บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและสารมาตรฐาน

สารเคมีและสารมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้อยู่ในระดับ Analytical grade หรือ HPLC grade ดังแสดง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Absolute ethanol	Merck
Acetic acid (HPLC grade)	Merck
Acetronitrite (HPLC grade)	Labscan
Alpha-tocopherol	Wako
Alpha-tocotrienol	Wako
Beta-tocopherol	Wako
Beta-tocotrienol	Wako
Colloidal silicon dioxide, Aerosil®	Bio-Chemical Technology Co.,Ltd.
Delta-tocopherol	Wako
Delta-tocotrienol	Wako
Dichloromethane (HPLC grade)	Merck
Di-Sodium dihydrogen orthophosphate (Na_2HPO_4)	Ajex Finechem
DR cap Capsule	CAPSUGEL
Gamma-oryzanol	Wako
Gamma-tocopherol	Wako
Gamma-tocotrienol	Wako
Hydrochloric acid	Merck
Isopropyl alcohol	RCL LabScan
Lactose	Merck
Magnesium stearate	Linghu Xinwang Chemical Co.,LTD

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Methanol (HPLC grade)	Labscan
Polyvinyl pyrrolidone K90	Fluka Analytical
Sodium dihydrogen orthophosphate	Ajax Finechem
Sodium hydroxide	RCI Labscan
Talcum powder, micronized	Union Science Co.,Ltd.

3.2 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย ดังแสดง

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC-Fluorescence detector)	Shimadzu
โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC-UV detector)	Agilent-1100
เครื่องระเหยโดยการลดความดัน	Buchi
เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance)	Sartorious
ตะแกรงร่อน (Test sieves) ขนาดรูเปิดต่างๆ	USA Standard testing Sieve
เครื่องทดสอบการละลายของยาเม็ด SR8PLUS	Hanson Virtual
เครื่องวัดการแตกตัวของเม็ดยา	PharmaTest
เครื่องชั่งวิเคราะห์ Sartorius, Analytical AC2105	Germany
เครื่องชั่งไฟฟ้าสองตำแหน่ง ScoutPro, SPS202	OHAUS
เครื่องบรรจุแคปซูลกึ่งอัตโนมัติ PANVIV.A01 M. NO.653	The union chemical and surgical
เครื่องปั่น, Polytron® PT-MR3000	Kinematica AG
Analytical Balance, SBC31	SCALTEC
Biohazard hood	CTL
Homogenizer, Polytron (Polytron PT 3000)	Kinematica AG
Hot Air Oven (Type UL 40)	Memmert
Supercritical fluid extractor	THORN®

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
Infrared Thermometer, OAKTON®Temp®IR	China
Jolting volumeter, JEL STAMPFVOLMETER STAV2003	Meditron Co.,Ltd.
Magnetic stirrer (REMIM RSM-4DR)	AS ONE Japan
Mixer	Heidolph
Moisture Analyzer Sartorius Mechatronics, MA500	Germany
pH meter	Metrohm
pH/Temperature meter AZ-8686	Taiwan
Water bath temperature controller	Memmert
เครื่องบีบเย็น	ห้างหุ้นส่วนจำกัด เพื่อนพลังงาน

3.3 วิธีการทดลอง

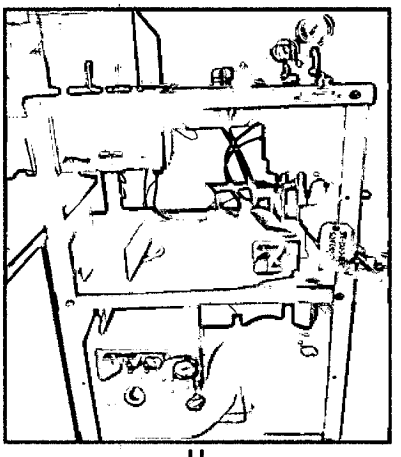
3.3.1 การสกัดและเตรียมตัวอย่างน้ำมันรำข้าวก่ำ

คัดเลือกข้าวก่ำสายพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือที่มีฤทธิ์ป้องกันการก่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และไส้ตรงจำนวน 3 ตัวอย่างจากโครงการวิจัยที่ได้วิจัยมาแล้วคือ โครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณและกลไกการป้องกันการก่อมะเร็งของสารสกัดแกมม่า-โอไรซานอลที่สกัดจากข้าวไทย" ซึ่งประกอบด้วยข้าวก่ำบิ้ง ข้าวก่ำต่อและข้าวก่ำปาอีคอ และอีก 1 ตัวอย่างคือ ข้าวก่ำลืมผัว จากแผนงานวิจัยเรื่อง "การใช้ประโยชน์จากข้าวสายพันธุ์ท้องถิ่นภาคเหนือเพื่อเป็นวัตถุเติมอาหาร สารช่วยทางเภสัชกรรม และอาหารเสริมสุขภาพปรับสมดุลระบบทางเดินอาหารและป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ ในรูปแบบแป้งข้าวต้านทานการย่อย ส่วนสกัดข้าวที่ผ่านการเปลี่ยนรูปทางชีวภาพและผลิตภัณฑ์คล้ายโยเกิร์ตหมักจากข้าว" ข้าวก่ำดอยสะเก็ด ข้าวก่ำพะเยาและข้าวก่ำเชียงราย รวมทั้งสิ้น 7 ตัวอย่าง คัดเลือกตัวอย่างข้าวขาว 2 ตัวอย่างคือ ข้าวเหนียวสันป่าตองและข้าวขาวดอกมะลิ 105 นำตัวอย่างข้าวทั้ง 9 ชนิดมากะเทาะเปลือกออกเพื่อเก็บตัวอย่างรำข้าว จากนั้นนำรำข้าวที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาสกัดตามแผนภูมิ

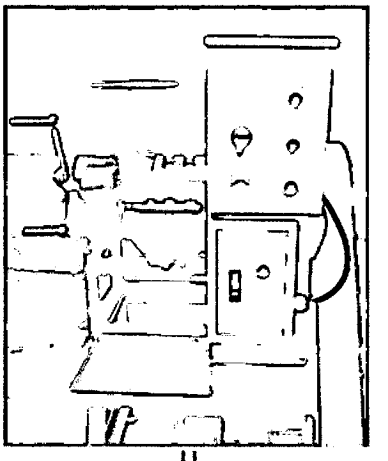
ตัวอย่างรำข้าว

⇓

สกัดด้วยเทคนิคคาร์บอนไดออกไซด์วิกฤตยิ่งยวด



สกัดด้วยการบีบเย็น



⇓

น้ำมันรำข้าว

⇓

ชั่งน้ำหนักน้ำมันรำข้าวที่ได้ คำนวณหา %Yield

เก็บในขวดป้องกันแสงและที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

3.3.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (Saenjum *et al.*, 2010) โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารประกอบฟีนอลิก ในการเปลี่ยนสารละลาย Folin-Ciocalteu ที่มีสีเหลือง (Molybdotung-stophosphoric heteropolyanion reagent) ในสภาวะที่เป็นด่างให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน (Molybdotungstophosphate blue) ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

สกัดตัวอย่างน้ำมันด้วยเอทานอล แล้วนำสารละลายที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออก

ด้วยเครื่องระเหยโดยการลดความดัน

⇓

เตรียม Folin-Ciocalteu stock solution และ Sodium bicarbonate

⇓

เตรียม Gallic acid ซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐานสำหรับการทดสอบ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

⇓

เตรียมตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

⇓

Reaction mixture ประกอบด้วยน้ำปราศจากไอออน 1.5 มิลลิลิตร สารละลาย Sodium bicarbonate 300 ไมโครลิตร สารละลาย Folin-Ciocalteu 100 ไมโครลิตรและสารละลายตัวอย่าง หรือสารมาตรฐาน 100 ไมโครลิตร

⇓

วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร

⇓

คำนวณหาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลลิคโดยรวมของสารสกัดตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน Gallic acid

3.3.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยเทคนิค UV/Vis-Spectrophotometry โดยดัดแปลงวิธีของ Shen *et al.*, 2010

สกัดตัวอย่างน้ำมันด้วยเอทานอล แล้วนำสารละลายที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยโดยการลดความดัน

⇓

สารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมเอทานอล 4 มิลลิลิตร

⇓

เติม 5% $NaNO_2$ 0.3 มิลลิลิตร

⇓

ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม 10% $AlCl_3$ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร

⇓

ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม 1M NaOH 2 มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร

⇓

ผสมสารละลายให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

⇓

คำนวณหาปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยรวมของสารสกัดตัวอย่าง
จากกราฟมาตรฐาน Quercetin

3.3.4 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบแอนโธไซยานินทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมดวิเคราะห์ด้วยเทคนิค pH different spectrophotometry ดัดแปลงจากวิธีการของ Kim *et al.* (2005) โดยวัดจากการดูดกลืนแสงเทียบกับสารมาตรฐาน cyanidin 3-glucoside ดังนี้

เตรียมตัวอย่างโดยนำน้ำมันรำข้าวก่ำมาสกัดด้วย
สารละลาย 0.1 N กรดไฮโดรคลอลิกใน ethyl alcohol

⇓

เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

⇓

เตรียมสารละลาย Cyanidin ความเข้มข้น 0.1, 0.25, 0.5 และ 1.0
มิลลิโมลาร์ เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

⇓

Reaction mixture ประกอบด้วยสารละลายตัวอย่างในสารละลายกรดไฮโดรคลอลิค
ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 1.0 และ 4.5

⇓

นำไปตรวจวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง UV/VIS-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร

⇓

คำนวณหาปริมาณสารแอนโธไซยานินโดยรวมของสารสกัดตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน Cyanidin

3.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-โอไรซานอล

นำน้ำมันรำข้าวก่ำที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-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 โครมาโทแกรมของสารสำคัญหลักทั้ง 4 ชนิดคือ cycloartenyl ferulate, 24-methylenecycloartanyl ferulate, campesteryl ferulate, และ sitosteryl ferulate โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานแกมม่า-โอไรซานอล

3.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณโทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอล

ทำการดัดแปลงวิธีตรวจวิเคราะห์ปริมาณโทโคไทรอีนอลและโทโคฟีรอลด้วยเทคนิค Reversed-phase HPLC ด้วยตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอลทั้ง 8 รูปแบบคือ แอลฟ่า (α), แกมม่า (γ), บีต้า (β), และเดลต้า (δ) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Jang and Xu (2009) โดยสภาวะที่ใช้วิเคราะห์ประกอบด้วยคอลัมน์ RP-Column C-30 (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 250 x 4.6 มิลลิเมตร) ขนาดของวัฏภาคคงที่ (Stationary phase) เท่ากับ 5 ไมโครเมตร โดยวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) ประกอบด้วยอะเซทโทรไนไตรล์ เมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 50:40:10 โดยปริมาตร อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาทีและตรวจวิเคราะห์โทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอลที่ความยาวคลื่นการกระตุ้น (excitation wavelength) ที่ 292 นาโนเมตรและความยาวคลื่นการเรืองแสง (emission wavelength) ที่ 330 นาโนเมตร ทดสอบความสมเหตุสมผลของวิธีวิเคราะห์โดยประเมินจากพารามิเตอร์ดังนี้ standard linearity (R^2 and Range), precision (%CV), sensitivity (LOD and LOQ) จากนั้นจึงนำตัวอย่างน้ำมันรำข้าวก่ำมาวิเคราะห์ปริมาณโทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอลทั้ง 8 รูปแบบ จากวิธีวิเคราะห์ที่ได้ทำการดัดแปลงและตรวจสอบความสมเหตุสมผลของวิธีวิเคราะห์แล้ว

3.3.7 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมัน

การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยเทคนิค GC-MS/MS (Individual fatty acid content) ส่งตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการวิจัยและบริการ ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาราล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.8 การทดลองหาสารเจือจางที่เหมาะสมกับน้ำมันรำข้าวก่ำ

1. บดผสมน้ำมันรำข้าวก่ำ 1.00 กรัม และสารเจือจางในโกร่ง จนได้ผงผสมที่แห้ง

2. ชั่งหาน้ำหนักของสารดูดซับที่ใช้ คำนวณน้ำหนักต่อกรัมสารสกัดที่ทำให้ได้ผงผสมที่แห้ง สารเจือจางที่ใช้ได้แก่

- Microcrystalline cellulose (Avicel ® pH 101),
- Colloidal silicon dioxide
- ผงผสมของ Avicel® pH 101 กับ colloidal silicon dioxide ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักต่างๆ (1:1, 2:1, 3:1, 4:1)

3.3.9 การประเมินประสิทธิภาพสารเจือจางสำหรับน้ำมันรำข้าวก่ำ

การประเมินประสิทธิภาพสารเจือจางในข้อ 3.3.8 สำหรับน้ำมันรำข้าวก่ำมีตัวบ่งชี้ คือ

1. การหาปริมาณความชื้น-มีปริมาณร้อยละของความชื้นน้อยกว่า 5.00 (วิเคราะห์ด้วย Moisture Analyzer, Sartorius)

2. สมบัติการไหล - สามารถไหลได้ดีเยี่ยม (Carr's Compressibility index < 15)

3.3.9.1 การหาปริมาณความชื้น

เครื่องมือที่ใช้ในการหาปริมาณความชื้นของแกรนูล คือ เครื่องวิเคราะห์ความชื้น (Moisture Analyzer)

1. ชั่งแกรนูลให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 5.0000 กรัม
2. นำแกรนูลวางบนจานของเครื่องวิเคราะห์ความชื้น
3. เปิดเครื่องเพื่อให้ความร้อนแก่แกรนูล จนได้น้ำหนักคงที่
4. บันทึกน้ำหนักสุดท้ายและร้อยละของปริมาณความชื้น (%L)

3.3.9.2 การหาค่า Carr's Compressibility index (%)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองคือ เครื่องเคาะผงยา (Jolting volumeter)

1. ชั่งน้ำหนักกระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร
2. บรรจุแกรนูลตัวอย่าง ประมาณ 50 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนัก หักลบเพื่อให้ทราบน้ำหนักของแกรนูลตัวอย่าง
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

$$\text{Bulk density} = M / Vb \text{ กรัม/มิลลิลิตร}$$

6. คำนวณหาค่า Tapped density ของแกรนูลตัวอย่าง

$$\text{Tapped density} = M / Vt \text{ กรัม/มิลลิลิตร}$$

7. คำนวณหาค่า Carr's Compressibility index (%)

$$\text{Carr's Commpressibility index (\%)} = \frac{\text{Tapped density} - \text{Bulk density}}{\text{Tapped density}} \times 100$$

8. นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับค่าในตาราง เพื่อบ่งชี้สมบัติการไหลของแกรนูล

3.3.10 การเตรียมแกรนูลของสารสกัดแกมมาโอไรซานอล

สูตรตำรับ

น้ำมันรำข้าวก่ำ	10.0 g
สารเจือจางที่เหมาะสม	30.0 g
10% PVP in Iso-propanol	q.s.

วิธีเตรียม

1. บดผสมน้ำมันรำข้าวก่ำกับสารเจือจางที่เหมาะสมจนได้ผงแห้ง

2. เติมสารละลาย 10% PVP in Iso-propanol นวดให้เข้ากันดี ได้มวลเปียกที่เหมาะสม กดมวลเปียกผ่านแร่งหมายเลข 8

3. ทำให้แกรนูลแห้ง โดยผึ่งไว้ในอากาศ แล้วอบต่อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง

4. นำแกรนูลแห้งผ่านแร่ง หมายเลข 12

5. ชั่งน้ำหนักแกรนูลที่ได้ คำนวณหาปริมาณสารสำคัญ

6. เก็บแกรนูลไว้ใช้ศึกษาต่อไป

3.3.11 การเตรียมแคปซูลน้ำมันรำข้าวก่ำ

นำแกรนูลน้ำมันรำข้าวก่ำที่ได้จากข้อ 3.3.10 มาบรรจุแคปซูลชนิดเคลือบเอนเทอริก (DR Caps capsules No.1, CAPSUGEL, Thailand Co., Ltd.) ด้วยเครื่องบรรจุแคปซูลชนิดกึ่งอัตโนมัติ ดังรูปที่ 3.1 ซึ่งบรรจุได้ 150 แคปซูลต่อครั้ง

รูปที่ 3.1 เครื่องบรรจุแคปซูลชนิดกึ่งอัตโนมัติ

3.3.12 การประเมินคุณภาพแคปซูลน้ำมันรำข้าวก่ำ

นำแคปซูลที่บรรจุแล้วมาประเมินคุณภาพ ดังนี้

1. ตรวจลักษณะภายนอกของแคปซูล ต้องอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ ไม่มีรอยแตก ฉีกขาด ย่น หรือบุบ

2. ความแปรปรวนของน้ำหนักแคปซูล

เนื่องจากผลิตภัณฑ์แคปซูลน้ำมันรำข้าวก่ำ พัฒนาเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับใช้เสริมอาหาร (dietary supplements) การประเมินคุณภาพด้านความแปรปรวนของน้ำหนักแคปซูล จึงใช้เกณฑ์ของ USP36/NF31 <2019> WEIGHT VARIATION OF DIETARY SUPPLEMENTS

2.1 ประเมินความแปรปรวนของน้ำหนักรวม (gross weight) ของแคปซูล

- สุ่มตัวอย่างแคปซูล จำนวน 20 แคปซูล ชั่งน้ำหนักแต่ละแคปซูล ด้วยเครื่องชั่งวิเคราะห์ บันทึกน้ำหนักแต่ละแคปซูล
- หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าความแปรปรวนของแคปซูลเป็นที่ยอมรับได้ ถ้าน้ำหนักของแต่ละแคปซูลแตกต่างจากค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วงร้อยละ 90–110

2.2 ประเมินความแปรปรวนของน้ำหนักสุทธิ (net weight) ของแกรนูลที่บรรจุในแคปซูล

- สุ่มตัวอย่างแคปซูล จำนวน 20 แคปซูล ชั่งน้ำหนักแต่ละแคปซูล ด้วยเครื่องชั่งวิเคราะห์ บันทึกน้ำหนักแต่ละแคปซูล
- แยกฝาและตัวแคปซูล (capsule body) ออกจากกัน เทแกรนูลที่บรรจุภายในออก เคาะส่วนฝาและตัวแคปซูลกับพื้นเบาๆ ให้ส่วนของแกรนูลที่อาจติดค้างอยู่ภายในออกให้มากที่สุด
- ชั่งน้ำหนักฝาและตัวแคปซูลเปล่า ด้วยเครื่องชั่งวิเคราะห์
- หักลบน้ำหนักแคปซูลที่บรรจุแกรนูล ด้วยน้ำหนักแคปซูลเปล่า โดยต้องเป็นน้ำหนัก ที่ได้จากแคปซูลเดียวกัน บันทึกน้ำหนักที่ได้
- ทำวิธีเดียวกัน จนครบทั้ง 20 แคปซูล
- หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักแกรนูลสุทธิ
- หาผลต่างของน้ำหนักสุทธิของแกรนูลในแต่ละแคปซูล กับค่าน้ำหนักสุทธิเฉลี่ย

ค่าความแปรปรวนของน้ำหนักแคปซูลเป็นที่ยอมรับได้ ในกรณีต่อไปนี้

1) ต้องมีแคปซูลจำนวนไม่เกิน 2 แคปซูล ที่มีน้ำหนักสุทธิแตกต่างจากค่าเฉลี่ยมากว่าร้อยละ 10

2) ต้องไม่มีแคปซูลที่มีน้ำหนักสุทธิ แตกต่างจากค่าเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 25

3.3.13 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในน้ำมันรำข้าวก่ำชนิดแคปซูล

1. สุ่มน้ำมันรำข้าวก่ำชนิดแคปซูลจำนวน 10 แคปซูล ชั่งน้ำหนักทั้ง 10 แคปซูล ด้วยเครื่องชั่งวิเคราะห์ หาน้ำเฉลี่ยต่อแคปซูล

2. แยกฝาและตัวแคปซูล (capsule body) ออกจากกัน เทแกรนูลที่บรรจุภายในแคปซูลทั้ง 10 แคปซูล ใส่ในโกร่ง เคาะส่วนฝาและตัวแคปซูลเบาๆ เพื่อให้ส่วนของแกรนูลที่อาจติดค้างอยู่ภายในออกให้มากที่สุด บดผสมแกรนูลในโกร่งให้เข้ากันดี

3. ใช้ cotton bud เช็ดทำความสะอาดฝาและตัวแคปซูลให้สะอาด นำฝาและตัวแคปซูลกลับไปชั่งน้ำหนัก ด้วยเครื่องชั่งวิเคราะห์ หาค่าเฉลี่ยน้ำหนักแคปซูลเปล่าแต่ละแคปซูล

4. หักลบน้ำหนักเฉลี่ยในข้อ 1 ด้วยน้ำหนักเฉลี่ยในข้อ 3

5. ชั่งน้ำหนักแกรนูลในโกร่ง เท่ากับน้ำหนักในข้อ 4 ใส่ลงในขวดรูปชมพู่

6. สกัดด้วยสารละลายผสมระหว่างเฮกเซนและเอธิลอะซีเตต

7. ระเหยตัวทำละลายออก จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-โอไรซานอล โทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอลดังข้อ 3.3.5 และ 3.3.6 ตามลำดับ

8. ทำซ้ำข้อ 5-7 ทั้งหมด 3 ครั้ง (triplicate)

3.3.14 การศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญจากแคปซูลชนิดเคลือบเอนเทอริกในสภาวะจำลองกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น

1. สุ่มตัวอย่างแคปซูลน้ำมันรำข้าวจำนวน 6 แคปซูล

2. ศึกษาการปลดปล่อยสารสำคัญจากแคปซูลชนิดเคลือบเอนเทอริก โดยใช้เครื่องทดสอบการละลายของยาเม็ด (Dissolution Test Stations, Model SR8PLUS) มีสภาวะการทดสอบที่จำลองสภาวะกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ดังนี้

เครื่องวัดการละลาย Dissolution Apparatus I (Basket)

อุณหภูมิทดสอบ 37±0.5 องศาเซลเซียส

อัตราเร็วการหมุน 50 รอบ/นาที

ตัวกลางการละลาย จำลองสภาวะทางเดินอาหาร คือ

สภาวะในกระเพาะอาหาร simulated gastric fluid, pH 1.20 นาน 2 ชั่วโมง

ลำไส้เล็กส่วนต้น simulated intestinal fluid pH 6.80 เก็บตัวอย่างที่เวลา 5, 15, 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที ตามลำดับ

3. วิเคราะห์ปริมาณแกมม่า-โอไรซานอล โทโคไตรอีนอลและโทโคเฟอรอลด้วยเทคนิค reversed-phase HPLC ดังข้อ 3.3.5 และ 3.3.6 ตามลำดับ

4. หาค่าเฉลี่ยปริมาณสารสำคัญที่วิเคราะห์ได้ นำมาพล็อตกราฟการปลดปล่อยตัวยา

การเตรียมสารละลาย simulated gastric fluid w/o enzyme (pH 1.2)

1. ชั่ง sodium chloride 2.0 g ละลายในน้ำกลั่น ประมาณ 50 มิลลิลิตร
2. ปิเปต hydrochloric acid 7.0 mL ลงในน้ำกลั่นที่บรรจุขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลาย Sodium chloride ลงในข้อ 2 และเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร
4. ปรับ pH ด้วย 0.2 N HCl หรือ 0.2 N NaOH ให้ได้ pH 1.2±0.1

การเตรียมสารละลาย simulated intestinal fluid w/o enzyme (pH 6.8)–USP33/NF28

1. ชั่ง potassium phosphate, monobasic 6.8 g ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย 0.2 N sodium hydroxide จำนวน 77 มิลลิลิตร
3. เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร
3. ปรับ pH ด้วย 0.2 N HCl หรือ 0.2 N NaOH ให้ได้ pH 6.8±0.1

3.3.15 การจัดทำมาตรฐานของผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวก่ำชนิดแคปซูล

จัดทำมาตรฐานของผลิตภัณฑ์น้ำมันรำข้าวก่ำชนิดแคปซูลตามมาตรฐานของกองควบคุมอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) โดยส่งตรวจปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อน ณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่ และจัดทำมาตรฐานปริมาณสารสำคัญตาม ข้อ 3.3.13 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในน้ำมันรำข้าวก่ำชนิดแคปซูล