

บทที่ 3

วิธีการที่ใช้ในการศึกษา

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- Acrylamide (Acrylamid, Lot.No.3309777, Merck, Germany)
- แป้งมันสำปะหลัง (purity 21T, Tapioca starch, NF, Lot GAB 3031, Mdf 13/7/01)
- Sodium starch glycolate (Explotab[®], Roquette freres, France.)
- Hydrochlrothiazide (Batch No. ICF 0813, CHANGZHOU BENCHI Phamaceutical Co.LTD, CHINA)
- Ammonium cerium (IV) nitrate (Lot. K319376 943, Merck, Germany.)
- Hydroquinone (Lot. K25930033 926, Schuchardt, Germany.)
- Dibasic calcium phosphate dihydrate (Emcompress[®], FMC, Lot A15A Mfd 01/00, USA.)
- Hydrochloric acid (Lot. K23946617 719, Mfd 04/02, MERCK, Germany.)
- Magnesium stearate (Lot .No. MAF 07, MAY 98, Italy.)

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- ชุดบั่นแยกตะกอน (Beckman IC-MC, U.S.A.)
- เครื่องระเหยแห้ง (spray dry, NiRo type Hi-tec, Denmark.)
- เครื่องวัดความชื้น (Sartorius MA 30, Santorioms Germany.)
- ตู้อบ (EHRET, Dipl-Ing.W. EHRET GmbH.)
- เครื่องตอกยาเม็ดแบบสากเดี่ยวพร้อมติดตั้งเครื่องมือวัดแรงตอก (Korsch EKO with PMA3)
- เครื่องผสม (Erweka AR 400E, Erweka, Germany.)
- Ultraviolet-Visible Spectrophotometry (CARY Gray 1E, Varian[®])
- Ultraviolet-Visible Spectrophotometry (Perkin Elmer Lamda 20, Perkin Ltd.)
- Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (Spectro2000, Perkin Elmer, Germany.)
- Scanning Electron Microscope (Leo 430 VP, Leo Electron Microscopy Ltd, England.)
- เครื่องวัดคุณสมบัติทางกายภาพของยาเม็ด (Erweka TBH30, Erweka, Germany.)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa 300A, BECTHAI Ltd., Thailand.)
- เครื่องวัดการแตกตัวของยาเม็ด (Erweka ZT3-1, Erweka, Germany.)

- เครื่องวัดความถี่ของเม็ดยา (Vankel model 45-2300, USA.)
- เครื่อง dissolution test apparatus (Vankel VK700, USA.)
- กระดาษวัด pH (Panpeha , Riedel-deHaen)

วิธีการทดลอง

1. วิธีการเตรียมแป้งอะคริลาไมด์ (Acrylamide grafted starch)

1. นำแป้งมันสำปะหลัง 188.20 กรัม มาผสมกับน้ำกลั่นครั้งที่ 1 ปริมาตร 500 มล. ในขวด
2. ต้มของผสมในข้อที่ 1 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส พร้อมทั้ง stirred ไปด้วยเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น
3. เติม acrylamide 2.91 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นครั้งที่ 2 ปริมาตร 375 มล. ลงไป
4. นำไปผ่านก๊าซอาร์กอน 90 นาที เมื่อครบเวลาแล้วเติม ceric ion solution ลงไป 0.041 มล. ปิดฝาให้สนิท แล้วเขย่าเป็นเวลา 1 นาที
5. นำไปใส่ในเครื่องเขย่าที่กำหนดอุณหภูมิไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วให้เติม saturated hydroquinone solution ลงไป 0.5 มล.
6. นำไปล้างด้วยน้ำโดยวิธี centrifugation 3 ครั้ง
7. นำมาทำให้แห้งโดยวิธี spray dried (ถ้าแป้งที่ได้มีลักษณะชันเหนียวให้ปั่นใน blender ก่อน) โดยใช้ความเร็วลม 3.0 bar, inlet temperature 250 °C, Feed rate of sample อยู่ในช่วง 7.0-15.0 ml/min
8. นำไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำมาผ่านร่ง เบอร์ 80
9. ชั่งน้ำหนักที่ได้ บันทึกผล แล้ว นำมาคำนวณหา % yield
10. นำไปหาความชื้นโดยใช้เครื่อง วัดความชื้นแล้วบันทึกผล

2. การทดสอบคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของแป้งอะคริลาไมด์เปรียบเทียบกับ explotab[®] และแป้งมันสำปะหลัง

2.1 พิสูจน์เอกลักษณ์สารโดยวิธี infrared spectrophotometry

เครื่องมือ : Infrared spectrophotometer

วิธีการทดสอบ

เปรียบเทียบ IR spectrum (KBr pellet method) ของแป้งอะคริลาไมด์และแป้งมันสำปะหลัง

2.2 พิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วย Nuclear magnetic resonance spectrometry

เครื่องมือ : Proton nuclear magnetic resonance spectrometer

วิธีการทดสอบ

เปรียบเทียบ H-NMR spectrum ของแป้งอะคริลาไมด์ สารอะคริลาไมด์ และแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้ตัวทำละลาย dimethylsulfoxide(DMSO)

2.3 วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสารด้วย Differential scanning calorimetry

เครื่องมือ : Differential scanning calorimetry

วิธีการทดสอบ

นำแป้งอะคริลาไมด์มาชั่งด้วยเครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง ประมาณ 2-3 มิลลิกรัม ใส่ลงในภาดอลูมิเนียม แล้วนำไปทดสอบโดยใช้เครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC) ในช่วงอุณหภูมิ 25-300 °C โดยใช้ความเร็ว 10 °C/นาที

2.4 ลักษณะพื้นผิวของสารช่วยแตกตัวด้วย Scanning Electron Microscope

เครื่องมือ : Scanning Electron Microscope

วิธีการทดสอบ

นำแป้งอะคริลาไมด์, explotab[®] และแป้งมันสำปะหลังไปส่องกล้อง Scanning Electron Microscope ที่กำลังขยาย 500 เท่าเพื่อเปรียบเทียบลักษณะพื้นผิวของสารช่วยแตกตัว สังเกตความแตกต่าง

2.5 ความสามารถในการพองตัวด้วยวิธี Bulk swelling capacity

เครื่องมือ : กระบอกตวง 100 มิลลิลิตร

วิธีการทดสอบ

ชั่งแป้งอะคริลาไมด์, explotab[®] และแป้งมันสำปะหลังอย่างละ 2 กรัม แล้วค่อย ๆ เทสารที่ชั่งแล้วใส่ในกระบอกตวง 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเคาะโดยยกกระบอกตวงขึ้นเหนือพื้นราบที่แข็งสูง 1 นิ้ว แล้วปล่อยให้ลง เคาะจนกว่าปริมาตรคงที่และมีผิวหน้าเรียบหลังจากนั้นอ่านค่าเริ่มต้น บันทึกผล แล้วค่อย ๆ เทน้ำลงไปให้ครบ 100 มิลลิลิตร ปิดปากกระบอกตวงไว้ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาอ่านค่าการพองตัว บันทึกผล แล้วนำมาคำนวณ

$$\text{Bulk swelling capacity} = \text{ปริมาตรสุดท้าย} / \text{ปริมาตรเริ่มต้น}$$

โดยจะทำการทดสอบอย่างละ 3 ครั้ง จากนั้นนำมาหาค่าเฉลี่ย และค่าความเบี่ยงเบน

2.6 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกระดาษวัด pH

เครื่องมือ : กระดาษวัด pH(Panpeha[®], Riedel-deHaen)

วิธีการทดสอบ

นำสารละลายของแป้งอะคริลาไมด์, explotab[®] และแป้งมันสำปะหลัง 2% w/v มาวัดความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกระดาษวัด pH แล้วบันทึกผล ดูความแตกต่าง

3 การทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นสารช่วยแตกตัว

3.1 การตอกโดยวิธีตอกโดยตรง (Tableting by direct compression) มีขั้นตอนดังนี้
ตารางที่ 3-1 แสดงสูตรตำรับของยาเม็ด Hydrochlorothiazide ที่ใช้ตอก

สาร	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4
Hydrochlorothiazide	25 mg.	25 mg.	25 mg.	25 mg.
สารช่วยแตกตัว 4%	แป้งมันสำปะหลัง 14 mg.	Explotab [®] 14 mg.	Acrylamide grafted starch 1:50 14 mg.	-
Emcompress [®]	307.5 mg.	307.5 mg.	307.5 mg.	307.5 mg.
Magnesium stearate 1%	3.5 mg.	3.5 mg.	3.5 mg.	3.5 mg.

1. ชั่งน้ำหนักของสารดังในตาราง
2. นำ Hydrochlorothiazide, emcompress[®] และสารช่วยแตกตัวผสมเข้าด้วยกันโดยใช้เครื่องผสม Erweka AR 400E ชนิด cubic mixer ในอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
3. เติม Magnesium stearate ใส่ลงในเครื่องผสม และผสมเป็นเวลา 5 นาที
4. นำไปตอกด้วยเครื่องตอกยาเม็ดแบบสากลเดียว ตอกที่แรงตอก 8, 10, 12 และ 14 kN โดยกำหนดน้ำหนัก 350 มิลลิกรัมต่อเม็ด
5. แต่ละแรงตอกจะตอกประมาณ 60 เม็ด เพื่อนำไปทดสอบตามขั้นตอนของการทดสอบคุณสมบัติของยาเม็ด เพื่อเปรียบเทียบกันต่อไป

3.2 การทดสอบความหนาของเม็ดยา (thickness) และความแข็งของเม็ดยา (hardness)

เครื่องมือ : เครื่องวัดคุณสมบัติทางกายภาพของยาเม็ด Erweka TbH30D

วิธีการทดสอบ

จะสุ่มเม็ดยาที่ได้จากแรงตอกทุกแรงตอกมาอย่างละ 10 เม็ด หลังจากนั้นนำมาวัดความหนาและความแข็งของเม็ดโดยใช้เครื่องวัดคุณสมบัติทางกายภาพของยาเม็ด หาค่าเฉลี่ย และร้อยละของการเบี่ยงเบน

3.3 การทดสอบความแปรปรวนของน้ำหนัก (weight variation)

เครื่องมือ : เครื่องชั่งอย่างละเอียด (analytical balance)

วิธีการทดสอบ

1. สุ่มยาเม็ดมา 20 เม็ด
2. บัดฝุ่นที่อาจติดมากับเม็ด ซึ่งยาเม็ดอย่างละเอียดที่ละเม็ด และหาค่าน้ำหนักเฉลี่ย
3. หาคความเบี่ยงเบนของน้ำหนักยาเม็ดแต่ละเม็ด โดยเทียบจากน้ำหนักเฉลี่ยที่กำหนดได้ และคิดเป็นร้อยละ ขอบเขตการเบี่ยงเบนของยาเม็ด

น้ำหนักยาเม็ดโดยเฉลี่ยตาม USP XX	% ความเบี่ยงเบน
130 หรือน้อยกว่า	10
130-324	7.5
>324	5

3.4 การทดสอบความกร่อน (friability)

เครื่องมือ : เครื่องวัดความกร่อน Erweka Abrasion Tester

วิธีการทดสอบ

1. ชั่งยาเม็ดอย่างละเอียด โดยปิดฝุ่นผงออกให้หมดก่อนเป็น W_0
2. นำไปใส่เครื่องและปิดฝา
3. เปิดเครื่องให้ยาหมุนด้วยความเร็ว 25 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 นาที
4. เอายาเม็ดออกจากเครื่อง ปิดฝุ่นที่ติดยาเม็ดออกให้หมด และชั่งน้ำหนักอีกครั้งเป็น W
5. คำนวณหาความกร่อน

$$\% \text{ ความกร่อน} = 100 * (1 - W/W_0)$$

3.5 การทดสอบความสามารถในการแตกตัวของยาเม็ด

เครื่องมือ : เครื่องวัดการแตกตัว Erweka ZT3-1

วิธีการทดสอบ

สุ่มตัวอย่างยาเม็ดที่เตรียมไว้ในแต่ละ lot โดยสุ่ม lot ละ 6 เม็ด นำมาวัดเวลาที่ใช้แตกกระจายตัวโดยใช้เครื่อง disintegration apparatus สังเกตดูการแตกกระจายตัวของแต่ละเม็ดว่าแตกตัวหมดภายในเวลาเท่าไร หาค่าเฉลี่ย และร้อยละของการเบี่ยงเบน

3.6 การทดสอบการละลายของตัวยาสำคัญในยาเม็ด

เครื่องมือ : เครื่อง dissolution test apparatus I

วิธีการทดสอบ

สุ่มตัวอย่างยาเม็ดที่เตรียมไว้ในแต่ละ lot โดยสุ่ม lot ละ 6 เม็ด นำมาวัดอัตราการละลายโดยใช้เครื่อง dissolution test apparatus I โดยทำการทดลองตามข้อกำหนดใน USP XXIII โดยมี HCl 0.1 N เป็น dissolution medium ที่ 37.5 องศาเซลเซียส อัตราเร็วของ basket เท่ากับ 100 rpm ทำการสุ่มตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณ HCTZ ที่ละลายออกมาที่เวลาต่าง ๆ ดังนี้ คือ 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60 นาที โดยเครื่อง UV-spectroscopy แล้วคำนวณหาร้อยละการละลายของตัวยาสำคัญโดยเทียบจาก standard curve ของ HCTZ หาค่าเฉลี่ย และร้อยละของการเบี่ยงเบน

4. ศึกษาความคงตัวตามมาตรฐานของ ICH

4.1 ศึกษาความคงตัวในรูปผงแห้ง

นำผงแป้งอะคริลาไมด์ที่เตรียมได้และ Explotab[®] ไปศึกษาความคงตัวตามมาตรฐานของ ICH โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องความชื้น 60% RH และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 75% RH แล้วจึงสุ่มตัวอย่างขึ้นมาวิเคราะห์ที่เวลา 0, 1, 3 เดือน และ 6 เดือน ดังนี้

- 4.1.1 ที่เวลาเริ่มต้น (0 เดือน) ศึกษาคุณสมบัติตามวิธีในข้อ 2.1-3.6
- 4.1.2 ที่เวลา 1 เดือนศึกษาคุณสมบัติตามวิธีในข้อ 2.3-2.6
- 4.1.3 ที่เวลา 3 เดือนศึกษาคุณสมบัติตามวิธีในข้อ 2.3-2.6
- 4.1.4 ที่เวลา 6 เดือนศึกษาคุณสมบัติตามวิธีในข้อ 2.3-3.6

4.2 ศึกษาความคงตัวของเม็ดอยู่ในรูปยาเม็ด

โดยนำสารช่วยแตกตัวที่เตรียมได้จากการตกโดยตรงที่ความเข้มข้น 4% w/w ในยาเม็ด hydrochlorothiazide 350 mg นำไปเก็บไว้ใน chamber ที่อุณหภูมิห้อง ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ $60 \pm 5\%$ และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ 75%

4.2.1 สังเกตคุณสมบัติทางกายภาพของเม็ดยาที่เวลา 0, 1, 2 และ 3 เดือน

4.2.2 เก็บตัวอย่างเม็ดยาที่เวลา 0, 1, 2 และ 3 เดือนไปประเมินประสิทธิภาพโดยวิธีการหา disintegration time, Friability test, hardness, thickness, weight variation และ dissolution test ตามวิธีในข้อ 3.2-3.6

5. วิเคราะห์ข้อมูล

โดยการเปรียบเทียบค่า disintegration time, dissolution time, weight variation, hardness และค่า friability ของยาเม็ดที่ใช้ Acrylamide grafted starch เป็น disintegrant กับ tapioca starch พร้อมทั้งสูตรที่เป็นตัวควบคุมคือเมื่อไม่ใส่สารใดๆ เป็น disintegrant ด้วย

