1300	5	4.0	5 min	M
	D	1300	5	4.0	1 hr	M
	E	1300	RT	4.0	4 hr	M
	F	1300	RT	4.0	15 min	M

Formula	Coacervation Conditions					Mixer type
	Step	rpm	T, °C	pH	Time	
F-07	A	**8000**	40	7.5	**15 min**	H
	B	1500	40	4.0	5 min	M
	C	1500	5	4.0	5 min	M
	D	1500	5	4.0	1 hr	M
	E	1500	RT	4.0	**4 hr**	M
	F	1500	RT	4.0	15 min	M

หมายเหตุ: Formula F-01 ถึง F-07 สารแกนกลาง คือ Rice Bran Oil (ไม่มีสารสกัด)

Formula	Coacervation Conditions					Mixer type
	Step	rpm	T, °C	pH	Time	
F-08	A	8000	40	7.5	15 min	H
	B	1500	40	4.0	5 min	M
	C	1500	5	4.0	5 min	M
	D	1500	5	4.0	1 hr	M
	E	1500	RT	4.0	4 hr	M
	F	1500	RT	4.0	15 min	M

หมายเหตุ: Formula F-08 แกนกลาง คือ Rice Bran Oil: สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล 1:1

3.7 การพัฒนายาเม็ดเพื่อนำส่งสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลสู่ลำไส้ใหญ่

เนื่องจากการเตรียมไมโครแคปซูลของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล โดยวิธีโคอาเซอเวชันเชิงซ้อน ที่ได้วางแผนไว้แต่ต้นไม่ได้ไมโครแคปซูลที่เหมาะสมกับการนำส่งสารสกัด จึงมีการปรับกระบวนการเพื่อเตรียมระบบนำส่งสารสกัดแกมมา-โอไรซานอล สู่ลำไส้ใหญ่ใหม่เป็นการใช้ในรูปแบบยาเม็ดเคลือบแทน

ขั้นตอนการพัฒนายาเม็ดเคลือบเพื่อนำส่งสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลสู่ลำไส้ใหญ่ ประกอบด้วย

1. การทดลองหาสารดูดซับสารสกัดที่เหมาะสม
2. การพัฒนาสูตรแกรนูลยาเม็ดแกน
3. การพัฒนายาเม็ดแกน
4. การเคลือบยาเม็ดแกน

4.1 การพัฒนาสูตรตำรับน้ำยาเคลือบและสภาวะการเคลือบเพื่อชะลอการปลดปล่อยตัวยาในกระเพาะและลำไส้เล็ก (การเคลือบชั้นในสุด)

5. การประเมินสมบัติยาเม็ดสารสกัดที่เคลือบแล้ว

5.1 ความแปรปรวนของน้ำหนักเม็ด

5.2 ความแข็งของยาเม็ด

5.3 ความกร่อนของยาเม็ด

5.4 เวลาในการแตกตัวของยาเม็ด

5.5 การศึกษาการปลดปล่อยตัวยาจากยาเม็ดที่เคลือบสองชั้นในระบบที่จำลองภาวะทางเดินอาหาร

3.7.1 การทดลองหาสารดูดซับ (adsorbent) ที่เหมาะสม

ทำการทดสอบกับ Rice bran oil และสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล โดยการศึกษาเบื้องต้นจะใช้น้ำมันรำข้าว (rice bran oil, Food grade) เป็นสารตัวอย่างเทียบเคียงแล้วจึงนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์กับสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล รวมถึงการเตรียมแกรนูลหลอกและยาเม็ดหลอก (placebo granules, placebo tablets) เพื่อใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเคลือบยาเม็ด ทั้งนี้ เนื่องจากในการสกัดสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลจากข้าวก่ำลืมผัว ได้ปริมาณสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สูงมาก แต่ได้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ จึงมีข้อจำกัดหากจะนำสารสกัดที่ได้มาทดลองหาข้อมูลเบื้องต้น และได้ทำการศึกษาหาสมบัติทางกายภาพพื้นฐานของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลเปรียบเทียบกับน้ำมันรำข้าวที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ สี ความหนืด ความหนาแน่น เป็นต้น

ทำการศึกษาโดยบดผสมน้ำมันรำข้าว 2.00 กรัม และสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล 1.00 กรัม และสารดูดซับชนิดต่างๆ ได้แก่ corn starch, potato starch, spray dried rice starch (Eratab®), microcrastalline cellulose (Avicel pH 101), Silicified microcrystalline และ cellulose (Prosolv® SMCC) ในโกร่งจนได้ผงผสมที่แห้ง ชั่งหาน้ำหนักของสารดูดซับที่ใช้ คำนวณน้ำหนักต่อกรัมสารสกัดที่ทำให้ได้ผงผสมที่แห้ง

3.7.2 การพัฒนาสูตรแกรนูลยาเม็ดแกน

3.7.2.1 องค์ประกอบของแกรนูล

สูตรตำรับแกรนูลมี 2 สูตร คือ แกรนูลหลอก (ใช้น้ำมันรำข้าวเป็นสารสำคัญ) และแกรนูลที่แท้จริง ใช้สารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลเป็นสารสำคัญ โดยอยู่ในรูปของผงผสมที่แห้งและประกอบด้วยสารเจือจาง สารยึดเกาะและสารดูดซับ ดังแสดงในตาราง 3.2

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบสูตรตำรับแกรนูลของยาเม็ดแกน

องค์ประกอบในตำรับ	หน้าที่ในตำรับ	ปริมาณในสูตรตำรับ (กรัม)				
		ตำรับที่ 1	ตำรับที่ 2	ตำรับที่ 3*	ตำรับที่ 4	ตำรับที่ 5
น้ำมันรำข้าว	เทียบสารสำคัญ	2.0	2.0	-	-	-
สารสกัดโอไรซานอล	สารสำคัญ	-	-	2.0	2.0	2.0
Avicel pH101	สารดูดซับ	-	4.0	4.0	4.0	4.0
Prosolv SMCC	สารดูดซับ	4.0	-	-	-	-
Avicel pH101: pectin 2:1	สารเจือจาง	-	(20+10)	(20+10)	(20+10)	(20+10)
Prosolv SMCC: pectin 2:1	สารเจือจาง	(20+10)	-	-	-	-
10% PVP K90 in i-PrOH	สารยึดเกาะ	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.
Colloidal silicon dioxide	สารช่วยไหล	-	-	-	0.5%	-

* สูตรตำรับที่ 3 ตอกเม็ดด้วยเครื่องตอกแบบไฮดรอลิก

สูตรตำรับอื่นๆ ตอกเม็ดด้วยเครื่องตอกยาเม็ดแบบหมุนรอบ (Rotary tabletting machine)

3.7.2.2 วิธีเตรียมแกรนูล

1. บดผสมตัวยาสำคัญกับสารดูดซับ จนได้ผงแห้ง
2. ผสมสารดูดซับกับเพคตินในอัตราส่วนโดยน้ำหนัก 2:1
3. ผสมผงแห้งของตัวยาสำคัญกับผงผสมในข้อ 2
4. เติมสารละลาย 10% PVP ใน i-Propanol นวดให้เข้ากันดี ได้มวลเปียกที่เหมาะสม
5. กดมวลเปียกผ่านแร่งเบอร์ 8
6. ทำให้แกรนูลแห้ง โดยผึ่งไว้ในอากาศ
7. นำแกรนูลแห้งผ่านแร่ง เบอร์ 12
8. ผสมสารหล่อลื่น สารช่วยไหลแล้วนำไปตอกเม็ด

3.7.2.3 การประเมินสมบัติพื้นฐานของแกรนูล

การประเมินสมบัติของแกรนูลมีดังนี้

1. ค่ามุมการไหล (สูตรตำรับ 1-5)
2. % Compressibility (สูตรตำรับ 4-5)
3. การหาปริมาณความชื้น (สูตรตำรับ 4-5)

4. การศึกษาสมบัติการถูกตอกอัด (สูตรตำรับ 3)

การหามุมการไหล

1. นำกรวยแก้วมาวางลงในห่วงที่ยึดติดกับขาตั้งโดยให้ปลายกรวยมีระยะห่างจากพื้นประมาณ 10 เซนติเมตร

2. คำนวณหาพื้นที่กระดาษพิมพ์ดีด สมมุติว่าได้ a ตารางเซนติเมตร (กว้าง × ยาว)

3. นำกระดาษไปชั่งหาน้ำหนัก สมมุติว่าได้ w กรัม

ดังนั้น กระดาษ 1 กรัม จะมีพื้นที่ = [a/w] ตารางเซนติเมตร

4. นำกระดาษไปวางใต้กรวย

5. ชั่งผงยา 50.00 กรัม และเทลงในกรวยโดยใช้กระดาษแข็งปิดปลายกรวยไว้ก่อน

6. เลื่อนกระดาษแข็งออก เริ่มจับเวลา จนกระทั่งผงยาไหลลงไปหมด

7. ใช้ดินสอขีดเป็นวงกลมตามแนวขอบนอกของกองผงยา

8. ลดระดับของปลายกรวยลงมาให้อยู่สูงกว่ายอดสูงสุดของกองผงยา ¼ เซนติเมตร แล้วจึงวัดความสูงของกองผงยา โดยวัดจากพื้นถึงปลายกรวย สมมุติว่าได้ hเซนติเมตร

9. เอาผงยาที่กองบนกระดาษออก ใช้แปรงอ่อนปัดกระดาษให้สะอาด แล้วจึงใช้กรรไกรตัดกระดาษตามรอยดินสอที่ขีดไว้

10. นำกระดาษที่ตัดได้ไปชั่ง สมมุติว่าได้ y กรัม

ดังนั้น วงกลมที่ตัดได้นี้จะมีพื้นที่ = y x [a/w] ตารางเซนติเมตร

= A ตารางเซนติเมตร

เนื่องจากพื้นที่ของวงกลม (A) = πr^2

หรือรัศมีของวงกลม (r) = $\sqrt{\left[\frac{A}{\pi}\right]}$ เซนติเมตร

ดังนั้น ค่า Tangent ของมุมการไหลจะมีค่า = h/r

และค่ามุมของการไหลของผงยาจะดูได้จาก Standard Table of Tangent

11. ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง

12. บันทึกผลลงตาราง และคำนวณหาค่ามุมการไหลและอัตราการไหล

13. ประเมินสมบัติการไหลตามสเกลมุมการไหลของสภาพการไหล (Angle of Repose ตามตารางของ General Scale of Flowability ใน USP35/NF 30<1174> Powder Flow ดังแสดงในภาคผนวก 1)

การหาค่า % Compressibility

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง คือเครื่องเคาะผงยา (Jolting volumeter)

1. ชั่งน้ำหนักกระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร

2. บรรจุแกรนูลตัวอย่าง ประมาณ 50 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนัก หักลบเพื่อให้ทราบน้ำหนักของแกรนูลตัวอย่าง (M)

3. เคาะกระบอกตวงบนพื้นแข็ง 3 ครั้ง ที่ความสูงประมาณ 1 นิ้ว อ่านปริมาตรผงยาเป็น untapped volume (Vb) ในหน่วยมิลลิลิตร

4. นำกระบอกตวงเคาะต่ออีก 500 ครั้งด้วยเครื่องเคาะผงยา อ่านปริมาตรผงยาเป็น tapped volume (Vt) ในหน่วยมิลลิลิตร

5. คำนวณหาค่า Bulk density ของแกรนูลตัวอย่าง

Bulk density = [M / Vb] กรัม/มล.

6. คำนวณหาค่า Tapped density ของ ของแกรนูลตัวอย่าง

Tapped density = [M / Vt] กรัม/มล.

7. คำนวณหาค่า Compressibility Ratio (%)

Compressibility Ratio (%) = [(Tapped density – Bulk density)/Tapped density] × 100

8. บันทึกค่าที่ได้เปรียบเทียบกับค่าในตาราง เพื่อบ่งชี้สมบัติการไหลของแกรนูล (ตามตารางของ USP35/NF 30 <1174> Powder Flow ดังแสดงในภาคผนวก 1)

การหาปริมาณความชื้น

ทำการหาปริมาณความชื้นของแกรนูลด้วยเครื่องวิเคราะห์ความชื้น (Moisture Analyzer) ดังนี้

1. ชั่งแกรนูลให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5000 กรัม
2. นำแกรนูลวางบนจานของเครื่อง
3. เปิดเครื่องเพื่อให้ความร้อนแก่แกรนูล จนได้น้ำหนักคงที่
4. บันทึกน้ำหนักสุดท้าย และร้อยละของปริมาณความชื้น (%L)

การศึกษาผลของแรงตอกอัดต่อสมบัติยึดเกาะของแกรนูลที่มีสารสกัด

โดยใช้แกรนูลจากสูตรตำรับที่ 3 เป็นตัวแทนในการศึกษา และตอกยาเม็ดแกนด้วยเครื่องตอกไฮดรอลิกที่แรงตอกอัดต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ตัน วัดความแข็งของยาเม็ด แล้วนำมาพล็อตกราฟระหว่างแรงตอกอัดและความแข็งของยาเม็ด

3.7.2 การพัฒนายาเม็ดแกน

1. สูตรตำรับยาเม็ด

แกรนูลน้ำมันรำข้าว หรือ แกรนูลสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอล

Talcum	1.0%
Ac-Di-Sol®	0.5%
Magnesium stearate	0.5%

2. วิธีตอกยาเม็ด

ใช้เครื่องตอกยาเม็ดแบบหมุนรอบ สำหรับสูตรตำรับที่ 1, 2, 4 และ 5

ใช้เครื่องตอกยาเม็ด Hydraulic press สำหรับสูตรตำรับที่ 3

3. การประเมินสมบัติยาเม็ดแกนสูตรตำรับที่ 1-5 มีดังนี้

1. น้ำหนักเฉลี่ยและความแข็งของยาเม็ด (สูตรตำรับ 1-5)
2. ร้อยละของความกร่อนของเม็ดยา (สูตรตำรับ 1-5)

3.7.4 การเคลือบยาเม็ดแกนเพื่อนำส่งสู่ลำไส้ใหญ่

การเคลือบยาเม็ดแกนของสารสกัดโอไรซานอลเพื่อนำส่งสู่ลำไส้ใหญ่ โดยทำการเคลือบยาเม็ดด้วยเครื่องเคลือบฟิล์ม Thai Coater โดยเคลือบยาเม็ดแกน 2 ชั้น ประกอบด้วย

3.7.4.1 การเคลือบชั้นในของยาเม็ดแกน

ทำการเคลือบยาเม็ดแกนเพื่อชะลอการปลดปล่อยตัวยาไปจนถึงลำไส้ใหญ่ส่วนต้นเพื่อป้องกันการปลดปล่อยตัวยาจากยาเม็ดหลังจากที่ยาเม็ดเคลื่อนที่ออกจากกระเพาะอาหารแล้ว พอลิเมอร์ที่เคลือบยาเม็ด จะเป็นชนิดที่ควบคุมการปลดปล่อยตัวยาโดยอาศัยเวลา และไม่ขึ้นกับ pH (Time controlled release, pH independent) เนื่องจาก pH ของทางเดินอาหารในส่วนของ ลำไส้เล็กส่วนต้น ส่วนกลาง ส่วนปลาย ตลอดจนถึงลำไส้ใหญ่ส่วนต้น ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เพียงพอที่จะกำหนดการละลายของพอลิเมอร์ที่ใช้เป็นสารเคลือบได้ พอลิเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ Eudragit® NE30D ซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์ของเอธิลเมธาคริเลท-เมธิลเมธิคริเลท ในสัดส่วน 1:2 ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ชนิดไม่ละลายน้ำ แต่สามารถพองตัวได้ในน้ำ เกิดเป็นชั้นเจล โดยความหนาของชั้นพอลิเมอร์ที่เคลือบ หรือความหนาของชั้นเจล จะช่วยชะลอการปลดปล่อยตัวยาไปจนถึงบริเวณที่เป็นเป้าหมาย (Yihong, 2009)

การพัฒนาสูตรตำรับน้ำยาเคลือบและสภาวะการเคลือบเพื่อชะลอการปลดปล่อยตัวยาในลำไส้เล็ก (การเคลือบชั้นในสุด)

1. สูตรน้ำยาเคลือบ (การเคลือบชั้นในสุด)

ส่วนประกอบ	% ของตำรับ	หน้าที่ในตำรับ
Eudragit® NE30D 80, 160, 250 g (เทียบเท่ากับปริมาณเนื้อสาร Eudragit® NE 30D 24, 24, 75 กรัม ตามลำดับ)	10, 20, 30	สารเคลือบ
Talcum powder 6.0, 12.0 g	25%, 50% ของสารเคลือบ	สารกันติด (anti-tacking)
Simethicone Emulsion, 30% USP0, 1.20 g	0%, 4.5% ของสารเคลือบ*	สารลดฟอง (anti-foaming)
Purified Water	จนครบน้ำหนัก	

* ภายหลังตัดออกจากสูตรตำรับ เนื่องจากทำให้เกิดฟองมาก

2. วิธีเตรียมน้ำยาเคลือบ

กระจาย talcum (ที่ผ่านแร่งแล้ว) ในน้ำกลั่น ปั่น 1000 rpm 30 นาที

⇓

เติม simethicone Emulsion ปั่นเหวี่ยงที่ 500 rpm นาน 10 นาที

⇓

เติม Eudragit® NE30D ผสมด้วยแท่งแม่เหล็ก

⇓

นำสารผสมที่ได้ผ่านแร่ง ขนาดรูเปิด 250 ไมครอน

⇓

น้ำยาเคลือบ

3. การเคลือบยาเม็ดแกน

- สุ่มตัวอย่างยาเม็ดแกนที่มีน้ำมันรำข้าวหรือสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่ยังไม่ได้เคลือบจำนวน 10 เม็ด ชั่งน้ำหนักแต่ละเม็ด หาน้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด

- ชั่งน้ำหนักยาเม็ดแกนที่มีน้ำมันรำข้าว หรือสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลให้ทราบน้ำหนักทั้งหมดที่แน่นอน รวมกับยาเม็ดแกนแลคโทส ให้ได้น้ำหนักอย่างน้อย 1 กิโลกรัม เพื่อให้ได้ปริมาณเม็ดยาที่เหมาะสำหรับการเคลือบ

- เคลือบยาเม็ดแกนด้วยน้ำยาเคลือบ โดยมีสภาวะการเคลือบ ดังนี้

สภาวะในการเคลือบ

อัตราการหมุนหม้อเคลือบ = 9-11 รอบ/นาที

อัตราการพ่นสารละลาย = 2.83-3.11 กรัม/นาที

แรงดันลม = 2.5-3.5 bar

อุณหภูมิในหม้อเคลือบ = 97-103 องศาเซลเซียส

(อุณหภูมิลมขาเข้า 66-68 องศาเซลเซียส อุณหภูมิลมขาออก 68-72 องศาเซลเซียส)

ระยะเวลาในการเคลือบ =1.5-6 ชั่วโมง

% ความชื้นสัมพัทธ์ = 17-18

- เมื่อครบเวลาการเคลือบ นำยาเม็ดเคลือบไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

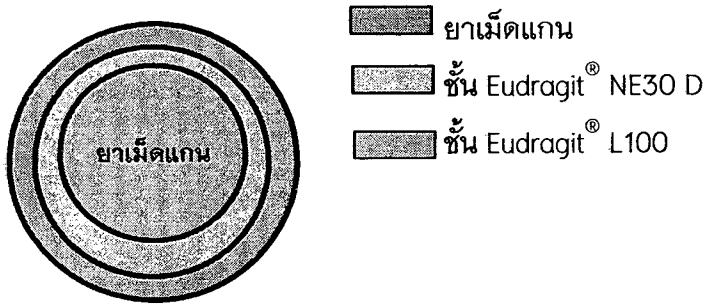
4. การประเมินยาเม็ดที่เคลือบแล้ว

- สังเกตพื้นผิวและความเนียนเรียบของเม็ดยา
- สุ่มตัวอย่างยาเม็ดจำนวน 10 เม็ด ชั่งน้ำหนักต่อเม็ด หาน้ำหนักเฉลี่ย
- ประเมินความสมบูรณ์ของฟิล์มที่เคลือบ โดยนำยาเม็ดที่เคลือบแล้วจำนวน 3 เม็ดทดสอบในเครื่องทดสอบการละลายในสารละลายตัวกลางฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 นาน 3 ชั่วโมง
- สังเกตการเปลี่ยนแปลงของฟิล์มที่เคลือบบนยาเม็ด การแตกและการรั่วของยาเม็ด

3.7.4.2 การเคลือบชั้นนอกสุดแบบเอนเทอริก (enteric coating)

ทำการเคลือบยาเม็ดที่ผ่านการเคลือบชั้นในแล้วด้วยพอลิเมอร์ที่สามารถป้องกันการปลดปล่อยตัวยาในกระเพาะอาหาร พอลิเมอร์ที่เลือกใช้ คือ Eudragit® L100 ซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์ของกรดเมธาคริลิก (MA)-เมธิลเมธาคริเลท (MMA) ในสัดส่วน 1:1 เป็นพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายในสภาวะที่มี pH < 6.0 เคลือบเพื่อป้องกันการปลดปล่อยตัวยาในกระเพาะอาหาร โดยอาศัยกลไกการ

ละลายของพอลิเมอร์ที่เป็นสารเคลือบ (pH controlled release) การเคลือบยาเม็ดแกน แสดงด้วยแผนภาพในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 แผนภาพการเคลือบชั้นยาเม็ดแกนสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลเพื่อนำส่งสู่ลำไส้ใหญ่

การพัฒนาสูตรตำรับน้ำยาเคลือบและสภาวะการเคลือบเพื่อยับยั้งการปลดปล่อยตัวยาในกระเพาะอาหาร (การเคลือบชั้นนอกสุดของยาเม็ด)

1. สูตรน้ำยาเคลือบ

ส่วนประกอบ	% ของตำรับ	หน้าที่ในตำรับ
Eudragit® L-100 D 80.0 g (เทียบเท่ากับปริมาณเนื้อสาร Eudragit® L-100 D 24กรัม)	10%	สารเคลือบเอนเทอริค
Talcum powder 6.0 g	25% ของสารเคลือบ	สารกันติด (anti-tacking)
Purified Water	จนครบน้ำหนัก	

2. วิธีเตรียมน้ำยาเคลือบ

กระจายTalcum (ผ่านแร่งแล้ว) ในน้ำกลั่น ปั่น 1000 rpm 30 นาที

⇓

เติม Eudragit®L100D กวนด้วยแท่งแม่เหล็ก

⇓

นำสารละลายที่ได้ผ่านแร่ง ขนาดรูเปิด250 ไมครอน

⇓

น้ำยาเคลือบ

3. การเคลือบยาเม็ดแกน

- สุ่มตัวอย่างยาเม็ดแกนที่เคลือบด้วย Eudragit® NE 30 D แล้วจำนวน 10 เม็ด ชั่งน้ำหนักแต่ละเม็ด หาน้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด

- ชั่งน้ำหนักยาเม็ดแกนที่เคลือบด้วย Eudragit® NE 30 D แล้วให้ทราบน้ำหนักทั้งหมดที่แน่นอน และนำไปรวมกับยาเม็ดแกนแลคโทส เพื่อให้ได้น้ำหนักอย่างน้อย 1 กิโลกรัมที่เหมาะกับการเคลือบ

- เคลือบยาเม็ดแกนด้วยน้ำยาเคลือบเอนเทอริค โดยมีสภาวะการเคลือบ ดังนี้

สภาวะในการเคลือบ

อัตราการหมุนหม้อเคลือบ	=	9-11 รอบ/นาที
อัตราการพ่นสารละลาย	=	2.83-3.11 กรัม/นาที
แรงดันลม	=	2.5-3.5 bar
อุณหภูมิในหม้อเคลือบ	=	97-103 องศาเซลเซียส

(อุณหภูมิลมขาเข้า 66-68 องศาเซลเซียส อุณหภูมิลมขาออก 68-72 องศาเซลเซียส)

ระยะเวลาในการเคลือบ	=	2-4 ชั่วโมง
% ความชื้นสัมพัทธ์	=	17-18

- เมื่อครบเวลาการเคลือบ นำยาเม็ดไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

4. การประเมินยาเม็ดที่เคลือบฟิล์มเอนเทอริค

- สังเกตพื้นผิว ความเนียนเรียบของเม็ดยา
- สุ่มตัวอย่างยาเม็ดจำนวน 10 เม็ด ชั่งน้ำหนักต่อเม็ด หาน้ำหนักเฉลี่ย

- ประเมินความสมบูรณ์ของฟิล์มที่เคลือบ โดยนำยาเม็ดที่เคลือบแล้วจำนวน 3 เม็ดทดสอบในเครื่องทดสอบการละลายในสารละลายตัวกลาง 0.1 N Hydrochloric acid pH 1.2 นาน 2 ชั่วโมง.

- สังเกตการเปลี่ยนแปลงของฟิล์มที่เคลือบบนยาเม็ดถึงการแตก-การรั่วของยาเม็ด

3.7.5 การประเมินสมบัติยาเม็ดสารสกัดที่เคลือบสมบูรณ์แล้ว

1. ความแปรปรวนของน้ำหนัก

สุ่มตัวอย่างยาเม็ดที่เคลือบแล้ว จำนวน 10 เม็ด ชั่งน้ำหนักแต่ละเม็ด หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2. ความแข็งของยาเม็ด

สุ่มตัวอย่างยาเม็ดที่เคลือบแล้ว จำนวน 10 เม็ด หาความแข็งของแต่ละเม็ด ด้วยเครื่องวัดความแข็งเม็ดยามอนแซนโต (Monsanto tablet Hardness tester) หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3. ความกร่อนของยาเม็ด

สุ่มตัวอย่างยาเม็ดที่เคลือบแล้ว จำนวน 20 เม็ดชั่งน้ำหนักรวมทั้ง 20 เม็ด นำไปหาความกร่อน ด้วยเครื่องทดสอบความกร่อนของยาเม็ด โดยให้หมุนจำนวน 100 รอบ นำยาเม็ดออกมาเกลี่ยบนแร่ง ปัดผงฝุ่นบนเม็ดยาออก นำไปชั่งน้ำหนักและหักลบด้วยน้ำหนักเม็ดยาเริ่มต้น คำนวณหาร้อยละของความกร่อนของยาเม็ด

4. เวลาในการแตกตัวของยาเม็ด

สุ่มตัวอย่างยาเม็ดที่เคลือบแล้ว จำนวน 6 เม็ด นำไปหาเวลาในการแตกตัว ด้วย เครื่องวัดการแตกตัวของเม็ดยา บันทึกเวลาการแตกตัวของเม็ดยาแต่ละเม็ด

5. การศึกษาการปลดปล่อยตัวยาจากยาเม็ดที่เคลือบทั้งสองชั้นในระบบที่จำลองภาวะทางเดินอาหาร

การศึกษาการปลดปล่อยตัวยาจากยาเม็ดที่เคลือบแล้วทั้งสองชั้น ใช้เครื่องทดสอบการละลายของยาเม็ด โดยมีสภาวะการทดสอบ ดังนี้

เครื่องวัดการละลาย	Dissolution Apparatus II (paddle)
อุณหภูมิทดสอบ	37±0.5 องศาเซลเซียส
อัตราเร็วการหมุน	100 รอบ/นาที
ตัวกลางจำลองสภาวะทางเดินอาหาร คือ	
สภาวะในกระเพาะอาหาร	0.1 N Hydrochloric acid pH 1.2 นาน 2 ชั่วโมง
ลำไส้เล็ก	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 นาน 3 ชั่วโมง

ลำไส้ใหญ่ส่วนต้น ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 และเก็บตัวอย่างที่เวลา 10, 20, 30, 60, 90 และ 120 นาที

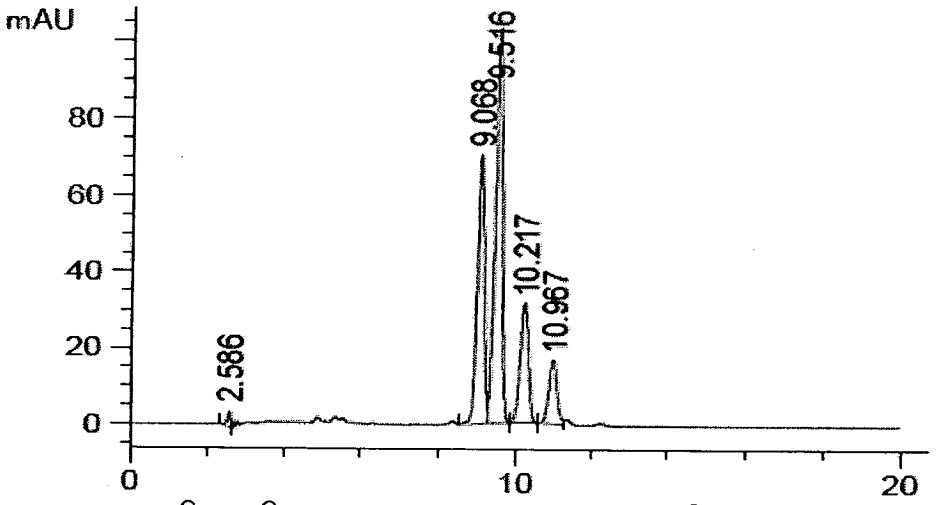
6. การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแกมม่า-โอไรซานอล

การเตรียมตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างที่ได้จากการทดสอบการละลายในข้อ 5 (5 มิลลิลิตร) มาแยกสกัด (Partition) แกมม่า-โอไรซานอลด้วยเฮกเซนครั้งละ 5 มิลลิลิตร ทั้งหมด 3 ครั้ง

2. นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมาระเหยเฮกเซนออกทั้งหมดด้วยเครื่องระเหยโดยการลดความดัน

3. วิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลด้วยเทคนิค Reversed-phase HPLC ด้วย Water SymetryShield C18 Column (250 x 5 mm) ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร โดยดัดแปลงวิธีจาก Saenjum et al., 2012 จากนั้นคำนวณหาปริมาณแกมม่า-โอไรซานอลโดยคำนวณจาก Peak ของสารสำคัญหลักทั้ง 4 ชนิด(รูปที่ 3.4) ซึ่งแสดงโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล ประกอบด้วยสารสำคัญหลักทั้งหมด 4 ชนิดคือ Cycloartenylferulate (R_t = 9.068), 24-Methylenecycloartanyl ferulate (R_t = 9.516), Campesterylferulate (R_t = 10.217) และ sitosterylferulate (R_t = 10.967) ตามลำดับ โดยการวิเคราะห์ปริมาณแกมมา-โอไรซานอลในการทดสอบการละลายของยาเม็ดนำส่งสารสกัดที่มีแกมมา-โอไรซานอลให้ไปแตกตัวในลำไส้ใหญ่จะใช้พื้นที่ใต้กราฟของสารสำคัญหลักทั้ง 4 ชนิดนี้ในการคำนวณหาปริมาณการละลายของยาเม็ดนำส่งสารสกัดที่มีแกมมา-โอไรซานอลในสภาวะต่างๆ ในระบบทางเดินอาหารต่อไป



รูปที่ 3.4 HPLC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานแกมมา-โอไรซานอลความเข้มข้น 50 µg/mL