

การพัฒนายาไอโซไนอาซิดและไรแฟมพิซินไมโครสเฟียร์สำหรับใช้รับประทาน Development of Oral Isoniazid and Rifampicin Microspheres

วันดี รังสัจจิตรประภา^{1*}

Wandee Rungseewijitprapa

Received: 16 October 2008 Accepted: 24 April 2009

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการเตรียมไอโซไนอาซิดและไรแฟมพิซินไมโครสเฟียร์สำหรับรับประทาน วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อเพิ่มความคงตัวให้กับยาไรแฟมพิซินซึ่งไม่คงตัวในสภาวะที่เป็นกรดของตัวยาไอโซไนอาซิด และกระเพาะอาหาร การศึกษาจะใช้เอทิลเซลลูโลสในการเตรียมไอโซไนอาซิดไมโครสเฟียร์และใช้ ยูตราจิต แอล 100-55 ในการเตรียมไรแฟมพิซินไมโครสเฟียร์ จากการศึกษาปัจจัยในด้านของสูตรตำรับที่มีผลต่อลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของไมโครสเฟียร์พบว่าวิธีเตรียมไอโซไนอาซิดไมโครสเฟียร์ที่เหมาะสมคือ w/o/w emulsion solvent diffusion evaporation วิธีเตรียมไรแฟมพิซินไมโครสเฟียร์ที่เหมาะสมคือ o/o emulsion solvent diffusion evaporation การศึกษาความคงตัวโดยใช้ Differential scanning calorimetry ของผงยาเมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิ 37°C และ 50°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเทอร์โมแกรม ในขณะที่ยาซึ่งเก็บอยู่ในรูปไมโครสเฟียร์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง การศึกษาการปลดปล่อยตัวยาคพบว่า การปลดปล่อยตัวยาไรแฟมพิซิน จากไมโครสเฟียร์ในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดต่าง 6.8 มีอัตราเร็วกว่าในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการละลายของยูตราจิต แอล 100-55 ที่ใช้เป็นพอลิเมอร์สำหรับห่อหุ้มยา จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าการเตรียมยาสูตรผสมของไอโซไนอาซิดและไรแฟมพิซินในรูปแบบไมโครสเฟียร์ มีศักยภาพในการเพิ่มความคงตัวของตัวยาไรแฟมพิซินได้สำหรับใช้รับประทานได้

คำสำคัญ: ไอโซไนอาซิด ไรแฟมพิซิน ไมโครสเฟียร์ การปลดปล่อยตัวยา ความคงตัว

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2552; 5(1): 63-73

Abstract

The objective of this study was to develop oral isoniazid and rifampicin microspheres in order to improve rifampicin stability by avoiding its direct contact with INH and acidic environmental of stomach. In the study, isoniazid microspheres were prepared by w/o/w emulsion solvent diffusion evaporation method using ethylcellulose as wall material. Rifampicin microspheres were prepared by o/o emulsion solvent diffusion evaporation method

¹ Ph.D. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
Ph.D., Assistant Professor, Division of Pharmaceutical Chemistry and Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubonratchathani University

* Corresponding author: Wandee Rungseewijitprapa, Division of Pharmaceutical Chemistry and Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubonratchathani University, Ubonratchathani 34190 Tel. +66 45 353609 Fax. +66 45 353626

using Eudragit® L 100–55 as polymer. Formulation variables which effect physical characteristic and microsphere stability were investigated. Result from differential scanning calorimetry showed that isoniazid and rifampicin when kept as drug powder at 37°C and 50°C for 2 weeks were unstable while drug encapsulated in microspheres remained unchange. In vitro drug release showed a faster dissolution rate of rifampicin microspheres in phosphate buffer pH 6.8 than in 0.1 N HCl which due to the solubility of Eudragit® L 100–55 in the medium. In conclusion, the combined isoniazid and rifampicin microspheres formulation exhibited a potential to improve the rifampicin stability for oral application.

Keywords: Isoniazid, Rifampicin, Microspheres, Drug release, Stability

IJPS 2009; 5(1): 63-73

บทนำ

ปัจจุบันนับได้ว่าวัณโรคเป็นสาเหตุหนึ่งในการเสียชีวิตของประชากร ในประเทศที่กำลังพัฒนา โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเอดส์ที่มีอาการแทรกซ้อนของวัณโรค ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาในหลายๆ ด้านตามมา นอกจากนี้ในการรักษา ยังประสบปัญหาการดื้อยาของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* สำหรับกลุ่มยาที่มักเลือกใช้เป็นอันดับแรก คือ ไอโซไนอาซิด (Isoniazid), ไรแฟมพิซิน (Rifampicin), ไพราซิनाไมด์ (Pirazinamide) และอีแทมบูทอล (Ethambutol) โดยยาที่มีการใช้มากที่สุดคือ ไอโซไนอาซิด และไรแฟมพิซิน เนื่องจากเป็นยาตัวเลือกแรก (First line essential drug) และต้องใช้ร่วมกันในช่วง 4 เดือนสุดท้ายของการรักษา (Donald and Diacon, 2008)

ในการรักษาวัณโรคนั้นต้องรับประทานยาติดต่อกันนานอย่างน้อย 6–9 เดือน ดังนั้น ความร่วมมือในการใช้ยาของผู้ป่วยให้ได้ขนาดยาตามที่กำหนดอย่างต่อเนื่องจึงมีความสำคัญมากต่อประสิทธิภาพในการรักษา นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ยาไรแฟมพิซินไม่เข้ากันกับยาไอโซไนอาซิด ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ซึ่งจะทำให้ยาไรแฟมพิซินไม่คงตัวทั้งทางกายภาพและประสิทธิภาพของยาจะลดลงเหลือเพียงร้อยละ 60 (World Health Organization, 2003) ดังนั้นการรับประทานยาไอโซไนอาซิดซึ่งมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน (Ofoefule et al., 2002) ร่วมกับยาไรแฟมพิซิน จะก่อให้เกิดการสลายตัวของยาไรแฟมพิซินได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความต้องการที่จะพัฒนาสูตรตำรับของยาไอโซไนอาซิด และยาไรแฟมพิซิน โดยเตรียมในรูปของไมโครสเฟียร์ ที่นำมาบรรจุในแคปซูล ซึ่งประกอบด้วยไอโซไนอาซิดที่เตรียมจากพอลิเมอร์ที่ละลายได้ในกระเพาะอาหาร และไรแฟมพิซินที่เตรียม

จากพอลิเมอร์ที่ละลายในลำไส้ โดยมุ่งหวังเพื่อเพิ่มความคงตัวของยาไรแฟมพิซินโดยไม่ให้สัมผัสกับตัวยาไอโซไนอาซิดและสภาพความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร และเพื่อเพิ่มความร่วมมือในการใช้ยาของผู้ป่วยในการที่จะสามารถรับประทานยาทั้ง 2 ชนิดได้พร้อมกันจากภายในแคปซูลเดียวกันซึ่งจะส่งผลให้การรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้น

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี

Isoniazid [INH] (Acros®, USA), Rifampicin [RIF] (Utopian, Thailand), Ethylcellulose 10 CPS [EC] (Ethocel®, Germany), Eudragit® L 100 – 55 (Röhm GmbH, Darmstadt, Germany), Methylene chloride [Dichloromethane] [DCM] (Carlo Erba, France), Polyvinyl alcohol [PVA] (Acros®, USA), Ethyl alcohol (Carlo Erba, France), Magnesium stearate (Fluka, Switzerland), Mineral oil (Altima, Thailand), n-Hexane (Sckarlau Chemic S.A., Spain), Span 80 (Pharma, Thailand)

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียม INH microspheres

2.1.1 การเตรียมด้วยวิธี o/w emulsion solvent evaporation

ปรับปรุงจากวิธีของ Sriwongjanya และ Bodmeier (Sriwongjanya and Bodmeier, 1997) เตรียมวัตถุดิบภายในโดยการละลายด้วยยา INH และ EC

ใน DCM จากนั้นนำไปปั่นผสมกับวัตถุดิบภายนอกที่ประกอบด้วยสารละลาย 0.25% PVA ในน้ำ บั่นด้วยเครื่อง Homogenizer ชนิดสามใบพัด (Ika®-WERKE, Germany) ที่ความเร็วรอบ 500 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาปั่นต่อด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่ความเร็วรอบ 500 rpm เป็นเวลา 3, 6 และ 12 ชั่วโมง ภายใต้ตุ้ดตุ้ดคว้น เมื่อครบกำหนด ทำการล้างไมโครสเฟียร์ด้วย purified water ปริมาตร 500 mL จำนวน 2 ครั้ง แล้วตากไมโครสเฟียร์ในตุ้ดตุ้ดคว้น

2.1.2 การเตรียมด้วยวิธี $w_1/o/w_2$ emulsion solvent evaporation

ปรับปรุงจากวิธีของ Yeh และคณะ (Yeh et al., 1995) เตรียมวัตถุดิบ w_1 โดยการละลายตัวยา INH ในน้ำ จากนั้นนำไปปั่นผสมกับวัตถุดิบน้ำมันที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ EC ละลายใน Dichloromethane จะได้ w_1/o emulsion จากนั้นนำไปปั่นผสมกับวัตถุดิบภายนอกที่ประกอบด้วยสารละลาย 0.25% PVA ในน้ำ บั่นด้วยเครื่อง Homogenizer ที่ความเร็วรอบ 500 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาปั่นต่อด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่ความเร็วรอบ 500 rpm เป็นเวลา 3, 6 และ 12 ชั่วโมง ภายใต้ตุ้ดตุ้ดคว้น เมื่อครบกำหนด ทำการล้างไมโครสเฟียร์ด้วย purified water ปริมาตร 500 mL จำนวน 2 ครั้ง แล้วตากไมโครสเฟียร์ในตุ้ดตุ้ดคว้น

2.2 การเตรียม RIF microspheres

2.2.1 การเตรียมด้วยวิธี o/w emulsion evaporation

ปรับปรุงจากวิธีของ Varshosaz และคณะ (Varshosaz et al., 2007) เตรียมวัตถุดิบภายนอกโดยการละลายตัวยา RIF และ Eudragit® L100-55 ในส่วนผสมของ 95% Ethanol, Isopropyl alcohol และ DCM จากนั้นนำไปปั่นผสมกับวัตถุดิบภายนอกที่ประกอบด้วยสารละลาย 0.6% PVA ในน้ำ บั่นด้วยเครื่อง Homogenizer ที่ความเร็วรอบ 500 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาปั่นต่อด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่ความเร็วรอบ 300 rpm เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ภายใต้ตุ้ดตุ้ดคว้น เมื่อครบกำหนด ทำการล้างไมโครสเฟียร์ด้วย purified water ปริมาตร 500 mL จำนวน 2 ครั้ง แล้วตากไมโครสเฟียร์ในตุ้ดตุ้ดคว้น

2.2.2 การเตรียมด้วยวิธี o/o emulsion

ปรับปรุงจากวิธีของ Yang และคณะ (Yang et al., 2005) โดยมีวิธีการอย่างย่อคือ เตรียมวัตถุดิบภายนอกโดยการละลายตัวยา RIF และ Eudragit® L100-55 ในส่วนผสมของ 95% Ethanol และเติม Tween 80 จากนั้นนำไปปั่นผสมกับวัตถุดิบภายนอกที่ประกอบด้วย Span 80 ใน Mineral oil บั่นด้วยเครื่อง Homogenizer ที่ความเร็วรอบ 500 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาปั่นต่อด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่ความเร็วรอบ 300 rpm เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ภายใต้ตุ้ดตุ้ดคว้น เมื่อครบกำหนด ทำการล้างไมโครสเฟียร์ด้วย Petroleum ether 50 mL จำนวน 3 ครั้ง แล้วตากไมโครสเฟียร์ในตุ้ดตุ้ดคว้น

2.3 การประเมิน INH และ RIF microspheres

2.3.1 การวัดขนาดอนุภาคและการกระจายขนาด

การวัดขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาคของ INH microspheres ทำได้โดยวิธี wet sieving โดยการเทไมโครสเฟียร์ที่เตรียมเสร็จใหม่ ๆ ซึ่งกระจายตัวในน้ำผ่านแรงที่มีช่องขนาด 25, 53, 75, 150 และ 180 μm โดยใช้น้ำชะหลายๆ รอบเพื่อให้ไมโครสเฟียร์ผ่านแรงตามขนาดของไมโครสเฟียร์นั้นๆ

การวัดขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาคของ RIF microspheres โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

2.3.2 ร้อยละผลผลิตของ microspheres (% yield)

% yield เป็นค่าที่บ่งบอกประสิทธิภาพในการเตรียมว่ามีการสูญเสียวัตถุดิบไปในระหว่างการเตรียมมากน้อยเพียงใด โดยการเตรียมที่มีประสิทธิภาพควรมี % yield สูง โดยสามารถคำนวณได้ ดังนี้

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{Total obtained weight of microspheres}}{\text{practical weight of drug} + \text{practical weight of polymer}} \times 100$$

2.3.3 % Encapsulation efficiency (% EE)

% EE เป็นค่าที่บ่งบอกว่ามีตัวยาสำคัญถูกเก็บกักไว้ในไมโครสเฟียร์มากน้อยเพียงใด เมื่อเทียบกับปริมาณตัวยาสำคัญที่เติมลงไปในช่วงขั้นตอนการเตรียม โดยระบบที่ดีควรมี % EE สูง ซึ่งสามารถคำนวณได้ ดังนี้

$$\% \text{ EE} = \frac{\text{practical drug load}}{\text{theoretical drug load}} \times 100$$

2.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณของ INH และ RIF ที่เก็บกักในไมโครสเฟียร์

ซึ่ง INH microspheres 2 mg ละลายใน Methanol:H₂O (2:3) จนครบ 50 mL และ RIF microspheres 2 mg ละลายใน phosphate buffer pH 6.8 จนครบ 50 mL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 262 และ 254 nm ตามลำดับ (Zhou et al., 2005)

2.3.5 การศึกษาลักษณะทางกายภาพ

ศึกษาลักษณะของไมโครสเฟียร์ที่เตรียมได้ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 5-40 เท่าและกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscopy, SEM) เพื่อดูลักษณะพื้นผิวของไมโครสเฟียร์ โดยนำไมโครสเฟียร์ที่ได้มาเคลือบด้วยทองและถ่ายภาพ โดยใช้ค่าความต่างศักย์ 15 kV (Zhou et al., 2005)

2.3.6 การศึกษาความคงตัวด้วย Differential scanning calorimetry (DSC)

ศึกษาความคงตัวของผงยา RIF ที่ผสมกับ INH เปรียบเทียบกับเมื่อเตรียมในรูปไมโครสเฟียร์ของ INH, ไมโครสเฟียร์ของ RIF, และไมโครสเฟียร์ของ RIF ที่ผสมกับไมโครสเฟียร์ INH ใช้ตัวอย่าง 4-10 mg ใส่ถ้วยอลูมิเนียม ที่ 10°C/min ระหว่างอุณหภูมิ 25°C ถึง 250°C โดยใช้ N₂ 50 mL/min (Rastogi et al., 2007)

2.3.7 การศึกษาการปลดปล่อยตัวยานอกกร่าง (In vitro drug release)

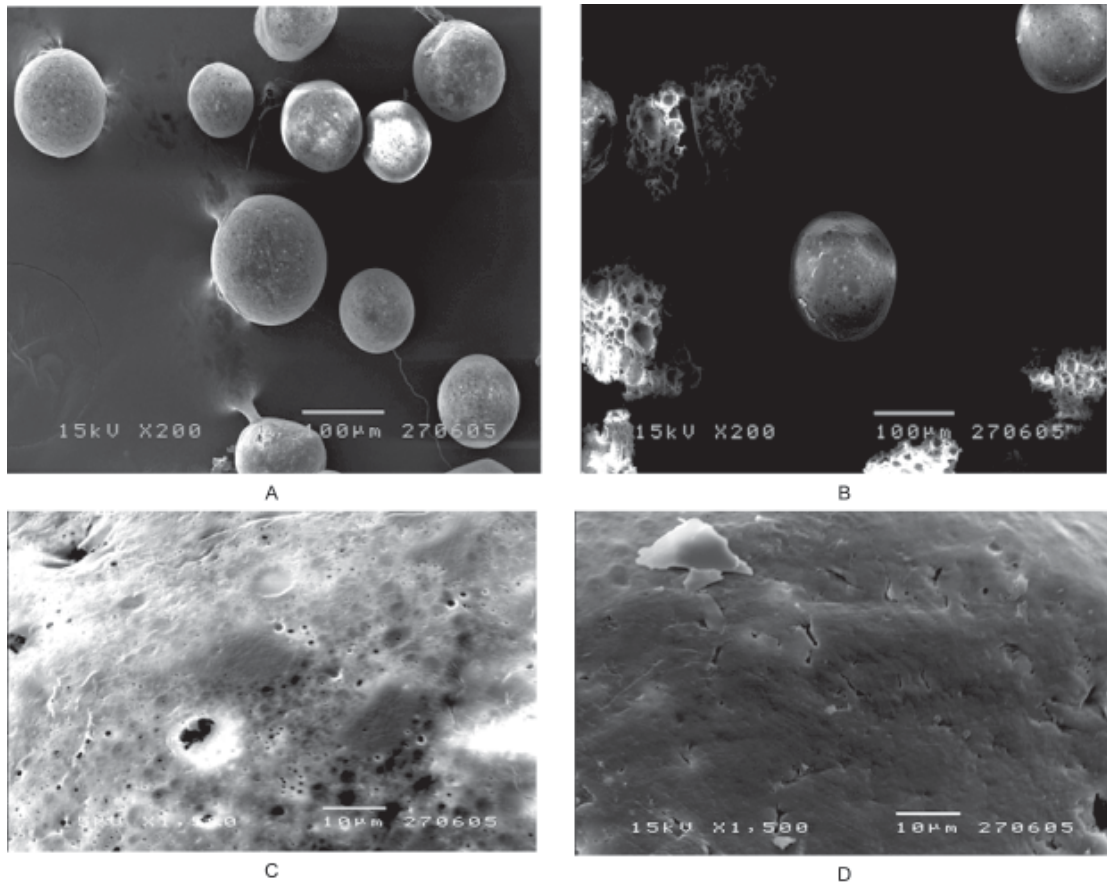
ซึ่ง INH microspheres 165 mg (n=3), RIF microspheres 70 mg (n=3) และส่วนผสมของ INH microspheres 165 mg กับ RIF microspheres 70 mg (n=3) ใส่ในขวดขนาด 30 mL ที่มีฝาปิดสนิท สารละลายที่ใช้ศึกษาการปลดปล่อยตัวยาคือ 0.1 N HCl และ phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 15 mL ทำการศึกษาใน horizontal shaker อุณหภูมิ 37°C ความเร็ว 77 rpm เก็บส่วนละลายใส่ที่เวลา 15 นาที 30 นาที และ 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยดูดเอาสารละลายใส่มา 5 mL แล้วชดเชยสารละลายใหม่ที่มีปริมาตรเท่าเดิม ใส่คืนลงไป จากนั้นนำสารละลายใส่ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Chidambaram and Burgess, 1999)

ผลการศึกษาวิจัยและอภิปรายผล

1. ผลของกระบวนการผลิตและสัดส่วนของตัวทำละลายต่อการเตรียม INH microspheres

การเตรียมโดยวิธี o/w emulsion และ w/o/w emulsion solvent diffusion evaporation อนุภาคส่วนใหญ่มีขนาดมากกว่า 180 µm การเตรียมโดยวิธี o/w emulsion solvent diffusion evaporation อนุภาคที่ได้จะมีลักษณะกลม มีขนาดเล็ก ไม่มีการแตกของอนุภาค w/o/w emulsion solvent diffusion evaporation มีลักษณะกลม ขนาดใหญ่กว่า มีการแตกของอนุภาคเล็กน้อย ผลต่อ % yield และ % entrapment efficacy ที่ได้มีค่าเท่ากับ 40.00 และ 13.90 ตามลำดับ เนื่องจากจากขั้นตอนในการฉีดวัดภาคภายในลงในวัดภาคภายนอกนั้น INH ไม่ละลายในสารละลายพอลิเมอร์ เป็นผลให้ INH ตกค้างอยู่ในกระบอกฉีดยา ทำให้เกิดการสูญเสียในขั้นตอนนี้ในปริมาณมาก และจากภาพถ่าย SEM เพื่อดูลักษณะพื้นผิวพบว่า การเตรียมโดย o/w emulsion solvent diffusion evaporation ผิวของไมโครสเฟียร์จะมีรูพรุนเกิดขึ้นค่อนข้างมากกว่าการเตรียมด้วยวิธี w/o/w emulsion solvent diffusion evaporation ดังแสดงในรูปที่ 1

การเตรียมโดยวิธี w/o/w emulsion solvent diffusion evaporation ที่ใช้สัดส่วนของตัวทำละลายต่างๆ กันของ DCM และ purified water ซึ่งจะช่วยละลาย INH ขนาดอนุภาคที่ได้มีลักษณะเหมือนกัน คือกลม มีการแตกของอนุภาคเล็กน้อย ส่วน % yield และ % entrapment efficacy พบว่า ตำรับที่ 2 (สัดส่วน 300 mg: 1 ml ของ INH: purified water) จะมี %yield น้อยที่สุด คือ 45 แต่มี % entrapment efficacy มากที่สุดคือ 23.56 เนื่องจากสัดส่วนตำรับที่ 2 INH จะมีการละลายเพียงบางส่วนทำให้ INH สูญเสียไป ในขั้นตอนการฉีดวัดภาคภายในลงในวัดภาคภายนอกน้อยกว่าตำรับ o/w emulsion solvent diffusion evaporation และการสูญเสียของ INH ออกไปสู่วัดภาคภายนอกน้อยกว่าตำรับ w/o/w emulsion solvent diffusion evaporation ที่มีสัดส่วน ตำรับที่ 3 (สัดส่วน 300 mg: 1.5 mL ของ INH: purified water) และ ตำรับที่ 4 (สัดส่วน 300 mg: 2 mL ของ INH: purified water)



รูปที่ 1 ลักษณะ isoniazid microspheres จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
 A: เตรียมโดยวิธี o/w emulsion solvent evaporation กำลังขยาย 200 เท่า
 B: เตรียมโดยวิธี w/o/w emulsion solvent diffusion evaporation กำลังขยาย 200 เท่า
 C: เตรียมโดยวิธี o/w emulsion solvent evaporation กำลังขยาย 1500 เท่า
 D: เตรียมโดยวิธี w/o/w emulsion solvent diffusion evaporation กำลังขยาย 1500 เท่า

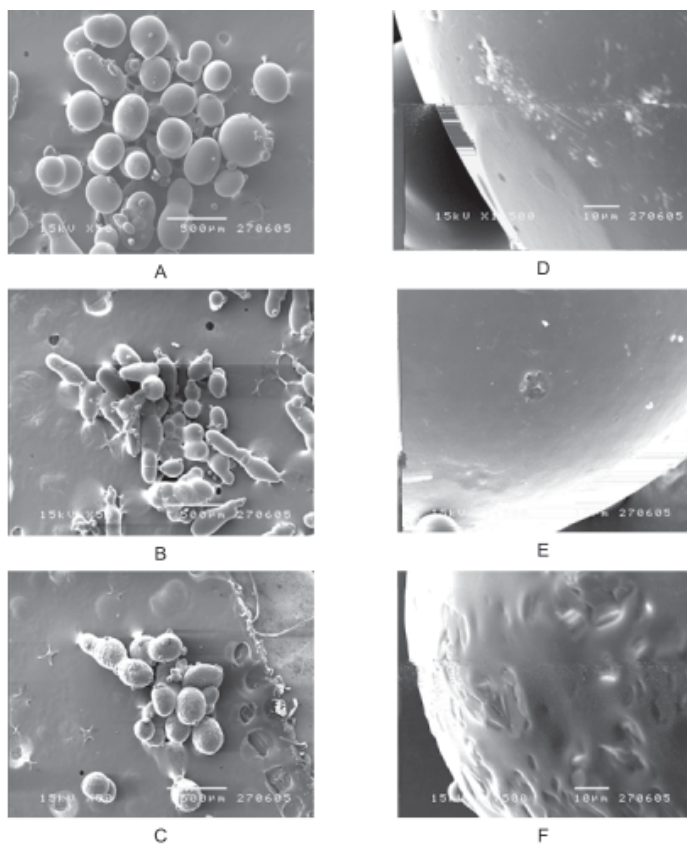
2. ลักษณะของ RIF microspheres

รูปร่างและลักษณะของไมโครสเฟียร์ที่เตรียมด้วยปริมาณ RIF ที่แตกต่างกันคือ 50, 100 และ 150 mg ศึกษาได้จากการใช้กล้องจุลทรรศน์ และ scanning electron microscope ได้ผลดังรูปที่ 2 จากการทดลองพบว่า การเตรียมโดยผสมยา 50 และ 150 mg ลงไปในตำรับ ทำให้ได้อนุภาคที่ค่อนข้างกลม ส่วนตำรับที่ผสมยา 100 mg จะได้อนุภาคที่ไม่กลมและเกิดเป็นลักษณะของไมโครสเฟียร์ที่แยกกันไม่สมบูรณ์ แต่ในตำรับที่ผสมยา 150 mg จะมีลักษณะพื้นผิวที่ไม่ค่อยเรียบ เนื่องจากมีปริมาณยาที่ผสมมากจึงทำให้พอลิเมอร์ไม่สามารถหุ้มยาได้ทั้งหมด

3. การศึกษาความคงตัวและอันตรกิริยาด้วย Differential scanning calorimetry (DSC)

3.1 การศึกษาลักษณะทางเคมีและกายภาพของ INH microspheres

เมื่อนำผงยา INH ผง EC ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ มาศึกษา ลักษณะทางเคมีและกายภาพ โดยดูจาก DSC thermogram ทำให้เห็นว่า INH มีลักษณะเป็น crystalline form มีจุดหลอมเหลวอยู่ประมาณ 180°C ดังปรากฏเป็นลักษณะ endo peak ในเทอร์โมแกรม ส่วน EC จัดเป็น amorphous polymer ลักษณะ thermogram จึงไม่ปรากฏพีคใด เมื่อนำผงยา INH และผง EC ผสมรวมกันในโกร่ง แล้วนำมาศึกษา พบว่ายังคงพบคุณสมบัติของ INH โดยยังคง



รูปที่ 2 ลักษณะ rifampicin microspheres จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

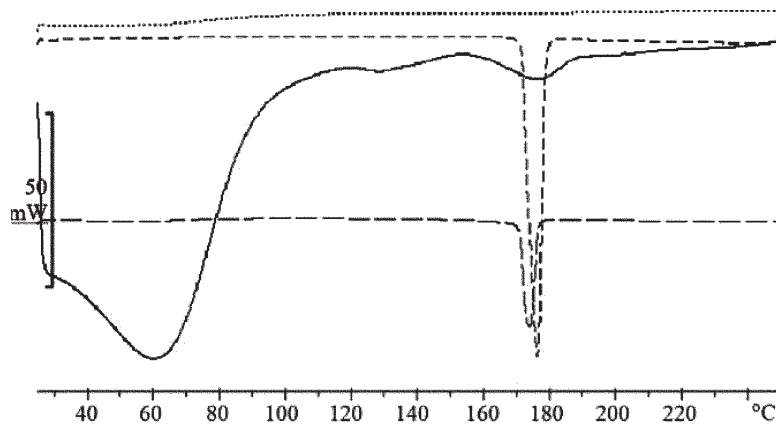
- A: Drug loading = 50 mg กำลังขยาย 50 เท่า
 B: Drug loading = 100 mg กำลังขยาย 50 เท่า
 C: Drug loading = 150 mg กำลังขยาย 50 เท่า
 D: Drug loading = 50 mg กำลังขยาย 1500 เท่า
 E: Drug loading = 100 mg กำลังขยาย 1500 เท่า
 F: Drug loading = 150 mg กำลังขยาย 1500 เท่า

ปรากฏเห็นลักษณะ endo peak แต่มีการเลื่อนเล็กน้อย โดยจุดหลอมเหลวเลื่อนมาที่ประมาณ 175°C (Rastogi et al., 2007) แต่เมื่อนำ INH microsphere มาศึกษา ลักษณะ พบว่าลักษณะความเป็น crystalline form ของ INH หายไป กลายเป็นลักษณะของ amorphous form แทน แสดงว่าเมื่อนำมาเตรียมในรูปไมโครสเฟียร์แล้ว INH มีคุณสมบัติที่เปลี่ยนไป ดังแสดงในรูปที่ 3

3.2 การศึกษาลักษณะทางเคมีและกายภาพของ RIF microspheres

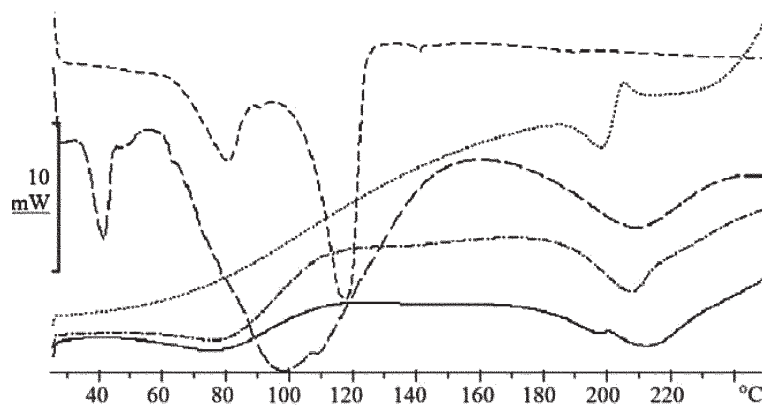
เมื่อนำผงยา RIF และผง Eudragit® L100-55 ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ มาศึกษาลักษณะทางเคมีและกายภาพ

โดยดูจาก DSC thermogram ทำให้เห็นว่า RIF มีลักษณะเป็น crystalline form มีจุดหลอมเหลวอยู่ประมาณ 200°C ดังปรากฏเห็น เป็นลักษณะ endo peak ใน thermogram ส่วน Eudragit® L100-55 ปรากฏลักษณะ endo peak ที่ ประมาณ 210°C แสดงว่ามีลักษณะเป็น crystalline form เหมือน RIF เมื่อนำผงยา RIF และผง Eudragit® L100-55 ผสมรวมกันในโกร่ง แล้วนำมาศึกษา พบว่า ยังคงพบคุณสมบัติของ RIF และ Eudragit® L100-55 โดยยังคงปรากฏเห็นลักษณะ endo peak แต่มีการเลื่อนเล็กน้อย แต่เมื่อนำ RIF microspheres มาศึกษา พบว่า ลักษณะความเป็น crystalline form ของ RIF หายไป



รูปที่ 3 DSC Thermogram แสดงส่วนประกอบ isoniazid microspheres

- (.....) Ethylcellulose
- (- - - -) Isoniazid
- (- . - .) Physical mixture (Isoniazid+ Ethylcellulose)
- (———) Isoniazid microspheres



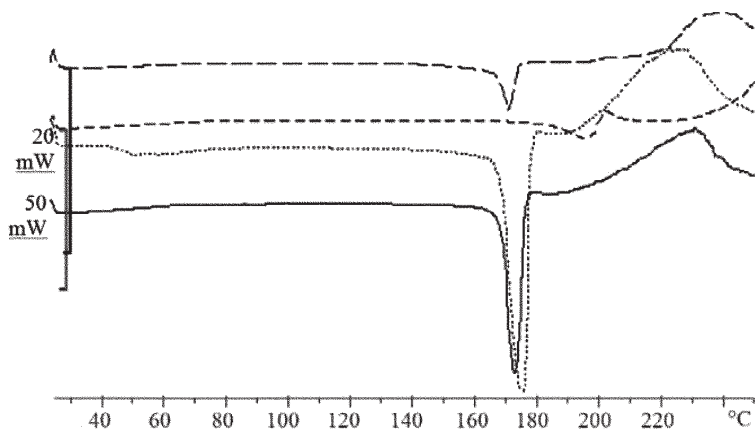
รูปที่ 4 DSC Thermogram แสดงส่วนประกอบ rifampicin microspheres

- (.....) Eudragit® L100-55
- (- - - -) Rifampicin
- (———) Physical mixture (Rifampicin + Eudragit® L100-55)
- (- - - -) Rifampicin microspheres
- (- - - -) Magnesium stearate

แต่ยังมีลักษณะของ Eudragit® L100-55 แสดงว่าเมื่อนำมาเตรียมในรูปไมโครสเฟียร์แล้ว RIF มีคุณสมบัติที่เปลี่ยนไป นอกจากนี้ยังพบว่าช่วง 40°C และ 100°C ปรากฏลักษณะ endo peak ซึ่งเป็นของแมกนีเซียมสเตียเรต ซึ่งเป็น stabilizer ในตำรับ ดังแสดงในรูปที่ 4

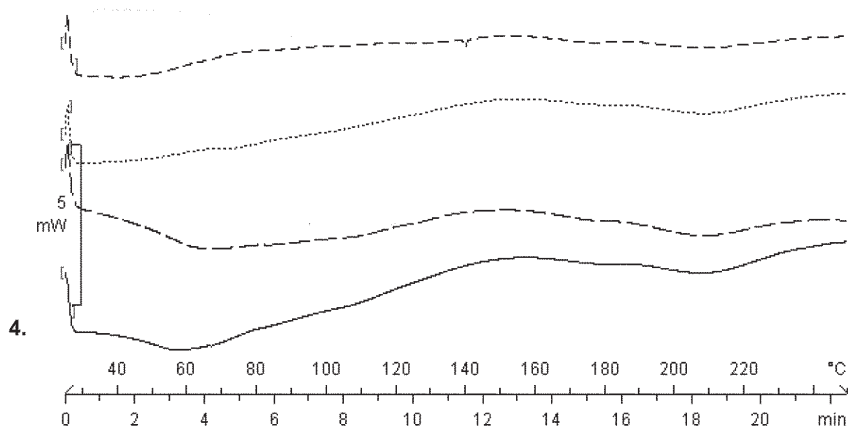
3.3 การศึกษาความคงตัวและอันตรกิริยาระหว่างผงยา INH และ RIF

เมื่อนำผงยา INH และ RIF มาศึกษาลักษณะโดยดูจาก DSC thermogram ทำให้เห็นว่า INH มีลักษณะเป็น crystalline form มีจุดหลอมเหลวอยู่ประมาณ 180°C ส่วน RIF มีจุดหลอมเหลวอยู่ประมาณ 200°C ดังปรากฏ



รูปที่ 5 DSC Thermogram แสดงความคงตัวของ isoniazid และ rifampicin powder เมื่อเก็บไว้ที่สภาวะต่าง ๆ

- (—) เก็บไว้ 0 วัน ที่อุณหภูมิ 25°C
 (.....) เก็บไว้ นาน 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25°C
 (----) เก็บไว้ นาน 14 วัน ที่อุณหภูมิ 37°C
 (- - -) เก็บไว้ นาน 14 วัน ที่อุณหภูมิ 50°C



รูปที่ 6 DSC Thermogram แสดงความคงตัวของ isoniazid และ rifampicin microspheres เมื่อเก็บไว้ที่สภาวะต่าง ๆ

- (—) เก็บไว้ 0 วัน ที่อุณหภูมิ 25°C
 (----) เก็บไว้ นาน 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25°C
 (.....) เก็บไว้ นาน 14 วัน ที่อุณหภูมิ 37°C
 (- - -) เก็บไว้ นาน 14 วัน ที่อุณหภูมิ 50°C

เห็นเป็นลักษณะ endo peak ใน thermogram ดังแสดงในรูปที่ 5

เมื่อศึกษาความคงตัวของผงยา INH และ RIF เริ่มจากวันแรก นับเป็นวันที่ 0 ที่อุณหภูมิ 25°C จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 50°C แล้วดูผลความคงตัวอีกครั้งในวันที่ 14 พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปความคงตัวของ

ผงยาทั้งสองมีการเปลี่ยนแปลง และในอุณหภูมิต่างที่สูงขึ้นจะเห็นการเปลี่ยนแปลงมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 5

3.4 การศึกษาความคงตัวและอันตรกิริยาระหว่าง

INH microspheres และ RIF microspheres

เมื่อนำ INH microspheres และ RIF microspheres มาศึกษาลักษณะโดยดูจาก DSC thermogram พบว่า

INH microspheres และ RIF microspheres มีลักษณะดังรูปที่ 6

เมื่อศึกษาความคงตัวของผงยา INH microspheres และ RIF microspheres เริ่มจากวันแรก นับเป็นวันที่ 0 ที่อุณหภูมิ 25°C จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 50°C แล้วดูผลความคงตัวอีกครั้งในวันที่ 14 พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปอุณหภูมิต่างๆ ความคงตัวของยาทั้งสองในรูปแบบไมโครสเฟียร์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งคงตัวคล้ายคลึงกับการเก็บกัก INH ใน poly (methacrylic acid-g-ethylene glycol) {P(MAA-g-EG)} (Sipahigil et al., 2006) ดังแสดงในรูปที่ 6

4. การปลดปล่อยตัวยาแบบนอกร่าง (In vitro drug release)

4.1 การปลดปล่อยตัวยา INH ใน 0.1 N HCl และ phosphate buffer pH 6.8

4.1.1 การปลดปล่อยตัวยา INH จากผงยา INH

การปลดปล่อยตัวยา INH จากผงยา พบว่าจะมีการปลดปล่อยอย่างรวดเร็วและตัวยาจะถูกปลดปล่อยจนครบ 100% ภายใน 1 ชั่วโมง เนื่องจาก INH จัดอยู่ใน class I biopharmaceutical classification system (highly soluble/highly permeable) (Kasim et al., 2004) ดังแสดงในรูปที่ 7

4.1.2 การปลดปล่อยตัวยา INH จาก INH microspheres

จากการศึกษาพบว่า INH microspheres จะปลดปล่อยตัวยาออกมาใน phosphate buffer pH 6.8 ได้ดีกว่า 0.1 N HCl ซึ่งให้ผลคล้ายคลึงกับการปลดปล่อย INH ออกจาก alginate microparticles (Rastogi et al., 2007) ดังแสดงในรูปที่ 7 เนื่องจากการศึกษาการละลายของตัวยา INH พบว่า INH สามารถละลายใน phosphate buffer pH 6.8 ได้ดีกว่า 0.1 N HCl เมื่อผ่านไป 72 ชั่วโมง INH microspheres จะปลดปล่อยตัวยาออกมาใน phosphate buffer pH 6.8 และ 0.1 N HCl เท่ากับ 24.65 และ 2.41% ตามลำดับ หลังจากนำส่วนของ INH microspheres ที่ยังคงเหลือใน phosphate buffer pH 6.8 และ 0.1 N HCl มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยา INH พบว่ามีปริมาณตัวยา INH ที่เหลือใน phosphate buffer pH 6.8 และ 0.1 N HCl เท่ากับ 62.75 และ

81.96% ตามลำดับ

จากการศึกษาเปรียบเทียบการปลดปล่อย INH microspheres กับผงยา INH พบว่าเมื่อเตรียมยา INH ในรูปแบบ microspheres โดยใช้ Ethylcellulose เป็นพอลิเมอร์จะมีการปลดปล่อยยาด้วยอัตราเร็วที่ช้าลงมาก (Dutt and Khuller, 2001) คล้ายคลึงกับการปลดปล่อย INH ออกจาก liposome และ poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLG) (Dutt and Khuller, 2001) โดยพบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมงมีปริมาณตัวยาที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน phosphate buffer pH 6.8 และ 0.1 N HCl เท่ากับ 24.65 และ 2.41 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 7

4.2 การปลดปล่อยตัวยา RIF ใน 0.1 N HCl และ phosphate buffer pH 6.8

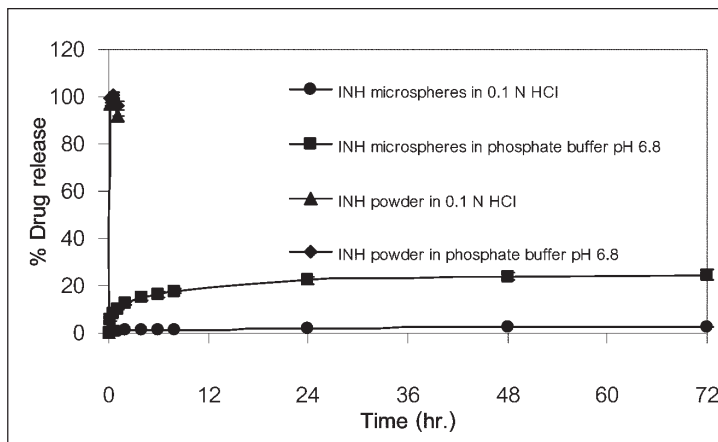
4.2.1 การปลดปล่อยตัวยา RIF จากผงยา RIF

การปลดปล่อยตัวยา RIF จากผงยา พบว่าจะมีการปลดปล่อยใน 0.1 N HCl อย่างรวดเร็วและตัวยาจะถูกปลดปล่อยจนครบ 100% ภายใน 1 ชั่วโมง ส่วนการปลดปล่อยใน phosphate buffer pH 6.8 จะถูกปลดปล่อยออกมาได้ช้ากว่าและจะถูกปลดปล่อยจนหมดภายใน 2 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งจากการศึกษาการละลายของตัวยา RIF พบว่า RIF สามารถละลายใน 0.1 N HCl ได้ดีกว่า phosphate buffer pH 6.8 เนื่องจาก RIF มีค่าการละลายที่ขึ้นอยู่กับ pH (Mehta et al., 2007)

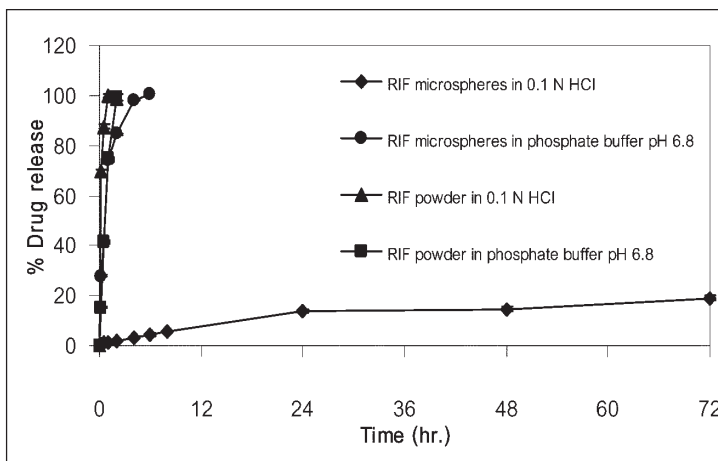
4.2.2 การปลดปล่อยตัวยา RIF จาก RIF microspheres

จากการศึกษาพบว่า RIF microspheres จะปลดปล่อยตัวยาออกมาใน phosphate buffer pH 6.8 ได้ดีกว่า 0.1 N HCl ดังแสดงในรูปที่ 8 เนื่องมาจากพอลิเมอร์ที่ใช้ในการห่อหุ้มตัวยา RIF คือ Eudragit® L100-55 จะละลายได้ดีเฉพาะสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดและด่างมากกว่าหรือเท่ากับ 5.5 เท่านั้น ดังนั้นจึงเป็นผลให้ RIF microspheres ปลดปล่อยตัวยาออกมาใน phosphate buffer pH 6.8 ได้ดีกว่า 0.1 N HCl คล้ายคลึงกับการปลดปล่อย RIF ออกจาก Acrylic acid resin II ซึ่งเป็น enteric polymer เช่นเดียวกัน (Yang et al., 2005)

เมื่อผ่านไป 72 ชั่วโมง RIF microspheres จะปลดปล่อยตัวยาออกมาใน 0.1 N HCl เท่ากับ 18.02%



รูปที่ 7 แสดงการปลดปล่อยด้วยยา Isoniazid จาก Isoniazid microspheres และ Isoniazid powder ใน 0.1 N HCl และ phosphate buffer pH 6.8



รูปที่ 8 แสดงการปลดปล่อยด้วยยา Rifampicin จาก Rifampicin microspheres และ Rifampicin powder ใน 0.1 N HCl และ phosphate buffer pH 6.8

หลังจากนำส่วนของ RIF microspheres ที่ยังคงเหลือใน 0.1 N HCl มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยยา RIF พบว่ามีปริมาณด้วยยา RIF ที่เหลือใน 0.1 N HCl เท่ากับ 80.90% ส่วน RIF microspheres จะปลดปล่อยด้วยยาออกมาใน phosphate buffer pH 6.8 ได้หมดภายในเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่ง RIF ต้องใช้เวลานานในการปลดปล่อยด้วยยาออกมาหมด (Dutt and Khuller, 2001; Ito and Makino, 2004; Mehta et al., 2007)

จากการศึกษาเปรียบเทียบการปลดปล่อย RIF microspheres กับผงยา RIF พบว่าเมื่อเตรียมยา RIF ในรูปแบบ microspheres โดยใช้ Eudragit® L100-55

จะมีการปลดปล่อยใน 0.1 N HCl ลดลง เนื่องจาก Eudragit® L100-55 ละลายได้น้อยใน pH ต่ำนั่นเอง ดังแสดงในรูปที่ 8

สรุป

การเตรียมยาสูตรผสมของ INH และ RIF ในรูปแบบไมโครสเฟียร์มีศักยภาพในการเพิ่มความคงตัวของด้วยยาโรแฟมพิซินจากการดื้อในทางเดินอาหารและความเป็นกรดของด้วยยา INH ได้ ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพื่อปรับให้ได้ขนาดยาที่ใช้ในการรักษาจริง และมีการทดสอบทางคลินิกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่สนับสนุนทุนบางส่วนในการดำเนินงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย กนกวรรณ ศิริรัตนพันธ์ กรรณิการ์ ม่วงกลาง และสมพล ผิวอ่อน

เอกสารอ้างอิง

- Chidambaram N, Burgess DJ. A novel in vitro release method for submicron sized dispersed systems. *AAPS PharmSci* 1999; 1: p.1–9.
- Donald PR, Diacon AH. The early bactericidal activity of anti-tuberculosis drugs: a literature review. *Tuberculosis* 2008; 88: S75–S83.
- Dutt M, Khuller GK. Liposomes and PLG microparticles as sustained release antitubercular drug carriers—an in vitro–in vivo study. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18: p.245–252.
- Dutt M, Khuller GK. Sustained release of isoniazid from a single injectable dose of poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles as a therapeutic approach towards tuberculosis. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17: p.115–122.
- Fixed-dose combinations for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. [Online]. [cited 2008 Oct 1]. Available from <http://www.who.int/medicinedocs/pdf/s6172e/s6172e.pdf>.
- Ito F, Makino K. Preparation and properties of monodispersed rifampicin-loaded poly (lactide-co-glycolide) microspheres. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2004; 39: p.17–21.
- Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, et al. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharm* 2004; 1: p.85–96.
- Mehta SK, Kaur G, Bhasin KK. Analysis of Tween based microemulsion in the presence of TB drug rifampicin *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007; 60: p.95–104.
- Ofoefule SI, Obodo CE, Orisakwe OE, et al. Salivary and Urinary Excretion and Plasma-Saliva Concentration Ratios of Isoniazid in the Presence of Co-administered Ciprofloxacin. *Am J Ther* 2002; 9: p.15–18.
- Rastogi R, Sultana Y, Aqil M, et al. Alginate microspheres of isoniazid for oral sustained drug delivery. *Int J Pharm* 2007; 334: p.71–77.
- Sipahigil O, Gürsoy A, Çakalagaoglu F, et al. Release behaviour and biocompatibility of drug-loaded pH sensitive particles. *Int J Pharm* 2006; 311: p.130–138.
- Sriwongjanya M, Bodmeier R. Entrapment of drug-loaded ion-exchange particles within polymeric microparticles. *Int J Pharm* 1997; 158: p.29–38.
- Varshosaz J, Tabbakhian M, Zahrooni M. Development and characterization of floating microballoons for oral delivery of cinnarizine by a factorial design. *J Microencapsul* 2007; 24: p.253–262.
- Yang JF, Qiu LY, Jin Y, et al. Thymosin-loaded enteric microspheres for oral administration: Preparation and in vitro release studies. *Int J Pharm* 2005; 301: p.41–47.
- Yeh MK, Coombes AGA, Jenkins PG, et al. A novel emulsification-solvent extraction technique for production of protein loaded biodegradable microparticles for vaccine and drug delivery. *J Control Release* 1995; 33: p.437–445.
- Zhou H, Zhang Y, Biggs DL. Microparticle-based lung delivery of INH decreases INH metabolism and targets alveolar macrophages. *J Control Release* 2005; 107: p.288–299.