

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

สารที่ใช้ในการทดลอง

1. ยาเม็ดที่จะนำมาทำการทดลอง (Test Products) เป็นยาเม็ดซัลฟิซอกซาโซลที่ประกอบด้วยตัวยาซัลฟิซอกซาโซลเพียงตัวเดียว ใน 1 เม็ดประกอบด้วยตัวยา 500 มิลลิกรัม ยาเม็ดชนิดนี้มีขายในตลาดประเทศไทยทั้งหมด 5 บริษัท ซึ่งให้ชื่อว่า บริษัท ก. ข. ค. ง. และ จ. ตัวอย่างยาเม็ดแต่ละบริษัท ได้มาโดยการซื้อจากร้านขายยาต่าง ๆ
2. Sulfisoxazole (Working standard)
3. Trichloroacetic acid (BDH Chemical LTD)
4. Sodium nitrite A.R. Grade (Mallinckrodt Chemical Works)
5. Ammonium sulphamate A.R. Grade (BDH Chemical LTD)
6. N-1-Naphthylethylenediamine dihydrochloride (BDH Chemical LTD)
7. Concentrated Hydrochloric acid (Ajax Chemical LTD)
8. Pepsin (BDH Chemical LTD)
9. Sodium chloride A.R. Grade (BDH Chemical LTD)
10. Monobasic potassium phosphate (BDH Chemical LTD)
11. Sodium hydroxide (BDH Chemical LTD)

เครื่องมือที่ใช้

1. Tablet Hardness Tester (U.S. PAT 2,645,936 CANADA PAT. 497956. Strong Cobb Arner Inc., Cleveland 4 OHIO. U.S.A.)
2. Disintegration Tester (Manesty Machines LTD. Liverpool, 24)

3. Dissolution Apparatus (HANSON RESEARCH COEP., NORTHRIDGE, CALIF. U.S.A.)

4. Sauter Analytical Balance

5. Spectrophotometer Pye Unicam Model SP. 1800

1. การหาความแข็งของยาเม็ด

นำยาเม็ดของทั้ง 5 บริษัทไปวัดหาความแข็งเป็นกิโลกรัม โดยใช้ Tablet Hardness Tester ทำการหาบริษัทละ 6 เม็ด

2. การศึกษาการแตกกระจายตัว (Disintegration Studies) (ดูรูปที่ 1)

ศึกษาการกระจายตัวของยาเม็ดซัลฟิซอกซาโซลทั้ง 5 บริษัท ตามวิธีของ U.S.P.XX โดยใช้ Disintegration Tester ทำการทดลองโดยนำยาเม็ด 6 เม็ด ใส่ใน basket rack เปิดเครื่องให้ rack เคลื่อนขึ้นลงในตัวกลาง (medium) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 ± 2 °C. สับเวลาตั้งแต่เริ่มเปิดเครื่อง จนกระทั่งถึงเวลาที่ยากระจายตัวผ่านตะแกรงลวดหมด ทำการทดลองบริษัทละ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยของเวลาในการกระจายตัวของยาเม็ด

ตัวกลางที่ใช้ในการศึกษานี้มี 4 ชนิด คือ

1. น้ำกลั่น มี pH 5.5
2. กรดไฮโดรคลอริก (1 ต่อ 12.5 โดยปริมาตร) มี pH 1.2
3. Simulated Gastric Fluid (NaCl 2 กรัม, Pepsin 3.2 กรัม, HCl 7 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร) มี pH 1.2
4. Simulated Intestinal Fluid (Monobasic potassium phosphate 6.8 กรัม, 0.2N NaOH 190 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร) มี pH 7.5 ± 0.1

3. การศึกษาการละลาย (Dissolution Studies) (ดูรูปที่ 2)

ศึกษาการละลายของยาเม็ดซัลฟิซอกซาโซลทั้ง 5 บริษัท ตามวิธีของ U.S.P.XX โดยใช้เครื่องมือ Dissolution Apparatus ชนิด 6 หลุม เครื่องมือนี้ประกอบด้วย

flask กันกลม ข้างบนมีฝาปิด ซึ่งมี 3 ช่องไว้ใส่เทอร์โมมิเตอร์ เก็บตัวอย่างและเติมตัวกลางทำละลาย (dissolution medium) ตรงกลางฝาปิดมีช่องไว้ใส่แกนเหล็ก ซึ่งส่วนปลายติดกับ basket สำหรับใส่ยาเม็ด ส่วนบนของแกนเหล็กติดกับมอเตอร์ควบคุมความเร็ว ภายใน flask บรรจุตัวกลางทำละลาย จำนวน 900 มิลลิลิตร flask นี้จะแช่อยู่ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้อีกทีหนึ่ง โดยควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

3.1 วิธีการทดลอง

นำยาเม็ดซัลฟิซอกซาโซล 1 เม็ด ใส่ใน basket แล้วจุ่มลงในตัวกลางทำละลายซึ่งบรรจุอยู่ใน flask เปิดเครื่องควบคุมความเร็ว โดยใช้ความเร็ว 100 รอบต่อนาที แล้วเก็บตัวอย่างเมื่อครบเวลา 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 และ 120 นาที นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณของซัลฟิซอกซาโซล ตามวิธีของ Bratton & Marshall(45) เก็บตัวอย่างอีกตัวอย่างหนึ่งเมื่อยาเม็ดที่ทดลองละลายหมดตัว นำไปวิเคราะห์ เมื่อคำนวณหาปริมาณ 100% ของยาแต่ละเม็ดทำการทดลองบริษัทละ 6 เม็ด

ในการทดลองนี้ใช้ตัวกลางทำละลาย 3 ชนิด คือ

1. กรดไฮโดรคลอริก (1 ต่อ 12.5 โดยปริมาตร)
2. Simulated Gastric Fluid
3. Simulated Intestinal Fluid

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณซัลฟิซอกซาโซล

ใช้วิธีวิเคราะห์ของ Bratton และ Marshall คือ

- ก. นำตัวอย่างที่ได้มา เสีวจางด้วยตัวกลางทำละลาย
- ข. นำตัวอย่างจากข้อ ก. มา 1 มิลลิลิตร เติม 2 มิลลิลิตร ของสารละลาย 15% Trichloroacetic acid เขย่าให้เข้ากัน
- ค. เติมสารละลาย 1 ต่อ 1,000 Sodium nitrite 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 3 นาที
- ง. เติมสารละลาย 1 ต่อ 200 Ammonium sulphamate 1 มิลลิลิตร เขย่าไล่ก๊าซไนโตรเจนจนหมด ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที



- จ. เติมน้ำละลาย 1 ต่อ 1,000 N-1-Naphthylethylenediamine dihydrochloride 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะเกิดสารละลายสีม่วงแดง
- ฉ. ปรับปริมาตรด้วยตัวกลางทำละลายจนครบ 10 มิลลิลิตร
- ช. นำสารละลายที่ได้จากข้อ ฉ. ไปวัดด้วย Spectrophotometer ที่ wavelength 550 nm. อ่านค่า Absorbance แล้วเทียบหาปริมาณซัลฟิโซซอล จากเส้นโค้งมาตรฐาน (Standard curve) ที่เตรียมไว้

3.3 การทำเส้นโค้งมาตรฐาน

การสร้างเส้นโค้งมาตรฐานทำได้โดยละลาย sulfisoxazole (working standard) (101.8277%) ในตัวกลางทำละลายให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 22.5, 25, 27.5, 30, 32.5, 35, 40, 45, 50 และ 60 ไมโครกรัม ใน 1.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์โดยวิธี Brattion และ Marshall เขียนกราฟระหว่างค่า absorbance ที่อ่านได้ (ค่าเฉลี่ย 6 ครั้ง) กับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน หาค่าความลาดชัน (slope) จากกราฟซึ่งจะให้หาค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างต่อไปตามสูตร

$$A = abC$$

$$A = \text{Absorbance}$$

$$ab = \text{ค่าคงที่ (slope)}$$

$$C = \text{ความเข้มข้นของยา}$$

4. การศึกษาชีวอนุเคราะห์ของยาเม็ตซัลฟิโซซอล

ทำการศึกษาชีวอนุเคราะห์ของยาเม็ตซัลฟิโซซอลในคนปกติโดยใช้อาสาสมัครเพศชาย 8 คน โดยทุกคนต้องมีคุณสมบัติดังนี้ คือ

- ก. สุขภาพปกติแข็งแรง
- ข. ไม่มีประวัติว่าแพ้ยาประเภทซัลฟา
- ค. ไม่มีโรคเกี่ยวกับไต

อาสาสมัครแต่ละคนมีคุณสมบัติตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของอาสาสมัคร

อาสาสมัคร	อายุ (ปี)	น้ำหนัก (กิโลกรัม)	ความสูง (เซนติเมตร)
1	23	53	156
2	23	55	155
3	24	57	163
4	23	58	165
5	23	54	160
6	23	65	162
7	21	65	170
8	22	61	167

การปฏิบัติตัวของอาสาสมัครตลอดการทดลอง คือ อาสาสมัครต้องไม่ดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ หรือใช้ยาอื่น ๆ

4.1 วิธีการทดลอง

ก่อนวันที่จะรับประทานยา อาสาสมัครต้องงดอาหารและดื่มน้ำมาก ๆ 1 คืน เมื่อตื่นนอน อาสาสมัครเก็บปัสสาวะเพื่อใช้เป็น control เวลา 8.00 น. อาสาสมัครแต่ละคนรับประทานยาเม็ดซิลิฟอสคอปา โคลตามที่กำหนดให้ โดยวิธี cross over design (ดูภาคผนวก ง.) จำนวน 2 เม็ด (1000 มิลลิกรัม) พร้อมกับดื่มน้ำเปล่า 1 แก้ว (120 มิลลิลิตร) เมื่อรับประทานยาได้ 1 ชั่วโมง อาสาสมัครรับประทานอาหารเช้าได้ และทุก 1 ชั่วโมง ภายใน 4 ชั่วโมง หลังจากรับประทานยา อาสาสมัครต้องดื่มน้ำเปล่า 1 แก้ว อาสาสมัครเก็บปัสสาวะในช่วงเวลา 0.5, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากรับประทานยา วัดปริมาตรของปัสสาวะในแต่ละช่วงเวลา แล้วเก็บใส่หลอดทดลองที่ปิดสนิทไว้ประมาณ 10 มิลลิลิตร เก็บหลอดนี้แช่แข็งไว้จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

หาปริมาณยาซัลซิคโซคซาโซล

ในช่วงเวลา 9 ชั่วโมงนั้น อาสาสมัครจะถูกควบคุมอาหารและน้ำทั้ง 3 เวลา คือ เช้า กลางวัน และเย็น อาสาสมัครจะรับประทานยา สัปดาห์วันสัปดาห์ เพื่อให้แน่ใจว่ายา ถูกขับถ่ายออกจากร่างกายหมดก่อนรับประทานยาครั้งต่อไป

ตารางที่ 2 cross over design ของอาสาสมัคร 8 คน

อาสาสมัคร	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5
1	ก	จ	ง	ค	ข
2	ข	ก	จ	ง	ค
3	ค	ข	ก	จ	ง
4	ง	ค	ข	ก	จ
5	จ	ง	ค	ข	ก
6	ก	จ	ง	ค	ข
7	ข	ก	จ	ง	ค
8	ค	ข	ก	จ	ง

4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณซัลซิคโซคซาโซล

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของ Free sulfisoxazole และ Total sulfisoxazole

4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณ Free sulfisoxazole

การวิเคราะห์นี้ใช้วิธีของ Bratton และ Marshall คือ

1. นำปัสสาวะตัวอย่างที่เก็บไว้มาทำให้ละลาย แล้วนำมาเสีจางด้วยน้ำกลั่น นำปัสสาวะที่เสีจางแล้ว 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย 15% Trichloroacetic acid 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2. เติมน้ำละลาย 1 ต่อ 1,000 Sodium nitrite 1 มิลลิ-
เตอร์ เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 3 นาที

3. เติมน้ำละลาย 1 ต่อ 200 Ammonium sulphamate
1 มิลลิเตอร์ เขย่าให้หมดก๊าซไนโตรเจน ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที

4. เติมน้ำละลาย 1 ต่อ 1,000 N-1-Naphthylethylenediamine
dihydrochloride 1 มิลลิเตอร์ เขย่าให้เข้ากัน

5. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิเตอร์ นำไปวัด
spectrophotometer ที่ wavelength 550 nm. แล้วเทียบปริมาณจากเส้นโค้งมาตรฐาน
ที่เตรียมไว้

4.2.2 การวิเคราะห์ Total sulfisoxazole

ทำการทดลองโดยนำปัสสาวะที่เสียจางแล้ว 1 มิลลิเตอร์ ผสมกับ
0.5 มิลลิเตอร์ ของ 4N HCl นำไปต้มในน้ำเดือด 100°C. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้ง
ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปรับปริมาตรให้เท่าเดิม แล้วนำมาทำการทดลองเหมือนการวิเคราะห์หา
ปริมาณ Free sulfisoxazole

5. การคำนวณ

คำนวณเปรียบเทียบความแข็งของยาเม็ด เวลาของการกระจายตัว อัตราเร็วของ
การละลาย และชีวอนุเคราะห์ของยาเม็ดซัลฟิซอกซาโซล ของบริษัทต่าง ๆ กับบริษัท ก.