

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

1. Propranolol hydrochloride BP 2005 (Batch No. M080311, P.C. DRUG CENTER CO.,LTD., Bangkok, Thailand)
2. Microcrystalline cellulose (Avicel[®] PH 102, Lot No. P206817309, FMC biopolymer, c/o Lehmann & Voss, Hamburg, Germany)
3. Spray dried lactose monohydrate (Flowlac[®] 100, Lot No. L0722 A4952, Deutschland, Germany)
4. Croscarmellose sodium (Ac-Di-Sol[®] SD-711, Lot No. T603C, FMC biopolymer, c/o Lehmann & Voss, Hamburg, Germany)
5. Colloidal silicon dioxide (Aerosil[®] 200, control No. 0060448, Degussa-Hüls AG, Belgium)
6. Magnesium stearate (Lot No. MW01M0301, Peter Greven, Nederland)
7. Dibutyl sebacate NF (DBS, Batch No. 0000046844, Morflex , North Carolina, USA)
8. Ethylcellulose (Ethocel[®] 10 cps, Batch No. UK23013T01, Colorcon, Singapore)
9. Ethylcellulose dispersion (Aquacoat[®] ECD, Lot No. JN07818745, FMC biopolymer, made in USA)
10. Povidone K90 (Kollidon[®] 90F, Lot No. 73-0594, BASF, Germany)
11. Hydrochloric acid fuming 37% (Batch No. 06110058 และ 06070221, LAB-SCAN, Thailand)
12. Sodium hydroxide (Lot No. 07030268, LAB-SCAN, Thailand)
13. Potassium dihydrogen phosphate (Lot No. A672173 617, Merck, Darmstadt, Germany)
14. แอลกอฮอล์ 95% (องค์การสุรา, กรมสรรพสามิต, จังหวัดฉะเชิงเทรา, ประเทศไทย)

เครื่องมือ

1. Analytical balance (Model 300A, No. 84695, Precisa, witzerland)
2. Magnetic stirrer (Model RCT-B, KIKA, Germany)
3. Hot air oven (Model 500, Code No. 14/38-4110-21-14, Memmert GmbH + Co. KG D-91126 Schwabach FRG, Germany)
4. Hand-blender (Moulinex[®], France)
5. pH meter (Consort C830, S?N 85328, Belgium)
6. Dissolution test apparatus (Model VK-7000, Vankel, U.S.A.)
7. Disintegration apparatus (Erweka ZT3, DKSH (Thailand) Limited Technology, Thailand)
8. UV Visible Spectrophotometer (Varian, Switzerland)
9. Thickness Tester, Micrometer Caliper (Model 7301, Mitutoyo, Japan)
10. Stroke-Monsanto Hardness Tester (Vankel, USA)
11. Friabilator (Erweka Abrasion Tester) (Model 45-2200, Vankel, USA)
12. Environmental Shaker-Incubator ES-20 (S/N 400512004, BIOSAN, GIBTHAI CO., LTD., Thailand)
13. เครื่องตอกยาเม็ด (Serial no. 0022, Semco, บริษัท เขียวเสง, ประเทศไทย)
14. เครื่องเคลือบยาเม็ด (Perforated pan coater) (Model NR-COTA 18, N.R. Industries Co.,Ltd., Thailand)
15. Feed pump (Serial No. 5100039, Watson-Marlow limited, England)
16. เครื่องบดผง (Certificated No. QSC-5454, Puma Industrial Co.,Ltd., Taiwan)
17. Magnetic stirrer (Ika, Janke kankel GmbH & CO GK, Germany)
18. Laboratory test sieve (Mesh No. 20 (SER. NO. 473911) and 60 (SER. NO. 185449), Haan, Germany)

วิธีการทดลอง

การเตรียมยาเม็ดพัลสะไทล์

ระบบนำส่งยาประกอบด้วยยาเม็ดแกน ซึ่งมีตัวยาสำคัญอยู่ภายใน และเคลือบด้วยชั้นเคลือบ 2 ชั้น คือ ชั้นเคลือบพอลิเมอร์พองตัวได้ (swellable layer) และชั้นเคลือบพอลิเมอร์แตกได้ (rupturable layer) ตามลำดับ แล้วทำการศึกษาถึงคุณสมบัติต่างๆ ของยาเม็ดพัลสะไทล์

1. การเตรียมยาเม็ดแกน propranolol HCl

ยาเม็ดแกนของตำรับ propranolol HCl จะเตรียมโดยวิธี direct compression โดยให้มีน้ำหนักประมาณ 425 mg และมีความแข็งประมาณ 8-10 kg ใช้ lactose monohydrate และ microcrystalline cellulose เป็นสารเพิ่มปริมาณ ใช้ magnesium stearate และ Aerosil® 200 เป็นสารช่วยลื่น และในการตอกยาเม็ดใช้เครื่องตอกแบบสากเดี่ยวชนิด convex shape ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 9.53 mm (ขนาด 3/8 นิ้ว) โดยเตรียมประมาณ 2 kg

1.1 นำผงยา propranolol HCl และ Aerosil® 200 ผ่านแร้งเบอร์ 60

1.2 ชั่งส่วนผสมต่างๆ ตามสูตรตำรับ

1.3 นำส่วนผสมของสูตรตำรับมาผสมกันแบบ geometric dilution ในถุงพลาสติก ในแต่ละครั้งของการเติมส่วนผสม ให้เขย่า 100 ครั้ง เพื่อให้ส่วนผสมเข้ากัน

1.4 นำผงยาเม็ดแกนไปตอกด้วยเครื่องตอกแบบสากเดี่ยว โดยกำหนดให้มีน้ำหนักเม็ดยาประมาณ 425 mg และมีความแข็งประมาณ 8-10 kg จะได้เม็ดยาทั้งหมดน้ำหนักรวมประมาณ 2 kg

1.5 ในระหว่างที่ทำการตอกเม็ดยา สุ่มตัวอย่างเม็ดยาที่ตอกได้มาชั่งน้ำหนักและวัดความแข็งเป็นระยะ เพื่อปรับน้ำหนักและความแข็งของเม็ดยาให้ได้ตามที่ต้องการ

1.6 เก็บยาเม็ดแกนในซองบรรจุ ปิดปากของให้สนิท และเก็บไว้ในชุดเก็บสารเพื่อกันความชื้น (dessicator) จนกว่าจะนำออกไปเคลือบด้วยชั้นเคลือบพอลิเมอร์

สูตรตำรับของยาเม็ดแกน propranolol HCl (direct compression)

	ปริมาณ/เม็ด (mg)	working formula (g)
Propranolol HCl	40	188.24
Avicel® PH102	192.5	905.88
Flowlac® 100	192.5	905.88
Magnesium stearate	0.5%	10
Aerosil® 200	0.5%	10
total	425	2000

2. การเคลือบชั้นเคลือบพอลิเมอร์

เครื่องมือที่ใช้เคลือบคือ perforated pan coater (NR-COTA 18®) โดยทำการเคลือบชั้นเคลือบพอลิเมอร์ทั้งหมด 2 ชั้น คือ ชั้นพอลิเมอร์พองตัวได้ (swellable layer) โดยในชั้นนี้จะประกอบไปด้วย croscarmellose sodium (Ac-Di-Sol®) ซึ่งเป็น superdisintegrant ทำหน้าที่เป็น swelling agent และ povidone K90 (Kollidon® 90F) ทำหน้าที่เป็น binder โดยเตรียมที่อัตราส่วน Ac-Di-Sol®: Kollidon® 90F เป็น 6:1 w/w และเตรียมให้ได้ปริมาณ solid content เท่ากับ 17.8% w/w โดยใช้ 95% ethanol เป็นตัวทำละลาย คำนวณปริมาณสารเคลือบให้ได้ระดับการเคลือบ 22.5 mg/cm²

สูตรน้ำยาเคลือบพอลิเมอร์ชั้น swellable layer

		Working formula (g)
croscarmellose sodium (Ac-Di-Sol®)	15.25 % w/w	192.27
povidone K90 (Kollidon® 90F)	2.55 % w/w	32.99
95% ethanol (0.790 Kg/L)	qs. to 100 % w/w	1063.34

สูตรคำนวณหาพื้นที่ผิวของยาเม็ดแกน

$$\text{surface area} = \pi [d \cdot h + (d^2)/2]$$

โดย d = เส้นผ่านศูนย์กลางของยาเม็ด (cm)

h = ความหนาของยาเม็ด (cm)

สภาวะที่ใช้เคลือบชั้น swellable layer

- สูตรน้ำยาที่ใช้มี solid content เท่ากับ 17.8% w/w
- Preheat (40°C) 30 min (pan speed 2 rpm)
- Batch size 1.5 kg
- Pan speed 15 rpm
- Inlet temperature 38 – 39 °C
- Outlet temperature 33 – 34 °C
- Nozzle diameter 1 mm
- Atomizing air pressure 2.5 bar
- Spray rate 15 g/min

นำน้ำยาเคลือบมาทำการเคลือบโดยต้องคนน้ำยาเคลือบตลอดการเคลือบ หลังจากเคลือบเสร็จแล้วลด pan speed ลงเหลือ 2 rpm และให้ความร้อนเพื่อให้เม็ดยาแห้งต่อไปที่ 40 °C ประมาณ 30 นาที นำเม็ดยาที่ได้มาผึ่งทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำไปเก็บไว้ใน desiccator เพื่อเตรียมนำไปประเมินต่อไป

เมื่อทำการเคลือบพอลิเมอร์ชั้น swellable layer เรียบร้อยแล้ว ในขั้นต่อไปคือการเคลือบชั้น rupturable layer ด้วย ethylcellulose (EC) หรือ ethyllulose dispersion (ECD) และใช้ dibutyl sebacate (DBS) เป็น plasticizer โดยทำการเคลือบด้วย EC หรือ ECD และใช้ DBS 5% w/w สำหรับ EC หรือ DBS 5-20% w/w สำหรับ ECD ให้ได้ 6-12 mg/cm²

สูตรน้ำยาเคลือบฟิล์มชั้น rupturable layer; ethylcellulose solution

		Working formula (g)
Ethylcellulose	3.5% w/w	119
DBS	5% w/w based on polymer weight	5.95
95% ethanol	qs.to 100 % w/w	3281
Total		3405.95

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 วันที่ 10 มิ.ย. 2555
 เลขทะเบียน 248346
 เลขเรียกหนังสือ



สภาวะที่ใช้เคลือบชั้น rupturable layer; ethylcellulose

- สูตรน้ำยาที่ใช้มี solid content เท่ากับ 3.5% w/w
- Preheat (40°C) 30 min (pan speed 2 rpm)
- Batch size 1.0 kg
- Pan speed 15 rpm
- Inlet temperature 38 – 39 °C
- Outlet temperature 33 – 34 °C
- Nozzle diameter 1 mm
- Atomizing air pressure 2.5 bar
- Spray rate 10 g/min

นำน้ำยาเคลือบมาทำการเคลือบ โดยต้องคนน้ำยาเคลือบต่อไปตลอดการเคลือบ หลังจากเคลือบเสร็จแล้วลด pan speed ลงเหลือ 2 rpm และให้ความร้อนเพื่อทำให้เม็ดยาแห้งต่อไปที่ 40 °C ประมาณ 30 นาที นำเม็ดยาที่ได้มาผึ่งทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำไปเก็บไว้ใน desiccator เพื่อเตรียมนำไปประเมินต่อไป

สูตรน้ำยาเคลือบฟิล์มชั้น rupturable layer; ethylcellulose dispersion (ECD)

		Working formula (g)
ECD (27% w/w)	50.0 % w/w	500
DBS	5% w/w based on polymer weight	6.75
DI water	qs.to 100 % w/w	500
Total		1006.75

		Working formula (g)
ECD (27% w/w)	50.0 % w/w	500
DBS	10% w/w based on polymer weight	13.5
DI water	qs.to 100 % w/w	500
Total		1013.5

Working formula (g)

ECD (27% w/w)	50.0 % w/w	330
DBS	20% w/w based on polymer weight	17.82
DI water	qs.to 100 % w/w	330
Total		677.82

สภาวะที่ใช้เคลือบชั้น rupturable layer; ethylcellulose dispersion

สูตรน้ำยาที่ใช้มี solid content เท่ากับ 13.5% w/w

- Preheat (40°C) 30 min (pan speed 2 rpm)
- Batch size 1.0 kg
- Pan speed 15 rpm
- Inlet temperature 75 – 76 °C
- Outlet temperature 57 – 58 °C
- Nozzle diameter 1 mm
- Atomizing air pressure 2.5 bar
- Spray rate 10 g/min

นำน้ำยาเคลือบมาทำการเคลือบ โดยต้องคนน้ำยาเคลือบต่อไปตลอดการเคลือบ หลังจากเคลือบเสร็จแล้วลด pan speed ลงเหลือ 2 rpm และให้ความร้อนเพื่อทำให้เม็ดยาแห้งต่อไปที่ 40°C ประมาณ 30 นาที นำเม็ดยาที่ได้ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 76 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บไว้ใน desiccator เพื่อเตรียมนำไปประเมินต่อไป

3. ประเมินคุณสมบัติทั่วไปของยาเม็ดแกน และยาเม็ดที่เคลือบชั้นพองตัวแล้ว

3.1 ความแปรปรวนของน้ำหนัก

สุ่มตัวอย่างยาเม็ดมาตำรับละ 20 เม็ด ชั่งน้ำหนักแล้วหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักของเม็ดยา และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักเม็ดยา

3.2 ความหนา

สุ่มตัวอย่างยาเม็ดมาตำรับละ 10 เม็ด วัดความหนาเม็ดยาด้วยเครื่องวัดความหนา (thickness tester) แล้วหาค่าเฉลี่ย และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความหนาเม็ดยา

3.3 ความแข็ง

สุ่มตัวอย่างยาเม็ดมาตำรับละ 10 เม็ด วัดความแข็งเม็ดยาด้วยเครื่องวัดความแข็ง (strokes hardness tester) แล้วหาค่าเฉลี่ย และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของความแข็งเม็ดยา

3.4 ความกร่อน

สุ่มตัวอย่างยาเม็ดมาตำรับละไม่น้อยกว่า 6.5 g ทำการวัดความกร่อนเม็ดยาด้วยเครื่อง Erweka abrasion tester ด้วยอัตราเร็ว 25 rpm เป็นเวลา 4 นาที หาน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปแล้วคำนวณหาค่าร้อยละของความกร่อน (% friability)

3.5 การแตกกระจายตัว

สุ่มตัวอย่างยาเม็ดมา 6 เม็ด ทำการทดสอบการแตกกระจายตัวในตัวกลาง 0.1N HCl ด้วยเครื่อง disintegration apparatus สังเกตดูการแตกกระจายตัวของยาเม็ดทุกเม็ดว่าแตกกระจายตัวหมดโดยไม่มีส่วนใดๆ ของยาเหลืออยู่บนตะแกรงภายในเวลาที่นานเท่าไร หาค่าเฉลี่ยและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของระยะเวลาที่ยาแตกกระจายตัวหมด

3.6 การปลดปล่อยตัวยา

สุ่มตัวอย่างยามา 6 เม็ด ทำการทดสอบการละลายด้วยเครื่อง dissolution test ตามข้อกำหนด USP XX25 Apparatus II (paddle) (0.1 N HCl หรือ pH 6.8 phosphate buffer USP 900 ml, 37 °C, 50 rpm, n=6) ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 5, 10, 15, 30, 60, 90 และ 120 นาที โดยดูดตัวอย่างปริมาณ 5 มล. ผ่านหัวกรองใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 289 nm แล้วคำนวณหา % drug released

4. การประเมินยาเม็ดพัลสะไทด์

4.1 การเตรียม standard curve ของยา propranolol HCl ใน 0.1 N HCl solution (pH 1.2) และ pH 6.8 phosphate buffer USP

4.1.1 ชั่งผงยา propranolol HCl จำนวน 250 mg ใส่ใน volumetric flask ขนาด 500 ml ละลายและปรับปริมาตรให้ครบด้วย 0.1 N HCl solution (pH 1.2) หรือ pH 6.8 phosphate buffer USP ผสมให้เข้ากัน สารละลาย propranolol HCl ที่ได้ (stock solution) มีความเข้มข้น 500 mcg/ml

4.1.2 ปิเปิดสารละลายในข้อ 4.1.1 มาจำนวน 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 8 ml แล้วเจือจางด้วยสารละลาย 0.1 N HCl solution (pH 1.2) หรือ pH 6.8 phosphate buffer USP จนครบ 50 ml จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 80 mcg/ml

4.1.3 นำสารละลายที่ได้ในข้อ 4.1.2 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 289.00 nm โดยใช้ 0.1 N HCl solution (pH 1.2) หรือ pH 6.8 phosphate buffer USP เป็น blank และใช้ cuvette ขนาด 1 cm

4.1.4 นำผลที่ได้มาสร้าง standard curve ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของยา propranolol HCl (mcg/ml) สามารถคำนวณหาปริมาณยา propranolol HCl ที่ถูกปลดปล่อยได้จาก standard curve

4.2 Lag time ของยาเม็ดพัลสะไทด์ (rupture test)

ทดสอบหา lag time ของยาเม็ดพัลสะไทด์ ได้แก่ ระยะเวลาตั้งแต่เมื่อยาสัมผัสกับตัวกลางจนกระทั่งเมื่อยาแตกออก โดยทำการทดสอบใน USP XX25 paddle dissolution apparatus (0.1 N HCl 900 ml, 37 °C, 50 rpm, n = 3-6)

4.3 การปลดปล่อยตัวยา

ชั่งน้ำหนักเมื่อยาที่เตรียมได้จากแต่ละตำรับ ทำการศึกษาตำรับละ 6 เม็ด นำมาวัดอัตราการปลดปล่อยตัวยาโดยใช้เครื่อง dissolution test ตามข้อกำหนด USP XX25 Apparatus II (paddle) โดยใช้ 0.1 N HCl และ/หรือ pH 6.8 phosphate buffer USP 900 ml เป็น dissolution medium ที่อุณหภูมิ 37 ± 0.5 °C อัตราเร็วของ paddle เท่ากับ 50 rpm ทำการเก็บตัวอย่างปริมาณ 5 ml ในช่วงเวลาตามกำหนดจนกระทั่งเมื่อยาแตก แล้วเก็บตัวอย่างต่อไปอีก 2 ชั่วโมง การเก็บตัวอย่างทำโดยการดูดตัวอย่างผ่านหัวกรอง แล้วนำตัวอย่างทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วคำนวณหา % drug released

4.4 ศึกษาการดูดน้ำ (water uptake) ของยาเม็ดพัลสะไทล์

ทำการศึกษา water uptake โดยการวัดปริมาณน้ำที่เม็ดยาดูดเข้าไปตามเวลาที่เหมาะสม โดยการชั่งน้ำหนักเม็ดยาทุกๆ 30 นาที (สำหรับตำรับที่ lag time สั้น จะทำการชั่งน้ำหนักทุก 5-15 นาที) จนกระทั่งเม็ดยาแตก ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 37 °C โดยมีขั้นตอนดังนี้

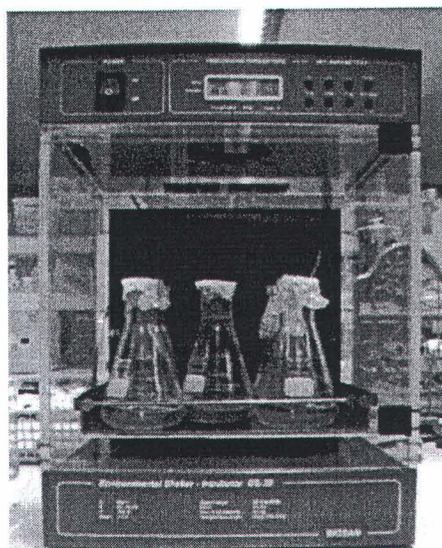
4.4.1 นำตัวกลาง 0.1 N HCl ปริมาตร 100 ml ใส่ใน Erlenmeyer flask แล้วนำไป warm ในเครื่อง Environmental Shaker-Incubator เป็นเวลา 30 นาที

4.4.2 ชั่งตัวอย่างเม็ดยาครั้งละ 1 เม็ด จำนวนตำรับละ 3 เม็ด บันทึกน้ำหนักเริ่มต้น (W_0) แล้วนำไปใส่ลงใน Erlenmeyer flask ในข้อ 4.4.1 แล้วทำการ shaker

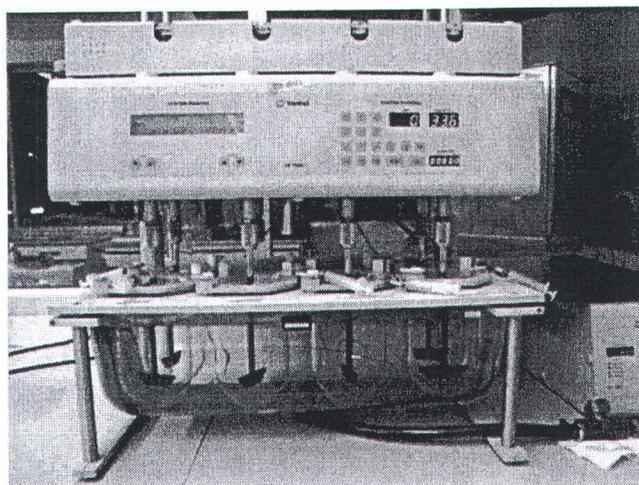
4.4.3 นำเม็ดยาออกมาชั่งทุกๆ 30 นาที โดยทำการชั่งตัวกลางที่เกาะเม็ดยาก่อน แล้วนำไปชั่ง บันทึกน้ำหนัก (W_1)

4.4.4 นำข้อมูลที่ได้ไปคิดเป็น % water uptake ตามสูตร (4)

$$\% \text{ water uptake} = [(W_1 - W_0)/W_0] \times 100$$



รูปที่ 2-1 แสดงเครื่อง Environmental Shaker-Incubator ที่ใช้ศึกษา water uptake



รูปที่ 2-2 แสดงเครื่อง USP XX25 dissolution apparatus II (paddle)

5. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของยาเม็ดพัลสະไทล์

ศึกษาและหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ กับคุณสมบัติของยาเม็ดพัลสະไทล์ ได้แก่ lag time และการปลดปล่อยยา ตัวแปรที่ศึกษา เช่น

- ชนิดชั้นเคลือบแตกได้ (EC ในรูปพอลิเมอร์ซึ่งกระจายแบบคอลลอยด์ในน้ำ กับ EC ในรูปสารละลายในตัวทำละลายอินทรีย์)
- ปริมาณ plasticizer ที่ใช้ในชั้นเคลือบแตกได้
- ปริมาณของชั้นเคลือบแตกได้
- ชนิดของตัวกลางที่ทดสอบ

6. การวิเคราะห์โดยใช้สถิติ

ใช้ Student T-test และ/หรือ One-way ANOVA ในการเปรียบเทียบ lag time ของยาเม็ดพัลสະไทล์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %