

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. สารเคมี

- 1.1 Magnesium aluminum silicate (Veegum[®] HV) (R.T.Vanderbilt Company, Inc., USA)
- 1.2 Nicotine (Fluka, Switzerland)
- 1.3 Hydrochloric acid (Merck KGaA Darmstadt, Germany)
- 1.4 Sodium hydroxide (Merck KGaA Darmstadt, Germany)
- 1.5 Sodium dihydrogen phosphate (Merck KGaA Darmstadt, Germany)
- 1.6 di-sodium hydrogen phosphate (Merck KGaA Darmstadt, Germany)
- 1.7 Sodium chloride (Merck KGaA Darmstadt, Germany)
- 1.8 Sodium alginate (Manugel[®]) (ISP Thailand, Thailand)
- 1.9 Magnesium stearate
- 1.10 Hydroxypropylmethylcellulose 10-20 cps, low viscosity (Cotacel C15[®]) (Onimax, Thailand)
- 1.11 Hydroxypropylmethylcellulose 40-60 cps, medium viscosity (Cotacel C50[®]) (Onimax, Thailand)
- 1.12 Hydroxypropylmethylcellulose 80-120 cps, high viscosity
(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany)
- 1.13 Magnesium hydroxide
- 1.14 Citric acid monohydrate (Merck KGaA Darmstadt, Germany)
- 1.15 Methanol (Merck KGaA Darmstadt, Germany)
- 1.16 Triethylamine (Merck KGaA Darmstadt, Germany)
- 1.17 Sodium acetate (Merck KGaA Darmstadt, Germany)
- 1.18 Acetic acid 100% (Merck KGaA Darmstadt, Germany)

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 2.1 pH meter (TI 9000, WalkLAB)
- 2.2 Shaking water bath LSB-030S (Daihan Labtech, Korea)
- 2.3 UV-visible spectrophotometer (SHIMADZU UV1201, Japan)
- 2.4 Mastersizer 2000 (MALVERN instrument, UK)
- 2.5 Hot air oven UNE 200 (MEMMERT GmbH, Germany)
- 2.6 Sonicator (Elma Transonic 700/H)
- 2.7 ชุดตกยาเม็ดสำหรับเครื่องคอกไฮโดรลิก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร

- 2.8 Monsanto hardness tester
- 2.9 Vernier caliper
- 2.10 USP dissolution apparatus (Vankel VK 200, USA)
- 2.11 High performance liquid chromatography (Perkin Elmer Series 200, USA)
- 2.12 Texture analyzer (TA.XT plus, Stable Micro System, UK)
- 2.13 Brookfield (Model DV-III, Programable Rheometer, USA)

3. วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต

3.1.1 การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต

เตรียมสารกระจายแมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกตความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยชั่งแมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต กระจายในน้ำร้อนที่เตรียมจากน้ำปราศจากไอออน บั่นผสมให้กระจายตัวสม่ำเสมอโดยใช้ Magnetic stirrer ทิ้งไว้ให้เย็น เตรียมสารละลายนิโคตินความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรในน้ำปราศจากไอออน ผสมสารกระจายแมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกตปริมาณ 50 มิลลิลิตร กับสารละลายนิโคตินที่เตรียมไว้ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ใน erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร ให้ได้ค่าพีเอช 4 พีเอช 7 และพีเอช 9 ปิดปาก erlenmeyer flask ให้สนิท นำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 75 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองสารกระจายผสมที่เตรียมได้เพื่อเก็บส่วนตะกอนล้างตะกอนโดยใช้น้ำปราศจากไอออน 20 มิลลิลิตร 2 ครั้ง นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บดลดขนาดตะกอนสารที่แห้งแล้วด้วยโกร่งและลูกโกร่ง แรงผ่านตะแกรงขนาด 180 ไมครอน ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต นำไปเก็บในตู้ดูดความชื้นเพื่อรอการทดสอบ

3.1.2 การประเมินคุณสมบัติสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต

3.1.2.1 ขนาดอนุภาคสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต

ทำการกระจายสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต ปริมาณเล็กน้อย ลงในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 70 มิลลิลิตร วัดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Mastersizer 2000 โดยเลือกใช้เครื่องมือสำหรับวัดขนาดอนุภาคที่กระจายในสารละลาย คือ Hydro SM small volume sample dispersion

3.1.2.2 ปริมาณนิโคตินที่ถูกดูดซับโดยแมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต

ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกตประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลต่อลิตร เพื่อปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท นำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เข้า 75 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำสารละลายส่วนใส่ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 259 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer คำนวณหาปริมาณนิโคตินที่ถูกดูดซับในสารประกอบเชิงซ้อน

3.1.2.3 ศึกษาความสามารถในการปลดปล่อยนิโคติน จากสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต

นำ USP dissolution apparatus I (basket method) มาดัดแปลงให้สามารถใช้กับอนุภาคของสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกตได้ โดยใช้เมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตตขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน ทำการเตรียมเมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตตก่อนการทดสอบ โดยใช้กรดเมมเบรนในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 (pH 6.0 phosphate buffer) ให้อิ่มตัว เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำเมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตตที่ทำกรไฮเครดแล้วใส่ลงใน basket ของ USP dissolution apparatus I เพื่อเป็นตัวรองรับ ป้องกันไม่ให้อนุภาคของสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกตหลุดออกจาก basket

ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกตที่ใช้เทียบเท่านิโคติน 15 มิลลิกรัม ซึ่งสารใส่ลงบนเมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตตที่อยู่ภายใน basket แล้วนำไปทำการทดสอบตัวกลางการละลายที่ใช้คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร basket หมุนด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที เก็บสารละลายตัวอย่างครั้งละ 7 มิลลิลิตร ที่เวลา 2 5 10 15 20 30 45 60 90 120 180 240 300 360 420 และ 480 นาที เติมตัวกลางการละลายปริมาณเท่ากับที่เก็บลงไปทดแทนทุกครั้งทำการเก็บตัวอย่าง กรองสารละลายตัวอย่างผ่านเมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตตขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 259 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

3.2 ยาเม็ดเมทริกซ์บรรจุสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต

ยาเม็ดที่ใช้ทดสอบมีรูปร่างกลมแบน ผิวหน้าเรียบทั้งสองด้าน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร เตรียมโดยวิธีการตอกโดยตรง (direct compression)

3.2.1 เตรียมยาเม็ดเมทริกซ์บรรจุสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต

ยาเม็ดเมทริกซ์ประกอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต ผสมกับพอลิเมอร์ ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณนิโคตินในตำรับ ปรับน้ำหนักยาเม็ดเท่ากับ 200 มิลลิกรัม ด้วยพอลิเมอร์ ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 3 นาที เติมน้ำแมกนีเซียมสเตียเรตเพื่อเป็นสารหล่อลื่น ปริมาณร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ผสมต่อ 1 นาที นำไปตอกอัดโดยใช้ชุดสากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร ใช้ความดันในการตอก 23.7 เมกะปาสคาลทุกตำรับ ด้วยเครื่องตอกไฮโดรลิก

3.2.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อคุณลักษณะของยาเม็ดเมทริกซ์บรรจุสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต

3.2.2.1 ผลของพีเอชที่เตรียมสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต
ทำการศึกษาด้วยยาเม็ดเมทริกซ์ที่ใช้โซเดียมอัลจินตเป็นพอลิเมอร์ แบ่งเป็น 3 กลุ่มตามพีเอชที่เตรียมสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต คือ พีเอช 4 7 และ 9

3.2.2.2 ผลของปริมาณนิโคตินในตำรับ

(1) ยาเม็ดเมทริกซ์ที่ใช้โซเดียมอัลจินตเป็นพอลิเมอร์
แต่ละกลุ่มการทดลองที่แบ่งตามพีเอชที่เตรียมสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต นำมาแบ่งเป็นกลุ่มละ 4 ตำรับ ที่มีปริมาณนิโคตินแตกต่างกัน ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกตที่ใช้คือเม็ดเทียบเท่านิโคติน 5 10 และ 15 มิลลิกรัม ส่วนอีกตำรับใช้สารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกตเป็นส่วนผสมทั้งหมด คือ 200 มิลลิกรัม ส่วนประกอบแต่ละตำรับแสดงดังตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบในตำรับยาเม็ดเมทริกซ์โซเดียมอัลจินต บรรจุสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต ที่เตรียมที่พีเอช 4

ส่วนประกอบในตำรับ	F 1	F 2	F 3	F 4
	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อเม็ด)			
สารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต ที่เตรียมที่พีเอช 4	55	110	166	200
โซเดียมอัลจินต	145	90	34	-
แมกนีเซียมสเตียเรต	2	2	2	2
น้ำหนักยาเม็ดทั้งหมด	202			
ปริมาณนิโคตินในตำรับ	5	10	15	19

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบในคำรับยาเม็ดเมทริกซ์โซเดียมอัลจินต บรรจุสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต ที่เตรียมที่พีเอช 7

ส่วนประกอบในคำรับ	F 1	F 2	F 3	F 4
	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อเม็ด)			
สารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต ที่เตรียมที่พีเอช 7	43	86	129	200
โซเดียมอัลจินต	157	114	71	-
แมกนีเซียมสเตียเรต	2	2	2	2
น้ำหนักยาเม็ดทั้งหมด	202			
ปริมาณนิโคตินในคำรับ (มิลลิกรัม)	5	10	15	24

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบในคำรับยาเม็ดเมทริกซ์โซเดียมอัลจินต บรรจุสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต ที่เตรียมที่พีเอช 9

ส่วนประกอบในคำรับ	F 1	F 2	F 3	F 4
	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อเม็ด)			
สารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต ที่เตรียมที่พีเอช 9	40	80	120	200
โซเดียมอัลจินต	160	120	80	-
แมกนีเซียมสเตียเรต	2	2	2	2
น้ำหนักยาเม็ดทั้งหมด	202			
ปริมาณนิโคตินในคำรับ (มิลลิกรัม)	5	10	15	26

(2) ยาเม็ดเมทริกซ์ที่ใช้ไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์

ยาเม็ดเมทริกซ์ที่นำมาทดสอบในขั้นตอนนี้ เตรียมจากสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกตที่เตรียมที่พีเอช 9 และไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลสชนิดความหนืด 50 เซนติพอยส์ แบ่งเป็น 3 คำรับ ที่มีปริมาณนิโคตินแตกต่างกัน ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกตที่ใช้ต่อเม็ดเทียบเท่านิโคติน 5 10 และ 15 มิลลิกรัม ส่วนประกอบแต่ละคำรับแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบในตำรับยาเม็ดเมทริกซ์ไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส บรรจุสารประกอบเชิงซ้อน นิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมินัมซิลิเคต ที่เตรียมที่พีเอช 9

ส่วนประกอบในตำรับ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อเม็ด)				
สารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมินัมซิลิเคต ที่เตรียมที่พีเอช 9	40	80	120	120	120
ไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส					
- เกรดความหนืด 50 เซนติพอยส์	160	120	80	-	-
- เกรดความหนืด 15 เซนติพอยส์	-	-	-	80	-
- เกรดความหนืด 100 เซนติพอยส์	-	-	-	-	80
แมกนีเซียมสเตียเรท	2	2	2	2	2
น้ำหนักยาเม็ดทั้งหมด			202		
ปริมาณนิโคตินในตำรับ	5	10	15	15	15

3.2.2.3 ผลของพอลิเมอร์ที่ใช้เป็นส่วนประกอบในตำรับ

พอลิเมอร์ที่ใช้ทดสอบ มี 2 ชนิด คือ โซเดียมอัลจิเนต และไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส สำหรับไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส เลือกใช้ 3 ชนิดที่มีความหนืดแตกต่างกัน คือ เกรดความหนืด 15 50 และ 100 เซนติพอยส์ ศึกษาผลของพอลิเมอร์โดยใช้ยาเม็ดเมทริกซ์ที่เตรียมจากสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมินัมซิลิเคตที่เตรียมที่พีเอช 9 ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนเทียบเท่านิโคติน 15 มิลลิกรัม ส่วนประกอบแต่ละตำรับแสดงดังตารางที่ 5

3.2.2.4 ผลของเกล็ด กรด หรือด่าง ที่เป็นส่วนประกอบในตำรับ

ศึกษาโดยใช้ยาเม็ดเมทริกซ์ ที่เตรียมจากสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมินัมซิลิเคตที่เตรียมที่พีเอช 9 ปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนเทียบเท่านิโคติน 15 มิลลิกรัม พอลิเมอร์ที่ใช้คือไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลสเกรดความหนืด 50 เซนติพอยส์ เติมน้ำเกล็ด กรด หรือด่าง ที่ต้องการทดสอบลงในตำรับ ปริมาณเท่ากับร้อยละ 5 10 และ 20 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก หรือเท่ากับ 10 20 และ 40 มิลลิกรัมต่อเม็ด กำหนดให้สัดส่วนระหว่างสารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมินัมซิลิเคต และไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลสคงที่ ส่งผลให้น้ำหนักยาเม็ดเมทริกซ์เพิ่มขึ้นตามปริมาณสารที่เติม เกล็ด กรด และด่างที่ใช้ศึกษา คือ โซเดียมคลอไรด์ กรดซิตริก และแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ตามลำดับ ส่วนประกอบแต่ละตำรับแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบในตำรับยาเม็ดเมทริกซ์ไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส บรรจุสารประกอบเชิงซ้อน นิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกตที่เตรียมที่พีเอช 9 และมีปริมาณนิโคติน 15 มิลลิกรัมต่อเม็ด ที่เติม เกลือ กรด และด่าง ปริมาณต่างๆ

ส่วนประกอบในตำรับ	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อเม็ด)		
สารประกอบเชิงซ้อนนิโคติน-แมกนีเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต ที่เตรียมที่พีเอช 9	120	120	120
ไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลสเกรดความหนืด 50 เซนติพอยส์	80	80	80
แมกนีเซียมสเตียเรท	2	2	2
โซเดียมคลอไรด์ หรือ กรดซิตริก หรือ	10	20	40
แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์	(ร้อยละ 5)	(ร้อยละ 10)	(ร้อยละ 20)
น้ำหนัทยาเม็ดทั้งหมด	212	222	242

3.2.3 การประเมินคุณลักษณะยาเม็ดเมทริกซ์

3.2.3.1 ความแข็งและความหนาของยาเม็ดเมทริกซ์

ทดสอบโดยเครื่อง Monsanto hardness tester และ Vernier caliper ตามลำดับ

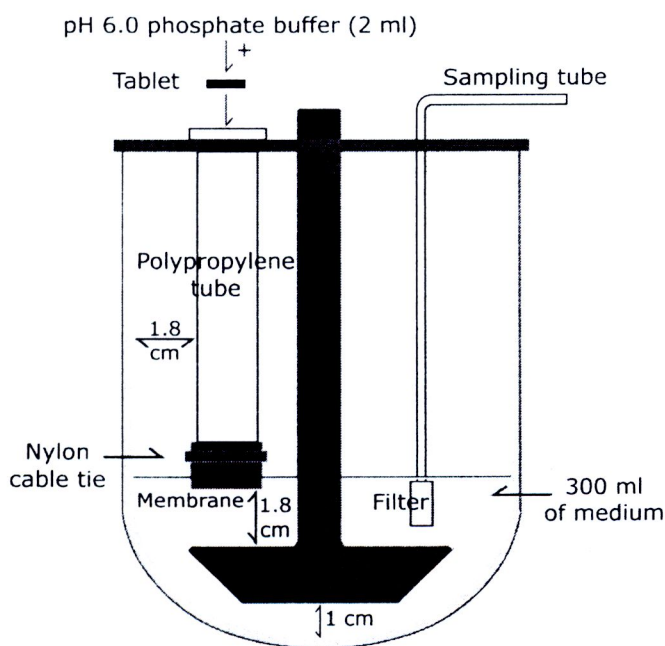
3.2.3.2 การปลดปล่อยนิโคตินจากยาเม็ดเมทริกซ์ทั้งเม็ด

เครื่องมือที่ใช้ทดสอบ คือ USP dissolution apparatus I (basket method) ตัวกลาง การละลาย คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส basket หมุนด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที เก็บสารละลายตัวอย่างครั้งละ 7 มิลลิลิตร ที่เวลา 2 5 10 15 20 30 45 60 90 120 180 240 300 360 420 และ 480 นาที เติมตัวกลางการละลายปริมาณเท่ากับที่เก็บลงไปทดแทนทุกครั้งที่ทำกรเก็บ ตัวอย่าง กรองสารละลายตัวอย่างผ่านเมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตตขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน วิเคราะห์หาปริมาณ นิโคติน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 259 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer

3.2.3.3 การปลดปล่อยนิโคตินจากยาเม็ดเมทริกซ์เพียงด้านเดียว ผ่านเมมเบรนเซลลูโลส อะซีเตต

ศึกษาการปลดปล่อยนิโคตินจากยาเม็ดเมทริกซ์ โดยใช้เมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตต ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เป็นเยื่อกั้น เตรียมเมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตตก่อนการทดสอบ โดยไฮดรอลเมมเบรน ในตัวกลางการละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 ให้อิ่มตัว เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เครื่องมือที่ใช้ทดสอบ คือ USP dissolution apparatus II (paddle method) ที่นำมาดัดแปลงโดยใช้หลอดพอลิพรอพิลีนบรรจุตัวอย่างที่ ต้องการทดสอบ (ภาพที่ 6) ยึดเมมเบรนเซลลูโลสอะซีเตตที่ทำการไฮดรอลแล้วติดกับปลายหลอดพอลิพรอพิลีน (polypropylene tube) โดยใช้สายไนลอน (nylon cable tie) ปรับระดับให้ปลายหลอดสัมผัสผิวหน้าตัวกลาง

การละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์พีเอช 6.0 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เริ่มทดสอบ โดยใส่ยาเม็ดเมทริกซ์ลงในหลอดพอลิพรอพิลีน จากนั้นเติมฟอสเฟตบัพเฟอร์พีเอช 6.0 ปริมาณ 2 มิลลิลิตรลงในหลอดพอลิพรอพิลีน กวนด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที เก็บสารละลายตัวอย่างครั้งละ 7 มิลลิลิตร ที่เวลา 5 15 30 60 120 180 240 360 และ 480 นาที เติมตัวกลางการละลายปริมาณเท่ากับที่เก็บลงไปทดแทนทุกครั้งที่ทำกรเก็บตัวอย่าง นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินโดยวิธี HPLC



ภาพที่ 6 USP dissolution apparatus II ที่ดัดแปลงให้เหมาะกับการทดสอบ
(modified USP dissolution apparatus II)

3.2.3.4 การซึมผ่านเยื่อเมือกของนิโคตินจากยาเม็ดเมทริกซ์

(I) การเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับทดสอบ

ใช้เยื่อเมือกหลอดอาหารหนูเป็นเมมเบรน (แหล่งที่มาคือ ตลาดบ้านโนนม่วง อ.เมือง จ.ขอนแก่น) เนื่องจากชนิดและปริมาณไขมันที่เป็นส่วนประกอบคล้ายกับเยื่อเมือกกระพุ้งแก้มหนู และคุณสมบัติการยอมให้สารซึมผ่านใกล้เคียงกัน (Diaz del Consuelo et al., 2005) เตรียมโดยล้างหลอดอาหารหนูให้สะอาดด้วยฟอสเฟตบัพเฟอร์ไอโซโทนิกพีเอช 7.4 (pH 7.4 isotonic phosphate buffer) ตัดหลอดอาหารหนูให้ได้ความยาวประมาณ 3-4 เซนติเมตร แช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นแช่ในฟอสเฟตบัพเฟอร์ไอโซโทนิกพีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนที่เป็นกล้ามเนื้อออก นำไปเก็บในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบ (Diaz del Consuelo et al., 2007)

(2) วิธีการทดสอบ

เมื่อต้องการทดสอบ นำเนื้อเยื่อที่เตรียมแช่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไอโซโทนิกพีเอช 7.4 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เครื่องมือที่ใช้ทดสอบ คือ USP dissolution apparatus II (paddle method) ที่นำมาดัดแปลงโดยใช้หลอดพอลิพรอพิลีนบรรจุตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (ภาพที่ 6) ยึดเมมเบรนติดกับปลายหลอดพอลิพรอพิลีน (polypropylene tube) โดยใช้สายไนลอน (nylon cable tie) ปรับระดับให้ปลายหลอดสัมผัสผิวหน้าตัวกลางการละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไอโซโทนิกพีเอช 7.4 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เริ่มทดสอบโดยใส่ยาเม็ดเมทริกซ์ลงในหลอดพอลิพรอพิลีน จากนั้นเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 ปริมาณ 2 มิลลิลิตรลงในหลอดพอลิพรอพิลีน กวนด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที เก็บสารละลายตัวอย่างครั้งละ 7 มิลลิลิตร ที่เวลา 15 30 60 120 180 240 360 และ 480 นาที เติมตัวกลางการละลายปริมาณเท่ากับที่เก็บลงไปทดแทนทุกครั้งที่ทำกรเก็บตัวอย่าง กรองสารละลายตัวอย่างผ่านเมมเบรนเซลลูโลสอะซิเตดขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินโดยวิธี HPLC

3.2.3.5 การยัดติดทางชีวภาพของยาเม็ดเมทริกซ์

(1) การเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับทดสอบ

ศึกษาภายนอกร่างกาย (in vitro) โดยใช้เยื่อเมือกหลอดอาหารหนูในการทดสอบ ล้างหลอดอาหารหนูให้สะอาดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไอโซโทนิกพีเอช 7.4 ตัดหลอดอาหารหนูขนาด 2 x 2 เซนติเมตร แช่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไอโซโทนิกพีเอช 7.4 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนที่เป็นกล้ามเนื้อออกก่อนการทดสอบ ให้ทำการทดสอบภายในวันที่ทำการเตรียมเยื่อเมือก

(2) วิธีการทดสอบ

ทำการทดสอบด้วยเครื่อง Texture analyzer ใช้ load cell ขนาด 50 นิวตัน (5 กิโลกรัม) ยาเม็ดเมทริกซ์ที่ทดสอบยัดติดกับ probe โดยใช้กระดากาวสองหน้า ยึดเนื้อเยื่อติดกับแท่นทดสอบ ให้แน่น เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ลงบนเนื้อเยื่อบริเวณที่ทดสอบ ควบคุมให้ยาเม็ดเมทริกซ์สัมผัสผิวเยื่อเมือกด้วยแรงกด 0.50 นิวตัน ระยะเวลาการสัมผัส 2 นาที เมื่อเริ่มทดสอบกำหนดให้ probe เคลื่อนที่ขึ้นด้วยอัตราเร็ว 0.50 มิลลิเมตรต่อวินาที หาความสัมพันธ์ระหว่างแรงที่ใช้กับระยะทาง นำมาคำนวณค่า maximum detachment force และ work of adhesion

3.3 การศึกษาคุณสมบัติของไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส

3.3.1 ขนาดอนุภาค

วัดขนาดอนุภาค โดยใช้เครื่อง Mastersizer 2000 เลือกใช้เครื่องมือสำหรับวัดขนาดอนุภาคของสารในรูปผงแห้ง คือ Scirocco 2000 dry powder feeder

3.3.2 ความหนาแน่น

3.3.2.1 Bulk density

ชั่งพอลิเมอร์ปริมาณ 25 กรัม ค่อยๆ เทสารลงในกระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร ที่แห้งสนิท อ่านค่าปริมาตรของสารที่ได้ นำไปคำนวณหาค่า bulk density

3.3.2.2 Tapped density

ชั่งพอลิเมอร์ปริมาณ 25 กรัม ค่อยๆ เทสารลงในกระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร ที่แห้งสนิท บันทึกค่าปริมาตรเริ่มต้นของสาร เติบกระบอกตวงโดยการยกขึ้นที่ระดับความสูงประมาณ 1 นิ้ว แล้วปล่อยลง จำนวน 100 ครั้ง ด้วยความสูงระดับเดียวกัน บันทึกค่าปริมาตรสุดท้าย แล้วคำนวณหาค่า bulk density

3.3.3 ความหนืดของสารกระจายไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส และโซเดียมอัลจินต

เตรียมสารกระจายของพอลิเมอร์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร วัดความหนืดของสารโดยใช้เครื่อง Brookfield ควบคุมอุณหภูมิที่ 32 องศาเซลเซียส หาความสัมพันธ์ระหว่าง shearing stress และ rate of shear และคำนวณหาค่าความหนืดของสารกระจาย

3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินโดยใช้โครมาโตกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC-UV detector)

ใช้สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินที่ปลดปล่อยผ่านเมมเบรนเซลลูโลสอะซิเตด และปริมาณนิโคตินที่ซึมผ่านเยื่อเมือกหลอดอาหารหนู

3.4.1 ระบบที่ใช้วิเคราะห์

ชนิดของคอลัมน์ที่ใช้ คือ reversed phase C18 วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วย 0.05 โมลต่อลิตรของ โซเดียมอะซิเตด (sodium acetate) เมทานอล (methanol) และไตรเอทิลเอมีน (triethylamine) ในอัตราส่วน 88 ต่อ 12 และ 0.5 ตามลำดับ ปรับพีเอชด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) ให้ได้พีเอชเท่ากับ 4.2 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ (flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดปริมาณสารตัวอย่างด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 259 นาโนเมตร เวลาของการเกิดพีคสูงสุด (retention time) ของสารที่วิเคราะห์เท่ากับ 7.6 นาที กราฟสารละลายมาตรฐานของนิโคตินเป็นเส้นตรง ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4.2 การตรวจสอบวิธีการวิเคราะห์ (validation)

เพื่อตรวจสอบว่าวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ ทำได้โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานนิโคติน 5 ระดับความเข้มข้น ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 เป็นตัวทำละลาย สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินปลดปล่อยผ่านเมมเบรนเซลลูโลสอะซิเตดขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน และใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไอโซโทนิกพีเอช 7.4 เป็นตัวทำละลาย สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณนิโคตินที่ซึมผ่าน

เชื้อเมือกหลอดอาหารหมู ทำการวิเคราะห์โดยฉีดสารละลายความเข้มข้นละ 3 ครั้ง บันทึกค่าพื้นที่ใต้กราฟของฟิคนิโคตินในโครมาโตแกรม (chromatogram) แล้วนำมาคำนวณหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) เปรียบเทียบค่าที่ได้ภายใน 1 วัน (intraday) และค่าที่ได้ระหว่างวัน (interday) เป็นเวลา 3 วัน ร้อยละของค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนต้องไม่เกิน ร้อยละ 2 จึงจะถือว่าระบบที่ทำการวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือ (USP 31 NF 26, 2008)

3.5 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลมากกว่า 2 กลุ่ม วิเคราะห์โดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) และเลือกใช้ Least significant difference (LSD) test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูล 2 กลุ่ม โดยใช้โปรแกรม SPSS for MS windows, release 11.5 (SPSS (Thailand) Co., Ltd., Bangkok, Thailand)