

ตำรับยาเจลไอโซเตรติโนอิน และคลินดามัยซิน เพื่อใช้รักษาสิว:

การตั้งตำรับและการประเมินความคงสภาพ

วิจิตรา มะลาด¹, เดชพล ปรีชากุล²

บทคัดย่อ

ตำรับยาเจลไอโซเตรติโนอิน และคลินดามัยซิน เพื่อใช้รักษาสิว: การตั้งตำรับและการประเมินความคงสภาพ

วิจิตรา มะลาด¹, เดชพล ปรีชากุล²

ว. เกษตรศาสตร์อีสาน 2554; 7(2) : 12-21

Received : 24 September 2010

Accepted : 31 August 2011

บทนำ: การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาตำรับยาทาสิวจึงด้วยตัวยาสำคัญ 2 ชนิดร่วมกัน คือ clindamycin phosphate ความเข้มข้น 1% w/w และ isotretinoin ความเข้มข้น 0.05 % w/w **วัสดุและวิธีการทดลอง:** ในขั้นตอนการศึกษา ก่อนการตั้งตำรับยา ได้เลือกสารช่วยต่างๆ ในการเตรียมเจลพื้นจำนวน 18 ตำรับ สารช่วยต่างๆ ได้แก่ gelling agent, preservative, antioxidant, chelating agent ที่ได้ทำการทดสอบความคงสภาพในสภาวะเร่งระงับเพื่อใช้ในการเลือกสาร พบว่ามี 3 สูตร ที่เหมาะสมที่นำมาศึกษาความคงสภาพในระยะยาว เพื่อทดสอบความคงสภาพทางกายภาพ เคมี จุลชีววิทยา รวมทั้งการปลดปล่อยยา โดยใช้ Franz's diffusion cell และความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Propionibacterium acne* เปรียบเทียบกับตำรับยาที่มีใช้ในท้องตลาด **ผลการศึกษา:** จากการศึกษา ก่อนการตั้งตำรับยา พบว่าตำรับที่เตรียมโดยใช้สารก่อเจล carbopol 940, hydroxypropyl methylcellulose and methylcellulose มีลักษณะทางกายภาพที่ดี ปริมาณตัวยาสำคัญ คงเหลือไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะเร่งที่ 45°C และ การทดสอบ hot and cold temperature cycling เป็นเวลา 1 เดือน เมื่อนำมาศึกษาความคงสภาพระยะที่ 4±1°C, 45±1°C ที่อุณหภูมิห้อง และภายใต้แสง 3 เดือน พบว่าทั้ง 3 ตำรับ มีความคงสภาพดีทางกายภาพและเคมี โดยปริมาณตัวยาสำคัญคงเหลืออยู่ในช่วงร้อยละ 98-102 อัตราการปลดปล่อยยา clindamycin phosphate อยู่ในช่วงร้อยละ 73-75 และการปลดปล่อยของ isotretinoin ประมาณร้อยละ 95 ที่เวลา 12 ชั่วโมงใกล้เคียงกับยาที่มีจำหน่ายในท้องตลาด (Ref I^o and Ref C^o) และพบว่าเป็นไปตาม zero-ordered และ Higuchi release kinetics ผลการหาค่า MIC ของ สารละลาย clindamycin phosphate (1% w/w) และ isotretinoin (0.05% w/w) ด้วยวิธี broth dilution พบว่ายับยั้งการเติบโตของเชื้อ *Propionibacterium acne* ในความเข้มข้น 31.25 µg/ml และ 625 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าสารละลายของตัวยาสำคัญแต่ละตัวชนิดเดียวในความเข้มข้นเท่ากัน ผลของ zone of inhibition ต่อ *P. acne* พบว่า 3 ตำรับมีค่าเทียบเท่ากับตำรับที่มีตัวยาสำคัญเป็น Ref C^o แต่มีขนาดการยับยั้งเชื้อดีกว่า Ref I^o **สรุปผล:** ตำรับยาที่พัฒนาขึ้นให้การปลดปล่อยยาที่ดี มีความคงตัวดีภายใต้สภาวะเร่ง เมื่อเทียบกับตำรับยาที่มีจำหน่ายในท้องตลาด และมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อดีกว่า

คำสำคัญ: คลินดามัยซินฟอสเฟต, ไอโซเตรติโนอิน, เจล, ความคงสภาพ

¹ นักศึกษาปริญญาโท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

² Ph.D., อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

* ติดต่อผู้พิมพ์: รศ.ดร.เดชพล ปรีชากุล โทรศัพท์/โทรสาร 0 4336 2091; E-mail: detpre@kku.ac.th

¹ Master Student of Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, Thailand 40002.

² Ph.D., Associate Professor, Lecturer, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen, Thailand 40002.

* Corresponding author: Assoc. Prof. Dr. Detpon Preechagoon Tel/Fax (+66) 0 4336 2091; E-mail: detpre@kku.ac.th

Abstract

Isotretinoin and Clindamycin Phosphate Combination Gel Preparation for Acne Treatment:

Formulation and Stability Evaluation

Wijittra Malad¹, Detpon Preechagoon^{2*}

IJPS, 2011; 7(2) : 12-21

Introduction: Combined formulations of antibiotics and retinoic acid have demonstrated advantageous results for topical acne treatment. The objective of this research was to develop a combination gel formulation of 1% w/w clindamycin phosphate and 0.05% w/w isotretinoin for acne treatment. **Materials and methods:** In the preformulation study, eighteen formulations were prepared for the selection of appropriate additives i.e. gelling agent, preservative, antioxidant, and chelating agent where a short-termed stability testing was performed. A long-term stability testing for the three most stable formulations was then done including physical, chemical, and biological stability, *in vitro* release of drug using a Franz's diffusion cell and zone of inhibition to *Propionibacterium acne* compared to other marketed products. **Results:** In the preformulation study it was found that carbopol 940, hydroxypropyl methylcellulose and methylcellulose were the most appropriate gelling agents as a clear gel was obtained and the drug concentration remained unchanged after 1-month of accelerated testing at 45°C and hot and cold temperature cycling conditions. After a long-term stability study at 4±1°C, 45±1°C, room temperature and under light exposure for 3 months, the three developed preparations were found physically and chemically stable. Drug remaining in the developed formulations was between 98-102%. Clindamycin releases of the developed preparations ranged 73-75% whereas those of isotretinoin were approximately 95% after 12 h. These release results were comparable to the commercial products (Ref I[®] and Ref C[®]). The release kinetics of the developed and commercial products fitted zero-order and Higuchi equations. The investigation of MIC of clindamycin phosphate (1% w/w) and isotretinoin (0.05% w/w) against *Propionibacterium acne* (*P. acne*) using broth dilution technique revealed the MIC concentration of 31.25 and 625 µg/ml, respectively, and these results showed the combination drug was better than the individual drugs alone. The zone of inhibition to *P. acne* of the developed formulations was equal to Ref C[®] and better than Ref I[®]. **Conclusion:** The developed formulations demonstrated comparable results on drug release rate and stability under accelerated test condition compared to commercial products whereas inhibition activity gave better results.

Keywords: Clindamycin Phosphate, Isotretinoin, gel, stability

บทนำ

ยาทาเฉพาะที่ที่ใช้ในการรักษาสิวมีหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มยาปฏิชีวนะ (antibiotics) กลุ่มกรดวิตามินเอ (retinoic acid) และสารสกัดจากธรรมชาติ (natural extracts) อย่างไรก็ตาม ก็ติ่งกลุ่มที่ถูกนำมาใช้บ่อยคือกลุ่มยาปฏิชีวนะและกลุ่มกรดวิตามินเอ เนื่องจากให้ผลในการรักษาดีและราคาไม่แพง ยาปฏิชีวนะเช่น clindamycin มีกลไกการออกฤทธิ์คือ ยับยั้งหรือทำลายเชื้อ *Propionibacterium acne* (*P. acne*) ที่

ทำให้เกิดการอักเสบของสิว (West, 2005) ส่วนยากลุ่มกรดวิตามินเอ เช่น isotretinoin มีกลไกการออกฤทธิ์คือ ทำให้สภาพผิวหนังไม่เหมาะกับการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acne* และทำให้การสร้าง keratin กลับมาเป็นปกติ (Layton and Cunliff, 1992; Webster, 1998; White, 1999) เมื่อมีการสร้าง keratin การอุดตันท่อของต่อมไขมันลดลง ดังนั้นเมื่อใช้ยากลุ่มกรดวิตามินเอ ร่วมกันกับยา กลุ่มอื่นทำให้สารหรือตัวยาอื่นผ่านผิวหนังได้ดีขึ้น ตำรับยาทาเฉพาะที่ที่ใช้ในการ

รักษาสิวมีทั้งตำรับที่มีตัวยาสีวสำคัญชนิดเดียวหรือมากกว่า 1 ชนิดขึ้นไป โดยตำรับยาที่มีตัวยาสีวสำคัญมากกว่า 1 ชนิด ประกอบด้วยตัวยาสีวสำคัญที่มีกลไกการออกฤทธิ์ต่างกันแต่ออกฤทธิ์เสริมกัน เมื่อยาทั้งสองตัวเสริมฤทธิ์กันจึงทำให้ประสิทธิภาพในการรักษาสิวดีกว่าตำรับที่มีตัวยาสีวสำคัญเพียงชนิดเดียว โดยเฉพาะยากลุ่มกรดวิตามินเอและกลุ่มยาปฏิชีวนะ (Cambazard, 1998) เมื่อนำมาใช้ร่วมกันพบว่าผลดีกว่าใช้ตัวยาสีวสำคัญชนิดเดียว

ในการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาดำรับยาในรูปแบบเจลที่ใช้ในการรักษาสิว โดยใช้ตัวยาสีวสำคัญ 2 ชนิดร่วมกัน คือ clindamycin phosphate และ isotretinoin เนื่องจาก clindamycin phosphate มีคุณสมบัติเด่นในการยับยั้งเชื้อ *P. acne* และเป็นยารักษาสิวในรูปแบบทาเฉพาะที่ที่ให้ผลดีในกลุ่มยาปฏิชีวนะ ส่วน isotretinoin เป็นสารกลุ่มกรดวิตามินเอ ซึ่งได้จากการสังเคราะห์เมื่อมีการใช้ในรูปแบบทาเฉพาะที่ให้ผลในการรักษาสิวได้ดี (Hermes *et al.*, 1998; Gollnick and Schramm, 1998) ดังนั้นการตั้งตำรับและศึกษาประสิทธิภาพของยาร่วมดังกล่าวจึงคาดว่าจะได้ผลดีกว่าตำรับที่มีตัวยาสีวสำคัญชนิดเดียว ในการลดการอักเสบของสิว อีกทั้งยังไม่พบว่ามีรายงานวิจัยที่ได้นำสารสำคัญทั้งสอง ในปริมาณความเข้มข้นดังกล่าวมาพัฒนาดำรับและศึกษาประสิทธิภาพ

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

Isotretinoin ($C_{20}H_{28}O_2$) (บริษัท Premier Pharma Supply), clindamycin Phosphate ($C_{18}H_{34}ClN_2O_8PS$) (ได้รับการอนุเคราะห์จากบริษัทสหแพทย์เภสัช), carbopol 940, hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC 4000), butylated hydroxytoluene(BHT), disodiummethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ methyl cellulose (MC 1500) (บริษัทเอกตรึงเคมีคอลจำกัด, ประเทศไทย), triethanolamine (AJAX Finechem; Australia), thioglycolate broth, tryptic Soy Agar (Fluga, Switzerland) และ tween 20 (Sigma, USA)

pH meter (Accumet, Model 10 NY, USA), brookfield viscometer (Brookfield viscometer, Model DV-III, Brookfield Co.,Ltd., USA), sonicator (Elma Transsonic 700/H, USA), UV-spectrophotometer (Shimadzu,

UV-1700 model, Japan), HPLC System (Perkin Elmer series LC pump 200, USA; UV visible detector, Perkin Elmer, model 785A, USA; Column C-18, particle size 4 μ m, 4.6 X 150 mm, Zorbax® Agilent Technology, USA), Franz diffusion cell (Crown glass company INC, model FDC-400, USA), autoclave (Biomed, USA) และ Incubator (Memmert®, Germany)

การศึกษาก่อนการตั้งตำรับ

การเลือกสารประกอบในตำรับ

การศึกษานี้มีเพื่อเลือกชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบในเจลพื้นของตำรับ Isotretinoin (0.05% w/w) ร่วมกับ Clindamycin Phosphate (1% w/w) โดยใช้สารก่อเจล 5 ชนิด ได้แก่ methylcellulose, carbopol 940, hydroxypropylmethyl cellulose, sodium carboxymethyl-cellulose และ tragacanth ชนิดละ 3 ความเข้มข้น (ร้อยละ 1-5 w/w) จำนวน 18 ตำรับ นำตำรับที่ได้ไปทดสอบความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีของตำรับเมื่อเก็บยาเตรียมไว้ใน 2 สภาวะคือเก็บที่อุณหภูมิสูง ($45 \pm 1^\circ\text{C}$) และต่ำ ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) รอบละ 24 ชั่วโมง สลับกัน 10 รอบ และเก็บไว้ที่ $45 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 1 เดือน เปรียบเทียบความคงสภาพทางกายภาพ ได้แก่ สี กลิ่น ความหนืด และปริมาณสารสำคัญคงเหลือทั้งสองชนิด เปรียบเทียบกับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ เพื่อคัดเลือกให้ได้ 3 ตำรับที่ดีที่สุดเพื่อนำไปศึกษาความคงสภาพในระยะยาวและประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเชื้อ *P. acne* และการปลดปล่อยตัวยาสิวจากเจลเปรียบเทียบกับยาที่มีจำหน่ายในท้องตลาดต่อไป

กราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการวิเคราะห์

การศึกษานี้ใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) เพื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยสภาวะที่ใช้วิเคราะห์ isotretinoin มี methanol เป็น mobile phase อัตราการไหลของ mobile phase คือ 0.8 ml/min วัดที่ความยาวคลื่น (λ) เท่ากับ 355 nm ความเข้มข้นของยาคือ 5, 15, 30, 45 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณ clindamycin phosphate มี 50% methanol ร่วมกับ 50 % phosphate buffer pH 6.65 เป็น mobile phase อัตราการไหลของ mobile phase เท่ากับ 1 ml/min วัดที่ความยาวคลื่น

(λ) เท่ากับ 214 nm โดยความเข้มข้นของยา คือ 50, 100, 150, 200 และ 250 µg/ml จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลโดยการหาค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) ของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ isotretinoin และ clindamycin phosphate กับ peak area นำไปใช้เพื่อคำนวณหาร้อยละที่ตรวจพบของตัวยาสำคัญในตำรับ

การตั้งตำรับและการทดสอบตำรับที่เตรียมได้ การศึกษาความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีใน สภาวะเร่งระยะยาว

ทำการเลือกตำรับที่เหมาะสมที่สุด 3 ตำรับจากขั้นตอนการศึกษา ก่อนการตั้งตำรับ มาทดสอบความคงสภาพ โดยนายาเตรียมแต่ละตำรับ มาทดสอบความคงสภาพแบบเร่ง (Rakwathin, 1997) โดยเก็บยาเตรียมในขวดแก้วใสขนาด 20 ml ที่ 3 สภาวะ คือ (1) สภาวะทดสอบ hot and cold temperature cycling โดยเก็บในตู้เย็น ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สลับกับการเก็บที่ $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 10 รอบ (2) เก็บที่อุณหภูมิ $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, (3) เก็บที่อุณหภูมิ $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ และ (4) เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 วัน จากนั้นประเมินการคงสภาพและประสิทธิภาพที่เปลี่ยนแปลงไปจากเริ่มต้น รวมทั้งหาปริมาณตัวยาสำคัญที่เหลืออยู่ด้วย HPLC-UV detector ตามวิธีที่ได้พัฒนาไว้ ทำการทดลองตำรับละ 3 ตัวอย่าง

การทดสอบความคงสภาพต่อแสง

นำตำรับ 3 ตำรับดังกล่าวมาทดสอบความคงสภาพกับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิด cool white ขนาด 40 วัตต์ โดยวางห่างจากตำรับที่ต้องการทดสอบเป็นระยะทาง 40 เซนติเมตร จากหลอดไฟ (Rakwathin, 1997) เป็นเวลา 90 วัน จากนั้นนำตำรับมาวิเคราะห์หาปริมาณ isotretinoin และ clindamycin phosphate ที่เหลืออยู่ในตำรับที่เวลา 0, 45 และ 90 วัน ด้วย HPLC-UV detector ตามวิธีที่ได้พัฒนาไว้ ทำการทดลองตำรับละ 3 ตัวอย่าง

การทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิว

ทำการศึกษาประสิทธิภาพของตำรับยาในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* (DMST 14916 strain) ด้วยวิธี disc diffusion method เพื่อหาขนาดของ zone of inhibition ของตำรับ และ broth micro-dilution method เพื่อหาค่า MIC ของสารละลายตัวยาสำคัญทั้งสองชนิด (Khunkitti

et al., 2006) โดยเก็บตำรับยาทั้ง 3 ตำรับไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. acne* ที่เวลา 0, 45 และ 90 วัน โดยทดสอบเทียบกับตำรับยาอ้างอิง ทำการทดลองตำรับละ 6 ตัวอย่าง

ทดสอบการปลดปล่อยตัวยา Isotretinoin และ Clindamycin Phosphate ออกจากตำรับ

ทดสอบการปลดปล่อยของ isotretinoin และ clindamycin phosphate ออกจากตำรับที่เตรียม ได้เปรียบเทียบกับตำรับที่มีตัวยาสำคัญแต่ละตัวชนิดเดียว คือ Ref I[®] (isotretinoin, 0.05% w/w) และ Ref C[®] (clindamycin phosphate, 1% w/w) ตามลำดับ ที่เวลา 0, 45 และ 90 วันหลังจากเตรียมเสร็จ โดยใช้เครื่องมือที่ทดสอบการปลดปล่อยตัวยาคือ Franz diffusion cell ที่มี synthetic cellulose acetate membrane filter ขนาด pore size เท่ากับ 0.2 µm เป็นตัวกลาง มี phosphate buffer pH 5.2 เป็นสารละลายที่ receptor site ควบคุมอุณหภูมิของสารละลายตัวกลางให้เท่ากับ $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 และ 12 ชั่วโมงโดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 500 µL ทดแทนตัวอย่างที่เก็บด้วย phosphate buffer ในปริมาตรที่เท่ากัน เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับตำรับเปรียบเทียบที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ทำการทดลองตำรับละ 3 ตัวอย่าง

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการศึกษา ก่อนการตั้งตำรับ : การเลือกความเข้มข้น และชนิดของสารประกอบในเจลพื้น

ผลจากการศึกษาในขั้นตอนการศึกษา ก่อนการตั้งตำรับทั้ง 18 ตำรับพบว่า ได้เจลที่มีลักษณะเนียนใส มีสีเหลืองอ่อนๆ มีความหนืดแปรโดยตรงกับความเข้มข้นของสารก่อเจล โดยมีค่า pH ของเจลที่เตรียมจาก methylcellulose, carbopol 940, HPMC, tragacant และ sodium carboxymethylcellulose ประมาณ 5, 6, 6, 6 และ 8 ตามลำดับ หลังจากการทดสอบความคงสภาพในสภาวะเร่งระยะสั้น พบว่ามีตำรับที่มีความคงสภาพทางกายภาพดี ไม่พบว่า มีสี กลิ่น และความหนืดเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน และมีปริมาณตัวยาคงเหลือทั้งสองชนิดไม่ต่างจากความเข้มข้นเริ่มต้น 3 ตำรับ ซึ่งมีสารก่อเจลคือ carbopol 940, HPMC 4000 และ MC 1500 โดยพบว่าแต่ละตำรับมีสารช่วยในตำรับชนิดเดียวกันและปริมาณเท่ากันได้แก่ ethyl alcohol, methyl paraben, propyl paraben, disodium EDTA และ BHT เป็นต้น ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตำรับ Isotretinoin และ Clindamycin phosphate gel ที่ผ่านการทดสอบในขั้นตอนก่อนการตั้งตำรับยา

สารเคมี	ปริมาณ		
	ตำรับ 1	ตำรับ 2	ตำรับ 3
Isotretinoin (g)	0.05	0.05	0.05
Clindamycin phosphate (g)	1	1	1
Carbopol 940 (g)	1	-	-
MC 1500 (g)	-	3	-
HPMC 4000 (g)	-	-	3
Triethanolamine (g)	0.17	-	-
Disodium EDTA (g)	0.1	0.1	0.1
BHT (g)	0.05	0.05	0.05
Ethanol (ml)	50	50	50
Methyl paraben (g)	0.18	0.18	0.18
Propyl paraben (g)	0.02	0.02	0.02
H ₂ O qs. (g)	100	100	100

กราฟมาตรฐานของตัวยาสำคัญ

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ isotretinoin กับ peak area โดยใช้ตัวทำละลายคือ methanol เมื่อวิเคราะห์จาก linear regression analysis ของเส้นกราฟมาตรฐาน พบว่าในช่วงความเข้มข้น 5-50 µg/ml มีค่า correlation coefficient (R^2) เท่ากับ 0.999 โดยมีสมการแสดงความสัมพันธ์คือ $y = 55675x$ กำหนดให้กราฟตัดแกน x ที่ 0 (y =absorption, x =drug concentration, µg/ml) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ clindamycin phosphate กับ peak area โดยวิเคราะห์จาก linear regression analysis ของเส้นกราฟมาตรฐาน พบว่าในช่วงความเข้มข้น 50-250 µg/ml มีค่า correlation coefficient (R^2) เท่ากับ 0.999 โดยมีสมการแสดงความสัมพันธ์คือ $y = 10046x$ กำหนดให้กราฟตัดแกน x ที่ 0 (y =absorption, x =drug concentration, µg/ml)

การตั้งตำรับและการทดสอบตำรับที่เตรียมได้

ผลการศึกษาความคงสภาพทางเคมีในสภาวะเร่ง

ผลการศึกษาความคงสภาพทางกายภาพ และทางเคมี ในสภาวะเร่งในสภาวะการเก็บ ที่อุณหภูมิ $4 \pm 1^\circ\text{C}$, $45 \pm 1^\circ\text{C}$ และ อุณหภูมิห้องจริงเป็นเวลา 90 วัน พบว่าตำรับทั้ง 3 สูตร มีความคงสภาพดี ปริมาณตัวยาสำคัญในตำรับเปรียบเทียบกับตำรับอ้างอิงแสดงผลการศึกษาดังตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 ความสภาพต่อสภาวะการเก็บต่างๆ ของ Isotretinoin เมื่อเก็บไว้ 90 วัน

ตำรับที่	% Isotretinoin เมื่อเริ่มทำการทดลอง (Mean±S.D.)	% Isotretinoin ที่เวลา 90 วัน (Mean±S.D.) (n=3)		
		4°C	อุณหภูมิห้อง	45°C
1	101.8±1.73	99.4±0.59	101.2±2.10	98.3±3.17
2	100.0±0.84	99.1±1.96	100.1±1.59	98.1±1.05
3	100.7±1.71	99.5±0.68	99.1±1.70	98.2±1.82
Ref I [®]	102.6±1.37	-	102.0±1.91	-

จากตารางที่ 2 พบว่า ตำรับที่พัฒนาขึ้นทั้ง 3 สูตร เมื่อเก็บที่ 4±1°C และอุณหภูมิห้อง มีปริมาณ Isotretinoin ไม่เปลี่ยนแปลงจากเดิม แต่เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 45±1°C พบว่าปริมาณ Isotretinoin ลดลงจากตอนเริ่มทำการทดลองเล็กน้อย

(ร้อยละ 2) แสดงว่าตำรับยามีความคงสภาพดีในสภาวะปกติและสภาวะเร่งเมื่อเก็บไว้ 90 วัน โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างตำรับที่เตรียมกับตำรับในท้องตลาดเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องด้วย

ตารางที่ 3 ความคงสภาพต่อสภาวะการเก็บต่างๆ ของ clindamycin phosphate เมื่อเก็บไว้ 90 วัน

ตำรับ	% clindamycin เมื่อเริ่มทำการทดลอง (Mean±S.D.)	% clindamycin ที่เวลา 90 วัน (Mean±S.D.) (n=3)		
		4°C	อุณหภูมิห้อง	45°C
1	102.4±2.46	99.7±1.18	100.2±1.83	101.5±2.81
2	100.4±2.41	99.4±2.52	98.9±1.52	99.1±0.38
3	101.4±2.43	99.4±0.52	99.3±1.41	99.8±0.33
Ref C [®]	102.9±1.13	-	101.9±0.9	-

จากตารางที่ 3 พบว่า ตำรับที่พัฒนาขึ้นทั้ง 3 สูตร เมื่อเก็บที่ 4±1°C, 45±1°C และอุณหภูมิห้อง มีปริมาณ clindamycin ไม่เปลี่ยนแปลงจากเดิม แสดงว่าตำรับยามีความคงสภาพดีในสภาวะปกติและสภาวะเร่งเมื่อเก็บไว้ 90 วัน โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างตำรับที่เตรียมกับตำรับในท้องตลาดเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องด้วย

ผลการทดสอบความคงสภาพทางกายภาพในสภาวะเร่ง

เมื่อเก็บตำรับยาเตรียมทั้ง 3 สูตรไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และ 45°C และอุณหภูมิห้อง ผลการประเมินลักษณะทางกายภาพได้แก่ pH การวัดความหนืดของตำรับ การสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีและกลิ่นของตำรับพบว่า pH ของทุกตำรับทุกการทดสอบ มีค่าคงที่เท่ากับ 6 ตลอดระยะเวลาที่ทดสอบ ซึ่งเป็น ช่วงที่ด้วยยา isotretinoin และ clindamycin

phosphate มีความคงสภาพดีที่สุด ผลการวัดความหนืดของตำรับ พบว่าที่สภาวะเก็บทั้ง 3 อุณหภูมิ มีการเปลี่ยนแปลงความหนืดจากเมื่อเตรียมตำรับเสร็จใหม่ๆ เล็กน้อย (ตารางที่ 4) ส่วนการเปลี่ยนแปลงของสีและกลิ่นของตำรับพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิม คือสีของตำรับยังเป็นสีเหลืองอ่อนใส เนื้อเจลกระจายตัวสม่ำเสมอ ไม่มีการตกตะกอนของอนุภาคใดๆ และมีกลิ่นของแอลกอฮอล์เล็กน้อย ผลการประเมินลักษณะความคงสภาพทางกายภาพของตำรับที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ได้แก่ Ref I[®] และ Ref C[®] เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องพบว่าตำรับยาทั้ง 2 ตำรับมีค่าความเป็นกรดต่าง ความหนืด ลักษณะเนื้อเจล สีและกลิ่นของตำรับไม่เปลี่ยนแปลงจากเดิม โดยพบว่าความหนืดของ Ref I[®] มีความหนืดสูงที่สุดกว่าตำรับที่พัฒนาโดย Ref C[®] มีค่าความหนืดต่ำที่สุด

ตารางที่ 4 ความหนืดของของตำรับยาเปรียบเทียบกับตำรับอ้างอิงเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 90 วัน

ตำรับ	ความหนืด เมื่อเริ่มทดลอง (Ps) (Mean±S.D.) (n=3)	ความหนืดของแต่ละตำรับเมื่อเก็บไว้ที่สภาวะต่างๆ ที่เวลาต่างกัน (Ps) (Mean±S.D.) (n=3)					
		4°C		อุณหภูมิห้อง		45°C	
		45 วัน	90 วัน	45 วัน	90 วัน	45 วัน	90 วัน
1	320.1±1.31	299.0±5.51	291.9±3.31	291.2±4.27	313.0±4.17	291.2±7.27	303.6±4.72
2	311.2±3.28	312.2±5.06	324.5±6.33	312.1±3.41	299.8±2.38	302.1±5.40	292.5±5.41
3	300.8±4.24	292.0±7.30	292.3±4.27	291.0±5.38	302.0±6.21	291.5±5.38	307.6±3.98
Ref I [®]	440.3±5.42	-	-	-	437.6±3.28	-	-
Ref C [®]	220.1±4.22	-	-	-	232.5±2.18	-	-

ผลการทดสอบความคงสภาพต่อแสง

ผลการศึกษาความคงสภาพต่อแสง ของตัวยา

isotretinoin และ clindamycin phosphate ของตำรับทั้ง 3 สูตรเป็นเวลา 90 วัน ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ความคงสภาพต่อแสงของ Isotretinoin และ clindamycin phosphate ในตำรับเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 90 วัน

ตำรับ	% Isotretinoin / clindamycin phosphate (Mean±S.D.) (n=3)		
	วันแรก	วันที่ 45	วันที่ 90
1	100.4±1.23	100.5±1.13	100.9±1.82
	99.7 ±1.95	101.7±1.33	99.6±1.61
2	100.6±2.53	99.0±2.52	99.4±1.66
	101.5±1.05	100.7±2.62	100.2±2.91
3	101.5±1.05	101.2±2.97	99.5±2.49
	100.4±1.23	100.5±1.56	99.6±2.25

พบว่า เมื่อให้ตำรับสัมผัสแสงเป็นเวลา 90 วัน ปริมาณตัวยาที่เหลืออยู่ในตำรับไม่เปลี่ยนแปลงจากวันแรกที่เตรียมตำรับ แสดงให้เห็นว่าตำรับที่พัฒนาขึ้นมีความคงทนต่อสภาวะเร่งโดยแสงเป็นเวลาอย่างน้อย 3 เดือน ทำให้มั่นใจได้ว่า ตำรับที่พัฒนาขึ้นน่าจะ มีความคงทนต่อแสงได้ดี

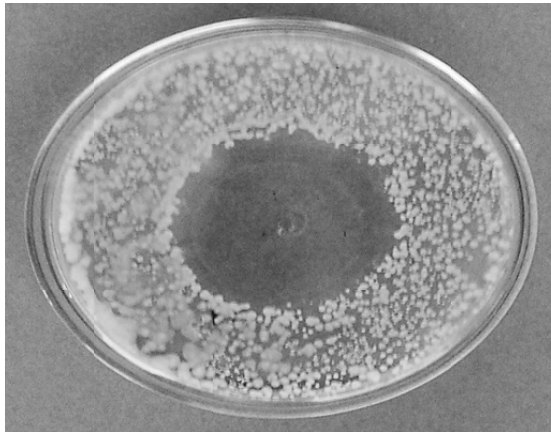
ทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิว

จากการทดลองการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารละลาย clindamycin phosphate และ isotretinoin ใน 50% ethanol สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acne* ในความเข้มข้น 31.25 µg/ml และ 625 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่า สารละลาย isotretinoin และ clindamycin phosphate แต่ละตัวชนิดเดียวใน 50% ethanol และเมื่อทดสอบหา ขนาดของ zone of inhibition ของตำรับยาทั้ง 3 สูตรเปรียบเทียบกับ Ref C[®] และ Ref I[®] พบว่า ขนาดของ zone of inhibition ของตำรับที่ 1, 2 และ

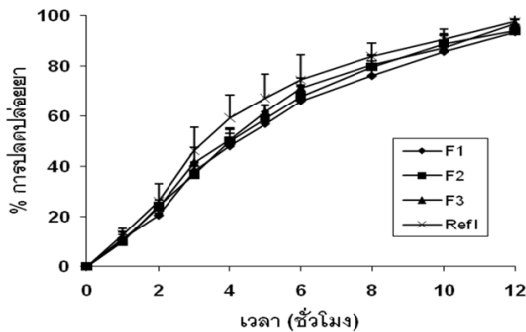
3 สูตรมีขนาดไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างกับ Ref C[®] โดยมีขนาดเท่ากับ 44.6±0.58, 44.6±0.29, 44.33±1.04, 44.0±0.5 mm ตามลำดับ ส่วน Ref I[®] มีขนาด zone of inhibition เท่ากับ 11.6±1.89 mm ซึ่งน้อยกว่าสูตรตำรับทั้ง 3 สูตร เนื่องจากตัวยา isotretinoin ไม่ใช่ว่าด้านเชื้อแบคทีเรีย (ตัวอย่างการแสดงรูปที่ 1 Inhibition zone ของตำรับ 1) จึงทำให้พบการยับยั้งเชื้อน้อยกว่า และการทดสอบนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างการควบคุมที่ไม่มีตัวยาใดๆ ก็ไม่พบว่ามี zone of inhibition เกิดขึ้นแต่อย่างใด และไม่พบเชื้อแต่อย่างใด จากการทดสอบ negative control

การทดสอบการปลดปล่อยตัวยา isotretinoin และ clidamycin phosphate ออกจากตำรับ

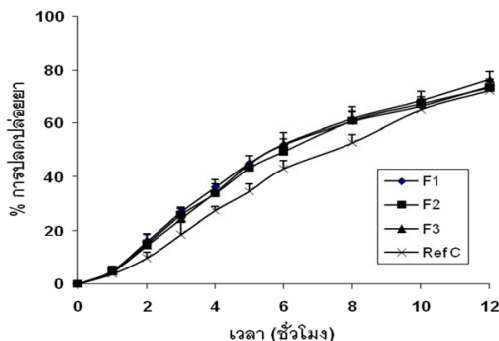
ผลการศึกษาการปลดปล่อยตัวยา isotretinoin ที่ถูกปล่อยออกมาสะสมที่เวลาต่างๆ ตั้งแต่เวลา 0-12 ชั่วโมง จากเจลทั้ง 3 ตำรับและตำรับ Ref I[®] ผลการศึกษาแสดงดัง รูปที่ 2



รูปที่ 1 Zone of inhibition ของสูตรที่ 1 ก่อนเริ่มทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง



รูปที่ 2 การปลดปล่อยตัวยา isotretinoin ออกจาก 3 ตำรับที่พัฒนาและตำรับเปรียบเทียบ Ref I® ที่เวลาเริ่มต้น



รูปที่ 3 การปลดปล่อย Clindamycin phosphate ที่พัฒนาและตำรับเปรียบเทียบ Ref C® ที่เวลาเริ่มต้น

จากรูปที่ 2 พบว่าตำรับ Ref I® มีอัตราการละลายของยาเร็วกว่าตำรับที่พัฒนาขึ้นทั้ง 3 ตำรับ อย่างไรก็ตามที่เวลา 12 ชั่วโมงพบว่ามีการปลดปล่อยออกมาใกล้เคียงกัน โดยตำรับที่ 1 ตำรับที่ 2 และ ตำรับที่ 3 มีการปลดปล่อยตัวยา isotretinoin ที่เวลา 12 ชั่วโมง ออกมาได้ร้อยละ 95.8 ± 1.13 , 95.9 ± 0.83 และ 95.6 ± 1.19 ตามลำดับ ส่วนตำรับ Ref I® ที่เวลา 12 ชั่วโมง มีการปลดปล่อยตัวยาสำคัญออกมาร้อยละ 95.6 ± 1.97 ของตัวยาที่มีในตำรับ และเมื่อทดสอบการปลดปล่อย isotretinoin เมื่อเก็บตำรับไว้เป็นเวลา 90 วัน แล้วเปรียบเทียบกับปริมาณที่ปลดปล่อยออกมากับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ พบว่าปริมาณตัวยาที่ปลดปล่อยออกมาที่ 12 ชั่วโมง ของทั้ง 3 ตำรับลดลงเล็กน้อย แต่ตำรับ Ref I® ปริมาณตัวยาที่ปลดปล่อยออกมาที่ 12 ชั่วโมง ใกล้เคียงกับวันแรกที่เริ่มทำการวิเคราะห์และตำรับ (ไม่แสดงข้อมูล)

จากรูปที่ 3 แสดงผลการศึกษากการปลดปล่อยตัวยา clindamycin phosphate จากตำรับที่ถูกปลดปล่อยออกมาสะสมที่เวลาต่างๆ ตั้งแต่เวลา 0-12 ชั่วโมง จากเจลทั้ง 3 ตำรับและตำรับ Ref C® พบว่า ตำรับที่ 1, 3 และ Ref C® มีการปลดปล่อยของยาออกมาใกล้เคียงกัน ขณะที่ตำรับที่ 2 มีอัตราการปลดปล่อยยาออกมาช้าที่สุดซึ่งมี methyl cellulose เป็นสารกักเจล อย่างไรก็ตามที่เวลา 12 ชั่วโมงพบว่ามีการปลดปล่อยออกมาใกล้เคียงกัน โดยพบว่าที่ 12 ชั่วโมง ตำรับที่ 1 ตำรับที่ 2 และ ตำรับที่ 3 เมื่อเตรียมเสร็จปลดปล่อยตัวยา clindamycin phosphate ออกมาได้ร้อยละ 75.6 ± 1.59 , 74.4 ± 3.48 และ 77.4 ± 1.00 ของตัวยาที่มีในตำรับตามลำดับ ส่วน ตำรับ Ref C® มีการปลดปล่อยตัวยาสำคัญออกมาร้อยละ 73.1 ± 0.31 ของตัวยาที่มีในตำรับ

เมื่อทดสอบการปลดปล่อย clindamycin phosphate เมื่อเก็บตำรับไว้เป็นเวลา 90 วัน แล้วเปรียบเทียบกับปริมาณที่ปลดปล่อยออกมากับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ พบว่าปริมาณตัวยาที่ปลดปล่อยออกมาที่ 12 ชั่วโมง ของตำรับที่ 2 ปริมาณตัวยา clindamycin phosphate ที่ถูกปลดปล่อยใกล้เคียงกับวันแรกที่เริ่มทำการวิเคราะห์ ส่วนตำรับที่ 1 ตำรับที่ 3 และตำรับ Ref C® ปริมาณตัวยาสะสมที่ปลดปล่อยออกมาที่ 12 ชั่วโมง ลดลงจากเดิมเล็กน้อย อย่างไรก็ตามที่ตำรับยาทั้ง 3 สูตร มีการปลดปล่อยตัวยา clindamycin phosphate สะสมที่เวลา 12 ชั่วโมง ใกล้เคียงกัน แต่ตำรับ Ref C® มีอัตราการปลดปล่อยตัวยา clindamycin phosphate ออกมาช้ากว่า ทั้ง 3 สูตรตำรับที่เตรียม (ไม่แสดงข้อมูล) และ

เมื่อทดสอบอัตราการปลดปล่อยยาที่เวลา 1-6 ชั่วโมงพบว่ามีการปลดปล่อยยาเป็นไปตาม zero-ordered และ Higuchi release kinetics (Khairuzzaman, *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007) ซึ่งการปลดปล่อยที่เป็นไปตามรูปแบบทั้งสองนี้แสดงให้เห็นว่าระบบสามารถควบคุมยาที่ออกมาจากตำรับได้อย่างสม่ำเสมอและคงที่ใน 3 ตำรับที่เตรียมและตำรับเปรียบเทียบกับตำรับที่พัฒนาขึ้นทั้ง 3 ตำรับมีค่าเฉลี่ยของ r^2 มากกว่า 0.94 ขณะที่ Ref I[®] และ Ref C[®] มีค่ามากกว่า 0.97 และ 0.93 ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่าสารก่อเจลที่ใช้ในการพัฒนาตำรับคือ MC 1500, HPMC 4000 และ Carbopol 940 ให้ผลการทดสอบอัตราการปลดปล่อยยา ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งคุณสมบัติทางกายภาพก็ไม่แตกต่างกัน เมื่อทดสอบความคงตัวในระยะยาว (3 เดือน) แสดงว่าสารก่อเจลทั้งสามชนิดสามารถใช้ได้ในการตั้งตำรับนี้ได้ดี อย่างไรก็ตามปัจจัยที่มีผลที่ทำให้ตัวยาคงตัวดีเนื่องมาจากการตั้งตำรับที่ pH ที่ยาทั้งสองคงตัว ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า pH เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด ที่ทำให้ตำรับยาไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติตลอดระยะเวลาที่เก็บ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าชนิดของสารก่อเจลทั้ง 3 ชนิดที่ใช้เตรียมตำรับไม่มีผลต่อความคงสภาพของตำรับยา แต่ก็ต้องทดสอบในระยะยาวเป็นเวลายาวอย่างน้อย 1 ปี เพื่อทดสอบความคงสภาพต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ตำรับยาร่วม isotretinoin (0.05 %w/w) และ clindamycin phosphate (1% w/w) ที่เตรียมในงานวิจัยนี้เป็นตำรับที่มีความคงสภาพดี มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียหลักที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดสิว ดีกว่าหรือเท่ากับตำรับที่มีตัวยาสาคัญแต่ละตัวเพียงชนิดเดียวที่มีจำหน่ายในท้องตลาด และเมื่อทดสอบความคงสภาพในสภาวะเร่งและสภาวะปกติ นั้น มีความคงสภาพดีตลอดระยะเวลา 90 วัน และคงสภาพดีเมื่อทดสอบภายใต้แสง อีกทั้งตำรับทั้ง 3 สูตรมีการปลดปล่อยตัวยานี isotretinoin ออกมาจากตำรับได้ดีเทียบเท่ากับตำรับที่มีในท้องตลาดและมีการปลดปล่อยตัวยานี clindamycin phosphate ออกมาจากตำรับได้ดีกว่าตำรับในท้องตลาดที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบ และ pH ถือว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อความคงตัวของยา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนทั่วไปของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2550 และทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย รวมทั้งสาขาวิชาพิษวิทยาที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องดับเพลิงเพื่อแบคทีเรีย

References

- Cambazard F. Clinical efficacy of Velac®, a new tretinoin and clindamycin phosphate gel in acne vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998; 11 (Suppl): S20-S27.
- Gollnick H, Schramm M. Topical therapy in acne. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998; 11(suppl 1): 8-12.
- Hermes B, Praetel C, Henz BM. Medium dose isotretinoin for the treatment of acne. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998, 11(2): 117-121.
- Khairuzzaman A, Ahmed SU, Savva M, Patel NK. Zero-order release of aspirin, theophylline and atenolol in water from novel methylcellulose glutarate matrix tablets. *Int J Pharm.* 2006, 318(1-2): 15-21.
- Khunkitti W, Aromdee C, Taweechaisupapong S, Lertsattitthanakorn P. In vitro bioactivities of essential oils used for acne control. *Int J Aromather* 2006, 16: 43-49.
- Layton AM, Cunliff WJ. Guidelines for optimal use of isotretinoin in acne. *J Am Acad Dermatol* 1992, 27(6): S2-S7.
- Rakwathin J. Approach for light stability testing of drugs. Bangkok, Niyomvittaya 1997.
- Wang F, Saidel GM, Gao J. A mechanistic model of controlled drug release from polymer millirods: Effects of excipients and complex binding, *J Control Release* 2007, 119(1): 111-120.

-
- Webster GF. Topical tretinoin in acne therapy. *J Am Acad Dermatol* 1998, 39: S38-44.
- West DP and Lee E. Acne Vulgaris. Pharmacotherapy
6th Ed. London: The Pharmaceutical Press.
2005: 1757.
- White GM. Acne Therapy. *Adv Dermatol* 1999; 14:29-58.