

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 สารเคมีและวัสดุ

3.1.1 สารเคมี

1. Calcium Chloride (Merck, Germany)
2. Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate (Merck, Germany)
3. Hydrochloric acid, 0.1 N (Lab – Scan, Ireland)
4. Iodine crystal (Merck, Germany)
5. Monobasic sodium phosphate (Carlo Erba Reagenti, Germany)
6. Pectin ชนิด low ester LC – 710 (Danisco, Denmark)
7. Polyvinyl pyrrolidone (PVP K-90) (Shanghai Well Tone, China)
8. Potassium Iodine (Carlo Erba, Germany)

3.1.2 แป้ง

แป้งข้าวเหนียว (บริษัท ซอเฮงจำกัด ประเทศไทย)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus รุ่น BX 60, Japan)
2. ชุดเลนส์โพลาไรซ์มาตรฐาน (Olympus รุ่น BX 60, Japan)
3. เครื่องลดขนาด Oscillating granulator (KSL รุ่น 380 V3PH, ประเทศไทย)
4. ตู้อบ (Binder รุ่น ED 240/E2 , Germany)
5. เครื่องเขย่าชุดแรง (Retsch รุ่น AS 200, Germany)
6. ชุดแรงขนาด 20, 30, 40 mesh (Retsch รุ่น AS 200 , Germany)
7. ชุดต้อนน้ำหนัก (CHAOS ขนาด 5, 10, 20, 30, 50, 100 และ 200 กรัม)
8. Hot plate และ magnetic stirrer (Heldolph รุ่น MR – 2002, Germany)
9. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Model Jeol JSM-5910, Japan)
10. กล้องถ่ายภาพดิจิทัล (SONY รุ่น DSC – S750, China)
11. เครื่องชั่งวิเคราะห์ (Sartorius, Model 1702, Germany)

3.3. วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมแกรนูลจากแป้งที่ผ่านประเมินความเหมาะสมสำหรับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์

เตรียมสารยึดเกาะ (binder) ในปริมาณความเข้มข้น 10% W/W โดยชั่ง polyvinyl pyrrolidone (PVP K-90) 10 กรัม โปรยในน้ำกลั่นประมาณ 70 กรัม วางบน hot plate ที่อุณหภูมิ 50 °C และคนตลอดเวลาโดยใช้ magnetic stirrer จนได้เป็นสารละลายใส ปล่อยให้สารละลายเย็นตัวลงและปรับด้วยน้ำกลั่นให้ได้น้ำหนัก 100 กรัม นำสารละลาย 10% PVP ที่เตรียมได้ค่อย ๆ เทลงผสมในแป้งข้าวเหนียว 100 กรัมในโถรงขนาดใหญ่ ใช้ลูกโถรงบผสมจนได้ก้อนเปียก (wet mass) ที่เปียกพอเหมาะและสามารถยึดเกาะกันเป็นก้อนได้ดี นำ wet mass ที่ได้ไปผ่านร่อนเบอร์ 16 แล้วนำแกรนูลเปียกที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแกรนูลแห้งที่ได้ไปลดขนาดด้วยการผ่านร่อนเบอร์ 20 โดยใช้เครื่อง oscillating granulator นำแกรนูลที่ได้ไปคัดขนาดอีกครั้งโดยคัดเอาเฉพาะแกรนูลที่ค้างอยู่บนร่อนขนาด 20 mesh เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป สุ่มตัวอย่างแกรนูลที่ได้ส่วนหนึ่งเพื่อนำไปประเมินคุณภาพและลักษณะของแกรนูล ส่วนแกรนูลที่เหลือทั้งหมดเก็บไว้เพื่อนำไปเคลือบในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 ประเมินคุณภาพและลักษณะของแกรนูล

3.3.2.1 ลักษณะภายนอกของแกรนูล

ตรวจลักษณะโดยทั่วไปของแกรนูลที่เตรียมได้ทั้งก่อนและหลังการลดขนาดด้วยเครื่อง Oscillating granulator รวมทั้งที่ผ่านการคัดขนาดด้วยร่อนเบอร์ 20

3.3.2.2 ลักษณะของแกรนูลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นำแกรนูลที่คัดขนาดด้วยร่อนเบอร์ 20 ไปบดให้เป็นผงละเอียด และนำไปส่องดูลักษณะของเม็ดแป้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

3.3.2.3 ความแข็งของแกรนูล

นำแกรนูลที่ผ่านการคัดขนาดด้วยร่อนเบอร์ 20 มาวัดความแข็งโดยใช้ตุ้มน้ำหนักที่มีขนาด 2, 10, 20, 50, 100 และ 200 กรัม โดยเริ่มต้นจากการใช้ตุ้มน้ำหนัก 2 กรัมวางบนแกรนูล หากแกรนูลไม่แตกให้เปลี่ยนตุ้มน้ำหนักที่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นวางทับบนแกรนูลเดิมอีกครั้ง กระทำเช่นนี้จนกว่าเม็ดแกรนูลจะแตกแล้วบันทึกค่าตุ้มน้ำหนักที่มีผลทำให้แกรนูลแตกออกเป็นค่าความแข็งของแกรนูลเม็ดนั้น การทดลองครั้งนี้จะวัดความแข็งของแกรนูลจำนวน 50 เม็ด เพื่อนำไปหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแข็งของแกรนูล

3.3.2.4 ความกร่อนของแกรนูล

สุมตัวอย่างแกรนูล 50 เม็ด แล้วบันทึกน้ำหนักเริ่มต้นไว้ นำแกรนูลทั้งหมดเข้าไปในเครื่องวัดความกร่อน (Friabilator) แล้วตั้งเครื่องให้หมุนรวม 240 รอบ เมื่อครบแล้วให้นำเม็ดแกรนูลทั้งหมดออกมาไปผ่านร่อนขนาด 20 mesh อีกครั้ง แล้วจึงนำแกรนูลทั้งหมดไปชั่งหาน้ำหนักแกรนูลที่เหลือ บันทึกน้ำหนักสุดท้ายไว้ เพื่อดำเนินการหาความกร่อนของแกรนูลหลังจากทดสอบ โดยเทียบค่าจากสูตรคำนวณหาความกร่อนของแกรนูลดังนี้

$$\text{ความกร่อนของแกรนูล} = \frac{(\text{น้ำหนักแกรนูลเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักแกรนูลสุดท้าย})}{\text{น้ำหนักแกรนูลเริ่มต้น}} \times 100$$

แกรนูลจะผ่านการประเมินเมื่อมีความกร่อนไม่เกิน 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยอิงจากค่าการทดสอบของเม็ดยา (BP 1993)

3.3.3 การเคลือบแกรนูลแป้ง

3.3.3.1 การเคลือบโดยวิธี ionotropic gelation technique

วิธีการเคลือบแกรนูลแป้งด้วยพอลิเมอร์ในการทดสอบครั้งนี้ใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Sriamornsak และ Nunthanid (1998) โดยใช้พอลิเมอร์ชนิด low ester LC-710 ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 5, 6, 7, 8 และ 9% (w/w) โดยใช้วิธีการปั่นด้วยความเร็วสูงจนพอลิเมอร์ละลายและเปลี่ยนเป็นเจล หลังจากนั้นชั่งแกรนูลแป้งในปริมาณ 0.5 กรัม ใส่ลงไปในสารละลายพอลิเมอร์ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 5 – 9 % ดังกล่าว นำสารละลายพอลิเมอร์ที่มีแป้งผสมอยู่และมีความหนืดที่แตกต่างกันซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของพอลิเมอร์ใส่ในกระบอกฉีดยาและฉีดน้ำยาเข้าไปในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิห้อง ปั่นสารละลายตลอดเวลาทำการหยดสารละลายลงไปในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์นานเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นให้แยกแกรนูลที่เคลือบได้ออกจากสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปทดสอบดังต่อไปนี้

1. การศึกษาลักษณะทางกายภาพของแกรนูลที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์

ตรวจลักษณะทางกายภาพภายนอกของแกรนูลที่เคลือบด้วยกลีเซอรีน 10% บันทึกน้ำหนักแกรนูลทั้งน้ำหนักเปียกและน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นนำแกรนูลที่เคลือบได้ไปศึกษา

ลักษณะผิวอนุภาคภายนอกและขนาดรูปร่างตลอดจนลักษณะภาคตัดขวางด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2. การทดสอบการรั่วออกของแบ้ง

นำแกรนูลแบ้งที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์ที่ได้จากการเคลือบด้วยสารละลายของพอลิเมอร์ในความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 5–9% (w/w) ไปทดสอบความทนต่อน้ำย่อยเสมือนของระบบทางเดินอาหาร โดยใช้วิธีการทดลองของ Mura และคณะ (2003) และในส่วนของวิธีการการปล่อยออกมาของแบ้งใช้วิธีการทดสอบที่ดัดแปรมาจากวิธีการของ Das และ Ng (2010)

ในการทดลองครั้งนี้จะทำการทดลอง 3 ซ้ำและนำค่าที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยรายละเอียดของการทดลองความทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะกรด-เบสของน้ำยาที่มีสภาพเสมือนระบบทางเดินอาหารเป็นดังนี้คือ นำตัวอย่างแกรนูลแห้งจำนวน 100 แกรนูล ใส่ลงในขวดแก้วที่มีฝาปิดแน่นและมี 0.1 N. HCl pH 1.2 จำนวน 30 ml ที่มีสภาพเหมือนน้ำย่อยที่กระเพาะอาหารบรรจุอยู่ โดยแช่อยู่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ $37 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ทำการเขย่าตลอดเวลาด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที เมื่อครบ 2 ชั่วโมงให้นำแกรนูลเคลือบที่ทดสอบออกและใส่ลงในจานแก้ว และแยกคัดเลือกเอาเฉพาะแกรนูลที่ยังอยู่ในสภาพสมบูรณ์โดยดูว่ายังมีแบ้งอยู่ภายในโดยตรวจสอบด้วยตาเปล่าและมีการทดสอบการรั่วออกของแบ้งและการถูกทำลายพื้นผิวของสารเคลือบโดยการนำแกรนูลที่เคลือบด้วยพอลิเมอร์ไปแช่ในน้ำกลั่น ถ้ามีการทำลายจนถึงผิวแกรนูลที่ถูกเคลือบไว้แล้วจะสังเกตเห็นว่ามีผงแบ้งรั่วออกมาจากรูพื้นผิวบริเวณนั้นจะถือเสมือนว่าพอลิเมอร์ที่เคลือบไว้ถูกทำลายแล้ว ก็จะทำการคัดแยกแกรนูลเคลือบพอลิเมอร์เม็ดนั้นออกไป สำหรับสารละลายในสภาวะกรดหลังจากผ่านการทดสอบ 2 ชั่วโมง ให้แยกเศษเจลเล็ก ๆ ของพอลิเมอร์ที่หลุดออกทิ้งไป นำสารละลายส่วนที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนแบ้งที่รั่วออกมา เทสารละลายใสส่วนบนทิ้ง และถ้าพบว่ายังมีเจลของพอลิเมอร์ลอยตัวคลุมอยู่ด้านบนเหนือตะกอนแบ้งให้ใช้ปิเปตขนาด 20 μL ดูดเจลพอลิเมอร์ทิ้ง แล้วล้างตะกอนแบ้งด้วยน้ำกลั่น 5 ml อีก 2 ครั้งและแยกตะกอนออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกัน เพื่อให้แน่ใจว่าได้ตะกอนแบ้งที่ไม่มีการปนเปื้อน นำตะกอนแบ้งที่ล้างจนสะอาดแล้วผสมน้ำกลั่น 1 ml แล้วเขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer จากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนลงไปและดูปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของแบ้งและอีกส่วนหนึ่งนำไปส่องดูโครงสร้างและการกระจายตัวของเม็ดแบ้งภายในด้วยกล้องจุลทรรศน์

นำแกรนูลแบ้งที่ทนต่อสภาวะกรดไปทำการทดสอบต่อไปใน phosphate buffer solution (PBS, pH 6.8) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาพเหมือนที่ลำไส้เล็ก และนำแกรนูลแบ้งที่ผ่านการทดสอบในสภาวะนี้ไปทำการทดสอบต่อไปในสารละลายที่เสมือนน้ำย่อยที่ลำไส้ใหญ่ โดย

ใช้ PBS, pH 7.4 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ขั้นตอนในการตรวจวัดการรั่วออกของแกรนูลแบ่งจาก เพคตินใช้วิธีการเช่นเดียวกับการทดสอบเมื่ออยู่ในสภาวะกรด

3. การศึกษาลักษณะทางกายภาพของแกรนูลแบ่งที่เคลือบด้วยเพคตินที่ผ่าน การทดสอบ

คัดเลือกตัวอย่างแกรนูลเคลือบที่ผ่านการทดสอบในสภาวะกรด 0.1 N. HCl pH 1.2 และ PBS, pH 6.8 ไปศึกษาลักษณะพื้นผิวภายนอก (external surface) และแบบภาคตัดขวาง (cross section) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM)