

T
W4
WS 64/0
8556

18 ก.ค. 2546

4670190



สำนักหอสมุด
สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ

บทที่ 3

การทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. Impeller mixer (เครื่องผสม)
2. เครื่องลาก TLC plate อัตโนมัติ [CAT No. 022.1602 SER No. 00507]
3. Hot air oven (ตู้อบ) [Memmert, Backthal, thailand]
4. Impermeable backing [3M Thailand co. Ltd.]
5. Peel strip [3M Thailand co. Ltd.]
6. แผ่นกระจก (ขนาด 15 x 15 x 0.5 เซนติเมตร)
7. test tube screw cap (หลอดทดลองแบบมีฝาปิดเกลียว)
8. กรรไกร มีดผ่าตัด ปากคีบสำหรับเลาะผิวหนังหนู
9. แท่นไขสำหรับตรึงหนังหนู
10. Centrifuge evaporator (Code No. 33/39-4209-3-2 U&V Holding Co. Ltd.)
11. Syringe filter (Pore size 0.45 ไมครอน Filter size 13 มิลลิเมตร)
[Lot No. 206110004052 Titan scientific Co. Ltd.]
12. High performance liquid chromatography (HPLC)[Thermo separation product
CM3200, Sitronic Co.,USA]
13. Scotch Tape [Lot No. 07378-6, 3M Thailand Co. Ltd.]
14. Lamp (โคมไฟ 100 w 220 V 50 H₂)

สารเคมี

1. Diclofenac diethylammonium [Commercial grade, Lot No. DDA-204012, gift from
Siam Pharmaceutical Co.]
2. Capsaicin [analytical reagent (AR) grade, Lot No. 117H5853, Sigma chemical Co.]
3. Eudragit[®] E 100 [Pharma grade, Lot No. 8300101009]
4. Dibutyl sebacate [AR grade, Lot No. 052K1525, Sigma chemical Co.]
5. Succinic acid [AR grade, Analysis No. 331727/1 694 Fluka chemical Co.]
6. Acetone [AR grade, Lot No. 01061009, Lab scan Asia Co. Ltd.]
7. Isopropyl alcohol [AR grade, Lot No. Hoa118, Asia pacific Specialty chemical Co.]
8. Ethanol [Distillation from commercial grade, โรงงานสุรา องค์การสุรา กรมสรรพสามิต]
9. Acetonitrile [HPLC grade, Lot No. 01020099, Lab scan Asia Co. Ltd.]
10. Methanol [HPLC grade, Lot No. 02070193, Lab scan Asia Co. Ltd.]
11. ครีมขจัดขน thioglycolic acid 4 % w/w (Opilca[®]) [Lot No. F319011/01 63014/1]
12. ortho – Phosphoric acid (KH₂PO₄) [Lot No. 1.00573 E Merck Co.]
13. Pentobarbital sodium (ยาสลบ)

วิธีการดำเนินการทดลอง

การดำเนินการทดลองแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ใหญ่ๆดังนี้

1. การเตรียมตำรับแผ่นแปะผิวหนัง Diclofenac และแผ่นแปะผิวหนัง Diclofenac ร่วมกับ capsaicin
2. ทำการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซึมตัวยา Diclofenac ผ่านเข้าสู่ผิวหนังหนูลทดลอง (in vivo)
3. วิเคราะห์หาปริมาณการซึมผ่านด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)



การเตรียมตำรับแผ่นแปะผิวหนัง Diclofenac

ตารางที่ 3-1 สูตรตำรับแผ่นแปะผิวหนัง Diclofenac และ Diclofenac ร่วมกับ capsaicin

ส่วนประกอบในตำรับ	ปริมาณสาร(กรัม)		หน้าที่ในตำรับ
	ตำรับควบคุม	ตำรับ ทดสอบ	
Diclofenac diethylammonium	6.67	6.67	Active ingredient
Capsaicin	-	0.148	Active ingredient
Eudragit [®] E100	42.20	42.20	Adhesive Polymer
Dibutyl sebacate	19.00	19.00	Plasticizer
Succinic acid	3.80	3.80	Crosslinking agent
Acetone	21.00	21.00	Solvent
Isopropyl alcohol	2.30	2.30	Solvent
Ethyl alcohol	11.70	11.70	Solvent

วิธีการเตรียม

1. ผสม acetone, isopropyl alcohol และ ethanol เข้าด้วยกัน
2. ละลายตัวยา (diclofenac หรือ diclofenac กับ capsaicin) ลงในสารละลายข้อ 1
3. ค่อยๆใส่ Eudragit[®] E100 ลงในสารละลายข้อ 2 คนตลอดเวลาจนละลายหมด
4. เติม Dibutyl sebacate ลงในสารละลายข้อ 3 ผสมจนเข้ากัน
5. เติม succinic acid ลงไปในสารละลายข้อ 4 คนอย่างแรง
6. เทสารลงบนแผ่นที่จะทำการติดผิวหนัง (backing) กำหนดให้มีความหนา 0.5 มิลลิเมตร โดยใช้เครื่องลาก TLC plate
7. นำแผ่นที่ได้ในข้อ 6 ไปอบที่ อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 10 นาทีโดยมีการไหลเวียนของอากาศ 1500 m²/h และมีการถ่ายเทอากาศ 80 m²/h
8. นำแผ่นที่ได้ในข้อ 7 มาปิดทับด้วย แถบลอกออก (Peel strip)

การทดสอบประสิทธิภาพการดูดซึมตัวยา Diclofenac ผ่านเข้าสู่ผิวหนังหนูลดลง (in vivo)

เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนังของตำรับแผ่นแปะผิวหนังที่มี diclofenac อย่างเดียว กับ ตำรับแผ่นแปะที่มีสารผสมระหว่าง diclofenac ร่วมกับ capsaicin ทำการทดสอบในหนูขาวเล็ก เพศผู้ (ICR mouse) อายุ 4 – 6 สัปดาห์ โดยวัดปริมาณของ diclofenac ที่ซึมผ่านเข้าไปที่เวลาต่างๆ (30 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมง, 3 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง) และแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุม) แผ่นแปะไดโคลฟีแนค (diclofenac patch) บริเวณหลังด้านหัวและด้านหางของหนู โดยแบ่งหนูเป็น 5 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1.1 แผ่นแปะ 0.5 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 1.2 แผ่นแปะ 1 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 1.3 แผ่นแปะ 2 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 1.4 แผ่นแปะ 3 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 1.5 แผ่นแปะ 4 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2 (กลุ่มทดสอบ) แผ่นแปะไดโคลฟีแนคร่วมกับแคปไซซิน (diclofenac-capsaicin patch) บริเวณหลังด้านหัวและด้านหางของหนู โดยแบ่งหนูเป็น 5 กลุ่ม

กลุ่มที่ 2.1 แผ่นแปะ 0.5 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2.2 แผ่นแปะ 1 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2.3 แผ่นแปะ 2 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2.4 แผ่นแปะ 3 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2.5 แผ่นแปะ 4 ชั่วโมง

วิธีการดังนี้

1. นำหนูจากห้องเลี้ยงมาไว้ที่ห้องปฏิบัติการ ควบคุมอุณหภูมิห้องให้เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
2. ฉีด pentobarbital sodium ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร เข้าทางช่องท้องของหนูขาว เพื่อให้หนูสลบ
3. เมื่อหนูสลบใช้ปัตเตอร์เรียนตัดขนหนูออก ระวังไม่ให้เกิดบาดแผลหรือรอยถลอกบนผิวหนังหนู
4. ทาครีมจัดขนที่มีส่วนผสมของกรดไทโอไกลโคลิค 4 % w/w ทาทิ้งไว้ประมาณ 10 – 15 นาที เช็ดครีมออกโดยเช็ดขนออกให้หมดจนผิวเนียน ทำความสะอาดตัวหนู นำเข้าไปเก็บในห้องเลี้ยง ทิ้งไว้ 2 วัน
5. เมื่อครบ 2 วัน นำหนูมาฉีดยาสลบ (pentobarbital sodium) ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร รอจนหนูสลบ
6. แผ่นแปะขนาด 2.54 ตารางเซนติเมตรลงบนหลังหนู 2 ตำแหน่ง(ด้านหัวและด้านหาง)
7. เมื่อครบเวลา 30 นาที 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ก็ทำการ sacrifice หนู และตัดเลาะหนังบริเวณที่ทำการทดลองออก
8. นำหนังหนูที่ได้มาซึ่งบนแผ่นให้ตรึงเพื่อลอกชั้น stratum corneum ออก ทำการลอกด้วย scottape จนได้ผิวหนังที่มีลักษณะมัน(จากการมองโดยใช้ไมโครไฟ) ซึ่งแสดงว่าชั้น stratum corneum ได้หลุดออกไปหมดแล้ว
9. ทำการย่อยขนาดหนังหนูที่ได้ให้มีขนาดเล็ก จากนั้นนำไปใส่ใน test tube screw cap
10. ใส่ Methanol ลงไปใน test tube screw cap จำนวน 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

11. เมื่อครบเวลาดูด Methanol ออกมาใส่ test tube
12. ทำการสกัดน้มน้ำด้วย methanol อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 1 ml แต่แต่ละครั้งทำการ sonicate เป็นเวลา 5 นาที
13. ดูด Methanol ที่ได้มารวมกัน
14. นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 13. มาระเหยแห้งโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
15. ใส่ Isocratic solvent (18.7 mM KH_2PO_4 ในน้ำ ต่อ Acetonitrile อัตราส่วน 1:1 (v/v)) ปริมาณ 1 ml ลงใน test tube ที่ได้จากข้อ 14. จากนั้นทำการเขย่า และนำไปปั่นด้วยความเร็ว 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายที่ได้ออกมา
16. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 15. มากรองผ่าน Syringe filter (0.45 ไมครอน) แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ diclofenac ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) แล้ววัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร



การวิเคราะห์หาปริมาณ diclofenac diethanolamine ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography

ระบบวิเคราะห์ของ HPLC เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Diclofenac diethanolamine

- ใช้ Isocratic solvent system(Mobile Phase) โดยใช้ 18.7 mM KH_2PO_4 ในน้ำ และ Acetonitrile (1:1)(v/v)
- อัตราการไหล (Flow rate) 1.00 มิลลิลิตร/นาที
- Detection ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
- Column Econosphere C18, 25 เซนติเมตร , 4.6 มิลลิลิตร, 5 ไมโครลิตร
- Injection 100 ไมโครลิตร

วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- 1) ชั่งไดโคลฟีแนค 100 มิลลิกรัม ใส่ volumetric flask 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล (มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
- 2) ปิเปตสารละลายในข้อ 1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย solvent (มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใช้เป็น stock solution
- 3) ปิเปต stock solution จำนวน 3 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย solvent จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 4) ปิเปต stock solution จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย solvent จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 5) ปิเปต stock solution จำนวน 0.7 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย solvent จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 6) ปิเปต stock solution จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย solvent จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 7) ปิเปต stock solution จำนวน 0.3 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย solvent จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 8) ปิเปต stock solution จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย solvent จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 9) ปิเปตสารละลายข้อ 5 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย solvent จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- 10) ปิเปต สารละลายข้อ 6 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย solvent จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีทำ Calibration curve

1. นำสารละลายมาตรฐานไดโคลฟีแนคความเข้มข้นต่าง ๆ กันที่เตรียมขึ้น ไปวิเคราะห์ด้วย HPLC
2. นำผลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กับ peak area