บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

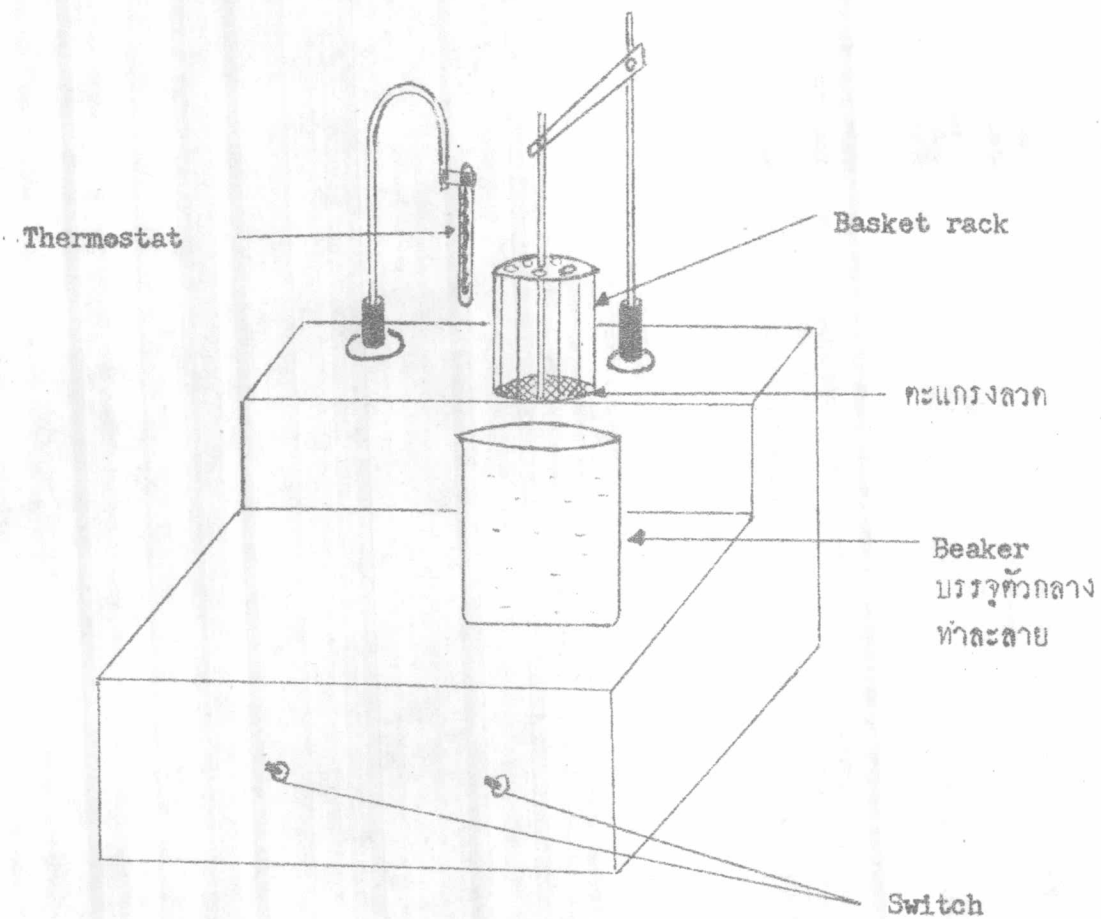
ยาเม็ดที่จะนำมาทำการทดลอง (Test products) ยาเม็ดที่จะนำมาทำการทดลอง เป็นยาเม็ดแอสไพริน ซึ่งประกอบด้วยตัวยาแอสไพรินเพียงตัวเดียว(Plain Aspirin Tablets) มีทั้งหมด 6 บริษัทด้วยกัน ซึ่งสมมุติให้เป็นยาของบริษัท ก, ข, ค, ง, จ และ ฉ

การวิเคราะห์หาปริมาณยาในยาเม็ดแอสไพริน นำยาเม็ดแอสไพรินของแต่ละบริษัทมาตรวจหาปริมาณยา ตามวิธีใน BP.1968(53)

ในการวิเคราะห์ นำยามาชั่ง 20 เม็ด บดและชั่งผงยาให้มีปริมาณยา 0.5 กรัมของแอสไพริน โดยประมาณ เติม 0.5 N Sodium hydroxide Solution 30 มล.ต้มไฟอ่อน ๆ ประมาณ 10 นาทีและ titrate หาปริมาณ Sodium hydroxide ที่มากเกินไปด้วย 0.5 N hydrochloric acid โดยใช้ phenol red solution เป็น indicator และทำ blank โดยวิธีการเดียวกัน แต่ไม่ใช่ผงยา ปริมาณความแตกต่างของด่างที่ใช้ คือ ปริมาณของ Sodium hydroxide 0.5 N ที่ทำปฏิกริยากับแอสไพริน

1 มล. ของ 0.5 N Sodium hydroxide จะสมมูลย์กับ 0.04504 กรัมของแอสไพริน

การศึกษาการกระจายตัว (Disintegration Studies) การศึกษาเปรียบเทียบการกระจายตัวของยาเม็ดแอสไพริน ทำตามวิธีของ USP XIX(7) โดยใช้เครื่องมือที่ผลิตขึ้นในประเทศไทย ดังในรูปที่ 5 ซึ่งมีมาตรฐานตามกำหนดใน USP (ดังได้กล่าวมาแล้ว) และหาค่าเฉลี่ยของเวลาในการกระจายตัวของยาเม็ดแอสไพรินจำนวน 6 เม็ด ของยาแต่ละบริษัทในน้ำ และใน 0.1 N hydrochloric acid ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37° ซ โดยจับเวลาที่ยากระจายตัวผ่านตะแกรง



รูปที่ 5. เครื่องมือสำหรับหาการกระจายตัวของ USP

(Disintegration Apparatus)

ได้หมดทั้ง 6 เม็ด ซึ่งยาแต่ละเม็ดจะถูกใส่ลงในแต่ละช่อง จำนวน 6 ช่องด้วยกัน

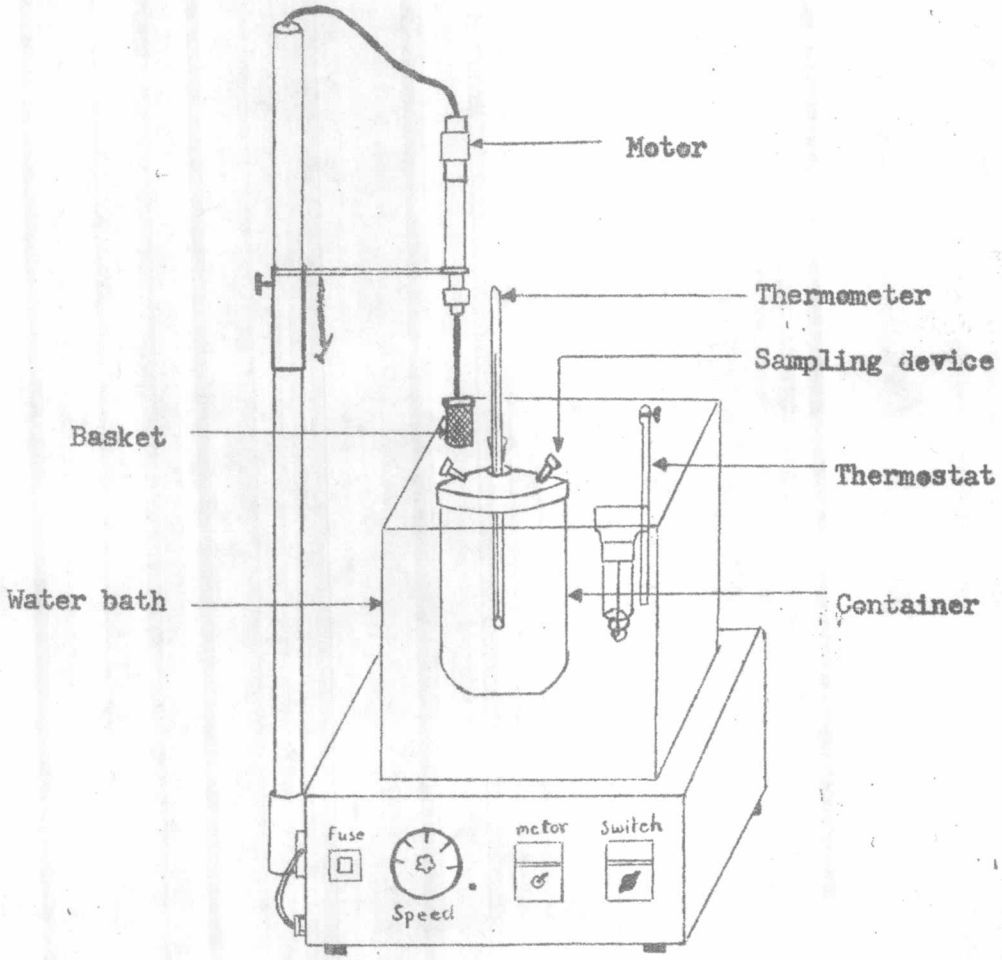
<u>การศึกษาการละลาย</u> (Dissolution Studies) ในการศึกษาการละลายของยาเม็ด เราจำเป็นต้องหาโค้งมาตรฐาน (Standard Curve) ของ Salicylic acid ก่อนเพื่อหาปริมาณการละลายของแอสไพรินในแต่ละช่วง

<u>การหาโค้งมาตรฐาน</u> (Standard Curve) ของ Salicylic acid ชั่งยา Salicylic acid จำนวน 250 มิลลิกรัม ใส่ใน Volumetric flack ขนาด 250 มล. เติม 0.1 N hydrochloric acid ให้ครบปริมาตร เขย่าให้ละลาย นำมาทำให้เจือจางด้วย 0.1N hydrochloric acid ให้มีความเข้มข้นขนาด 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 มก./มล. นำมา 1 มล. เติม N.NaOH 1 มล. เติมน้ำ 5 มล. และทำให้เป็นกรด pH1 ด้วย hydrochloric acid ชนิดเข้มข้นและหา absorbance ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้ cell ขนาด 1 ซม. และวัดด้วย Spectrophotometer ที่ 302.5 nm. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า absorbance และความเข้มข้น

<u>การศึกษาเปรียบเทียบการละลายของยาเม็ดแอสไพริน</u> การทดลองหาการละลายของยาเม็ดแอสไพรินของแต่ละบริษัท ทำตามวิธีของ USP XIX[7] โดยใช้เครื่องมือของบริษัท Erweka (Dissolution Apparatus) ดังแสดงในรูปที่ 6 เครื่องมือประกอบด้วย flask มีก้นมนเล็กน้อย ข้างบนมีฝาปิดซึ่งมีท่อแก้วยื่นขึ้นมา 3 ท่อ สำหรับใส่ thermometer ช่องหนึ่ง เก็บตัวอย่างช่องหนึ่ง และเติมตัวกลางทำละลายอีกช่องหนึ่ง ส่วนตรงกลางฝาจะมีช่องกลม ๆ สำหรับใส่ basket ซึ่งต่อกับ motor สำหรับควบคุมความเร็ว basket มีลักษณะเป็นตะแกรงลวดใน flask บรรจุด้วยตัวกลางทำละลายคือ 0.1N hydrochloric acid จำนวน 400 มล. ซึ่งต้องอุ่นให้ร้อนก่อนที่ 37°ซ โดย flask จะจุ่มอยู่ใน water - bath ที่บรรจุน้ำและมีตัวควบคุมอุณหภูมิ (Thermostat) นำยาเม็ดแอสไพรินมาใส่ใน basket และให้จุ่มลงไปในตัวกลางทำละลาย เปิดมอเตอร์ให้หมุนด้วยความเร็ว 50 รอบ/นาที[8] เก็บตัวอย่างครั้งละ 1 มล. เป็นช่วงเวลาตามที่ต้องการ (ช่วงละ 5 นาที) โดยใช้ pipette ต่อกับท่อยางและสำลี

I15911765

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย



รูปที่ 6. เครื่องมือสำหรับหาการละลายของ Erweka

(Dissolution Apparatus)

สำหรับกรอง หลังจากเก็บตัวอย่างแล้วเติม 0.1 N hydrochloric acid ลงไปแทน 1 มล. ทำการทดลองซ้ำ 6 ครั้งของยาแต่ละบริษัท

<u>การวิเคราะห์ตัวอย่างยาจากการหาการละลาย</u> จากตัวอย่าง 1 มล. นำมาเติม 1N Sodium hydroxide 1 มล. โดยตัวอย่างบรรจุอยู่ในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิดแน่น (Screw-cup test tube) นำไป hydrolyze ที่ 100° ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้ว ทำให้เจือจางด้วยน้ำ 5 มล. และทำให้เป็นกรด pH1 ด้วย hydrochloric acid ชนิดเข้มข้น นำไปวัดด้วย Spectrophotometer ที่ 302.5 nm. เพื่อตรวจหาปริมาณ Salicylic acid blank ทำด้วยวิธีเดียวกัน แต่ใช้น้ำ 1 มล. แทนตัวอย่าง จากโค้งมาตรฐานจะได้ค่า Salicylic acid นำมาเทียบหาค่าแอสไพรินที่ละลายตามช่วงเวลาต่าง ๆ โดยคิดเป็นเปอร์เซนต์ สะสมของแอสไพรินที่ละลายจากปริมาณยาที่มีจริงในยาเม็ด แล้วนำไปเขียนกราฟระหว่างเวลากับเปอร์เซนต์สะสมของแอสไพรินที่ละลาย

<u>การทดลองหาความแข็ง</u> ใช้ Hardness tester วัดความแข็งเป็นกิโลกรัม หาค่าเฉลี่ย 6 เม็ด ของยาแต่ละบริษัท

<u>การศึกษาชีวอนุเคราะห์สัมพันธ์</u> (Studies of Relative Bioavailability) การศึกษาเปรียบเทียบชีวอนุเคราะห์สัมพันธ์ ทำโดยทดลองกับอาสาสมัคร จำนวน 50 คน อายุระหว่าง 18–28 ปี เป็นชาย 25 คน, หญิง 25 คน ซึ่งผู้ถูกทดลองเหล่านี้ต้องมีสุขภาพแข็งแรงและต้องลองรับประทานยาก่อน เพื่อตรวจดูว่า ไม่มีการแพ้ยา นอกจากนี้ผู้ถูกทดลองจะต้องไม่รับประทานยาชนิดอื่นมาก่อนอย่างน้อย 1 อาทิตย์[55]

<u>วิธีการทดลอง</u> ผู้ถูกทดลองทั้งหมด จะต้องรับประทานยาของทั้ง 6 บริษัท โดยรับประทานยาของแต่ละบริษัท เว้นช่วง 1 อาทิตย์ หรืออาทิตย์ละ 1 ครั้ง ครั้งละ 300 มิลลิกรัม ซึ่งผู้ถูกทดลองจะต้องเก็บปัสสาวะหลังจากตื่นนอน เพื่อใช้เป็น blank ของตัวอย่างปัสสาวะเป็นการควบคุมปริมาณ Salicylate ในปัสสาวะไม่ให้เกินกำหนด แล้วรับประทานอาหารตามที่กำหนด

(Standard breakfast meal) เหมือนกันทุกคน หลังจากรับประทานอาหารเช้า 1/2 ชั่วโมง ผู้ถูกทดลองจะต้องรับประทานยา 300 มิลลิกรัม พร้อมกับน้ำ 1 แก้ว ใน 2 ชั่วโมงแรก หลังจากรับประทานยา ผู้ถูกทดลองจะรับประทานอะไรไม่ได้ นอกจากน้ำเปล่าเท่านั้น และเก็บปัสสาวะเป็นช่วงเวลาหลังจากรับประทานยา 1/2, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมงใส่ในขวดปิดสนิท เก็บในตู้เย็น จนกว่าจะนำมาตรวจหาจำนวน Salicylate ทั้งหมดที่มีอยู่ในปัสสาวะตามวิธีของ Trinder[56] ในระหว่างเก็บปัสสาวะผู้ถูกทดลองต้องรับประทานน้ำบ่อย ๆ เพื่อให้มีจำนวนปัสสาวะมากเพียงพอ

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณ Salicylate ในปัสสาวะ</u> reagent ที่ต้องใช้มีดังนี้.-

1. Colour reagent ละลาย mercuric chloride 40 กรัม ในน้ำ 850 มล. โดยใช้ความร้อนช่วย ทำให้เย็น เติม N – HCl 120 มล. และ ferric nitrate $\left[Fe(NO_3)_3.9H_2O\right]$ 40 กรัม เมื่อ ferric nitrate ละลาย เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร จะได้สารละลายที่คงตัว ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

2. Stock Salicylate Solution ละลาย Sodium Salicylate 580 มก. ในน้ำ และเติมน้ำให้ครบ 250 มล. จะได้ solution ซึ่งมี Salicylic acid 200 มก./100 มล. เติม Chloroform เป็น preservative 2 – 3 หยด

3. Standard Salicylate Solution นำ Stock Solution มา 20 มล. ทำเป็น 100 มล. ด้วยน้ำ จะได้ solution ซึ่งมี Salicylic acid 40 มก./100 มล. เติม Chloroform เป็น preservative 2 – 3 หยด และเก็บได้อย่างน้อย 6 ชั่วโมง ในตู้เย็น

<u>โค้งมาตรฐานของ Salicylic acid ตามวิธีของ Trinder</u> นำ Standard Solution มาทำให้เจือจางให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มก./มล. นำมา 1 มล. เติม Colour reagent 5 มล. วัด absorbance ที่ 540 nm. ด้วย

Spectrophotometer และเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและค่า absorbance ที่อ่านได้ จะได้กราฟเส้นตรงตาม Beer's law ค่า absorbance ที่วัดควรอยู่ระหว่าง 0.2 – 0.7 ซึ่งเป็นช่วงที่มีความผิดพลาดน้อยที่สุด

<u>การตรวจหาปริมาณ Salicylic acid ในปัสสาวะ</u> นำปัสสาวะมาทำให้เจือจางเพื่อให้มีความเข้มข้นของ Salicylic acid อยู่ระหว่าง 10 – 40 มก./100 มล. แล้วนำมา 1 มล. เติม Colour reagent 5 มล. อ่านค่า absorbance ที่ 540 nm. โดย blank ใช้น้ำ 1 มล. แทนปัสสาวะ

สำหรับ blank ของปัสสาวะ เตรียมโดยการผสม 1 มล. ของปัสสาวะที่ทำให้เจือจางแล้วกับ Colour reagent 5 มล. และphosphoric acid (sp.gr. 1.75) 0.1 มล. อ่านค่า absorbance ที่ 540 nm. โดยใช้น้ำเป็น blank

<u>การคำนวณ</u> ใช้สูตรดังนี้

Salicylic acid ใช้ตัวย่อ SA

SA ในปัสสาวะ มก./100 มล. = (มก. SA/100 มล. ของปัสสาวะที่ทำให้เจือจาง –มก.SA /100 มล.ใน blank ของปัสสาวะที่ทำให้เจือจาง) x dilution factor

dilution factor เช่น 1 มล. ทำให้เจือจางโดยเติมน้ำ 1 มล. ได้ Solution 2 มล.จะมีค่า dilution factor เป็น 2 เป็นต้น

นำค่า Salicylic acid ที่อ่านได้จากกราฟมาเทียบเป็นจำนวนแอสไพริน โดยการคูณด้วย 1.3043 กรัม (1 กรัม Salicylic acid=1.3043 กรัมแอสไพริน) และคูณด้วยปริมาตรของปัสสาวะที่เก็บแต่ละครั้งจะได้จำนวนแอสไพรินทั้งหมดที่ถูกขับถ่ายออกมาในแต่ละช่วงเวลา และจากจำนวนแอสไพรินที่ได้ นำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของแอสไพรินที่ถูกขับถ่ายออกมาในปัสสาวะ

โดยคิดจากจำนวนยาแอสไพรินที่มีจริง ๆ ในยาเม็ด

เมื่อตรวจหาปริมาณยาในปัสสาวะตามช่วงเวลาที่กำหนดแล้ว นำมาคิดหาเปอร์เซนต์สะสมของแอสไพรินที่ถูกขับถ่ายตามช่วงเวลาต่าง ๆ