

บทที่ 2

การทดลอง

สารเคมี

1. กรดแกลเซียลแอซิก (glacial acetic acid lot no. 7304420 M, BHD Laboratory Supplies, England)
2. กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid K 28118131031, Merck[®], Germany)
3. กรดโมโนคลอโรแอซิก (monochloroacetic acid lot no.129H0095, Sigma[®], Germany)
4. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid fuming 37 % GR 445 K 5004417, Merck[®] Germany)
5. คลอโรฟอร์ม (chloroform lot no. K 26895741941, BHD Laboratory Supplies, England)
6. คาร์ลฟิชเชอร์รีเอเจนท์ (karl fischer single component reagent, with pyridine OB040535, Merck[®], Germany)
7. ซิลเวอร์ไนเตรต (0.1 N silver nitrate TS)
8. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride QC 000942, บริษัทวิทยาศาสตร์จำกัด กรุงเทพฯ)
9. โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate anhydrous lot no. 31432, Riedel - de Haen ag seelze - hannover, Germany)
10. โซเดียมทาร์เตตไดไฮเดรต (sodium tartate dihydrate lot no. 807123, J.P. Baker)
11. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide lot no. 3722 - 05, Baker analyzed[®], Sweden)
12. แป้งข้าวเจ้าตราช้างสามเศียร (ผลิตโดยบริษัทโรงหมี่ขอแสงจำกัด กรุงเทพฯ)
13. แป้งข้าวเหนียวตราช้างสามเศียร (ผลิตโดยโรงหมี่ขอแสงจำกัด กรุงเทพฯ)
14. แป้งมันสำปะหลังตรายูโร (ผลิตโดย ห.จ.ก. ไทยเจริญผลจำกัด กรุงเทพฯ)

15. โปตัสเซียมไบฟทาเลต (potassium biphthalate 7515090250116, Darmstadt, Merck[®], Germany)
16. ฟีนอล์ฟทาเลอิน (phenolphthalein TS, 1 % w/v in methanol)
17. มอลโตเดกซ์ทริน (maltodextrin, ห.จ.ก. โอ.วี. เคมิคัล แอนด์ ซัพพลาย เชียงใหม่)
18. เมทานอล (methanol AR batch no. 2K 05 0122, Lab - scan[®], Ireland)
19. เมทิล เรด (methyl red TS, 0.1 % w/v in methanol)
20. เอทานอล (ethanol 99.7 - 100 % v/v EC label EC no. 200 - 578 - 6, Analar prod. 101077 y 2.5 L)
21. เอ็ม-ครีซอลเพรอปเพิล (m - cresol purple TS, 0.1 % w/v)
22. แอนไฮดรัสโซเดียมคาร์บอเนต (anhydrous sodium carbonate AR lot no. 31432, Riedel - de - Haen AG)
23. โอฟลอกซาซิน (ofloxacin lot no. 58H0572, Sigma[®], Germany)
24. ไอโซโพรพานอล (isopropanol AR batch no. 97 120046, Lab - scan[®], Ireland)

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องคาร์ลฟิสเชอร์ไทตริน (karl fischer titrino 703 Ti stand, Switzerland)
2. เครื่องกรองสุญญากาศ (vacuum filter apparatus)
3. เครื่องคนแม่เหล็กควบคุมอุณหภูมิ (temperature - controlled magnetic stirrer)
4. เครื่องเคาะ (stamp volumeter, stav 2003, jolting volumeter)
5. เครื่องชั่งวิเคราะห์ (analytical balance, Sartorius[®], Scientific promotion Co.,Ltd., Model AC 210 S, S/N 31003430, Analytic AC 210 S)
6. เครื่องดิซโซลูชัน (dissolution apparatus, ValiData Hanson Research Chatsworth, USA, Model No. 47 - 200 - 02A)
7. เครื่องระเหยแห้งโรตารีสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator, N-N Series, Eyela, digital water bath SB - 651, Type A - 3S, Ser. no. 10009462, Japan)
8. เครื่องรีฟลักซ์ (reflux apparatus)
9. เครื่องร่อนพร้อมร่อนเบอร์ 80 และ 200 (sieving apparatus, Retsch Type AS 200 digit, sieve mesh no. 80, 200)

10. เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (differential scanning calorimeter, Mettler Toledo S R System)
11. เดสิคเคเตอร์ (desiccator)
12. ตู้อบ (hot air oven, Memmert, Germany)
13. เตาเผา (ignition furnace, Model DCM, Sybron / Thermolyne)
14. เครื่องพาวเดอร์เอ็กซ์เรย์ดิฟแฟรคโทมิเตอร์ (powder X - ray diffractometer, D 500 Siemens, Germany)
15. เครื่องยูวีวิสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV spectrophotometer, Milton roy spectronic 1001 plus spectrophotometer, USA)
16. เครื่องผสมสาร (vortex - genie 2[®], Science industries Inc., USA, Model G - 560E, Serial 2 - 65097)
17. เครื่องสแกนนิ่งอิเล็กตรอนไมโครสโคป (scanning electron microscope, JSM - 840A)
18. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมแป้งไซเตียมคาร์บอกซีเมทิล

เตรียมแป้งไซเตียมคาร์บอกซีเมทิลจากแป้ง 3 ชนิด ได้แก่ แป้งข้าวเจ้า (R) แป้งข้าวเหนียว (G) และแป้งมันสำปะหลัง (T) ตามวิธีของ Filbert [33] โดยการทำปฏิกิริยาคาร์บอกซีเมทิลเลชันกับกรดโมโนคลอโรแอซิกภายใต้สภาวะต่าง ดังวิธีต่อไปนี้

วิธีที่ 1 ใช้เมทานอลเป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยา

ผสม 100 % v/v เมทานอล 101.6 g กับกรดโมโนคลอโรแอซิก 11.04 g



ค่อย ๆ เติมแป้ง 43.6 g



เติม 50 % w/v สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 22 g



ให้ความร้อนที่ 60 °C 60 นาทีโดยการรีฟลักซ์ (reflux) จนอย่างสม่ำเสมอ



ทำให้เป็นกลางด้วยกรดเกลือแอสซีติกจนได้ pH ประมาณ 7



นำมารองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (whatman® no.1)



ล้างแป้งดัดแปรที่ได้ด้วย 80 % v/v สารละลายเมทานอล หลาย ๆ ครั้ง
จนโซเดียมคลอไรด์หมด (ทดสอบด้วย 0.1 N ซิลเวอร์ไนเตรต)



ล้างต่อด้วย 100 % เมทานอลเป็นครั้งสุดท้าย



อบแห้งที่ 50 °C 1 วัน



ผ่านแรงเบอร์ 80



ได้แป้งข้าวเหนียวดัดแปรที่ใช้เมทานอลเป็นตัวกลาง (MGS)

แป้งข้าวเจ้าดัดแปรที่ใช้เมทานอลเป็นตัวกลาง (MRS)

แป้งมันสำปะหลังดัดแปรที่ใช้เมทานอลเป็นตัวกลาง (MTS)

วิธีที่ 2 ใช้ไอโซโพรพานอลเป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยา

ผสม 100 % v/v ไอโซโพรพานอล 218.8 g กับกรดโมโนคลอโรแอซิก 14.8 g



ให้ความร้อนจนกระทั่งมีอุณหภูมิ 55 °C



ค่อย ๆ เติมน้ำ 57.8 g



เติมน้ำ 50 % w/v สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 29.8 g



ให้ความร้อนที่ 81 °C 30 นาที โดยการรีฟลักซ์ (reflux) จนอย่างสม่ำเสมอ



ทิ้งให้เย็นที่ 40 °C



ทำให้เป็นกลางด้วยกรดเกลือแอซิกจนได้ pH ประมาณ 7



นำมารองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (whatman® no.1)



ล้างแบ่งตัดแปรที่ได้ด้วย 80 % v/v สารละลายเมทานอลหลาย ๆ ครั้ง
จนโซเดียมคลอไรด์หมด (ทดสอบด้วย 0.1 N ซิลเวอร์ไนเตรต)



ล้างต่อด้วย 100 % v/v เมทานอลเป็นครั้งสุดท้าย



อบแห้งที่ 50 °C 1 วัน



ผ่านแรงเบอร์ 80



ได้แป้งข้าวเหนียวดัดแปรที่ใช้ไฮโดรฟอรานอลเป็นตัวกลาง (IGS)

แป้งข้าวเจ้าดัดแปรที่ใช้ไฮโดรฟอรานอลเป็นตัวกลาง (IRS)

แป้งมันสำปะหลังดัดแปรที่ใช้ไฮโดรฟอรานอลเป็นตัวกลาง (ITS)

2. การศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งโซเดียมคาร์บอกซีเมทิลที่เตรียมได้

2.1 ลักษณะทางกายภาพ (morphology)

ศึกษาลักษณะภายนอกของแป้งโซเดียมคาร์บอกซีเมทิลที่เตรียมได้ทั้ง 6 ชนิด คือ MGS, MRS, MTS, IGS, IRS และ ITS โดยการสังเกตด้วยตาเปล่าและใช้เครื่องสแกนนิ่งอิเล็กตรอนไมโครสโคป (scanning electron microscope, SEM) เพื่อดูลักษณะพื้นผิวอย่างละเอียดของเม็ดแป้ง สำหรับการเตรียมแป้งก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วย SEM นั้น ทำโดยการนำแป้งไปผ่านขบวนการทำให้แห้งโดยใช้ความเย็น (lyophilization) และเคลือบด้วยโลหะทองก่อนทำการวิเคราะห์

2.2 ระดับการแทนที่ (degree of substitution, DS)

การหา DS ของแป้งโซเดียมคาร์บอกซีเมทิล ใช้ตามวิธีการหา DS ของโครสคาร์เมลโลสโซเดียม (croscarmellose sodium) [86] ซึ่งประกอบด้วยการไตเตรตหาจำนวนมิลลิอิควิวาเลนต์ (milliequivalents) ของด่างที่ใช้ในการทำให้สารตัวอย่าง 1 g เป็นกลาง (M) และการหาเปอร์เซ็นต์เถ้าที่เหลือจากการเผา (C) ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

การไตเตรต

ชั่งสารตัวอย่าง 1.0000 g ใส่ในฟลากลแก้วรูปกรวยมีฝาปิด
(glass - stoppered conical flask) ขนาด 500 ml



เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำ (10 % w/w) 300 ml



เติม 0.1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ 25.0 ml



ปิดฝา เขย่าเป็นเวลา 5 นาที



เติมเอม - ครีซอลเพรอฟีล TS 5 หยด



เติม 0.1 N กรดไฮโดรคลอริกประมาณ 15 ml จากบิวเรต ปิดฝาเขย่าให้เข้ากัน



ถ้าสารละลายยังเป็นสีม่วงให้เติม 0.1 N กรดไฮโดรคลอริกอีกครั้งละ 1 ml
เขย่าทุกครั้งที่ได้เติม จนกระทั่งได้สารละลายเป็นสีเหลือง



ไตเตรตด้วย 0.1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ จนได้สารละลายสีม่วงที่จุดยุติ



คำนวณจำนวนมิลลิอิกิวาเลนต์ของโซเดียมไฮดรอกไซด์
ที่ใช้ในการทำให้สารตัวอย่าง 1 g เป็นกลาง (M)

การหาเถ้าที่เหลือจากการเผา

ชั่งสารตัวอย่าง 1.0000 g ใส่ในครุฑเบิล (crucible) ซึ่งผ่านการเผา
ทิ้งให้เย็นและชั่งจนน้ำหนักคงที่



เผาสารตัวอย่างให้เป็นสีดำทั่วทั้งหมด (charred) ทิ้งให้เย็น



เติมกรดซัลฟิวริก 1 ml



ให้ความร้อนจนกระทั่งควันขาวหมดไป



เผาที่ 800 °C 1 ชั่วโมง



ทิ้งให้เย็นในเดสิคเคเตอร์



ชั่งน้ำหนัก คำนวณเปอร์เซ็นต์เถ้าที่เหลือจากการเผา (C)

การคำนวณระดับการแทนที่

นำค่า M และ C ที่หาได้มาคำนวณระดับการแทนที่กรดของคาร์บอกซีเมทิล (degree of acid carboxymethyl substitution, A) และระดับการแทนที่โซเดียมของคาร์บอกซีเมทิล (degree of sodium carboxymethyl substitution, S) จากสูตรต่อไปนี้

$$A = 1150 M / (7102 - 412 M - 80 C)$$

$$S = (162 + 58 A) C / (7120 - 80 C)$$

จากนั้นนำค่า A และ S ที่ได้ มาคำนวณหา DS จากสูตร

$$DS = A + S$$

2.3 ปริมาณความชื้น (moisture content)

การหาปริมาณความชื้นของแป้งโซเดียมคาร์บอเนตเมทิลทำโดยการไตเตรตแป้งกับคาร์ลฟิชเชอร์รีเอเจนท์ (karl fischer reagent) โดยอาศัยหลักการที่น้ำจากแป้งซึ่งถูกสกัดด้วยเมทานอลจะเกิดปฏิกิริยากับคาร์ลฟิชเชอร์รีเอเจนท์ซึ่งประกอบด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์และไอโอดีนในสารละลายไพรีดีน การไตเตรตทำโดยการชั่งแป้ง 0.1000 กรัม ใส่ในเครื่องคาร์ลฟิชเชอร์ไดไตรโน ความเร็วที่ใช้ในการหมุนของเครื่องคนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และความเร็วในการไตเตรตเท่ากับ 6 ปรับมาตรฐาน (standardize) โดยใช้โซเดียมทาร์เตตไดไฮเดรต (sodium tartate dihydrate) ทุก 1 ชั่วโมงและทำให้เป็นกลางทุกครั้ง (neutralize) เมื่อมีการเปลี่ยนเมทานอล

2.4 ความเป็นผลึก (crystalline characteristic)

การศึกษาความเป็นผลึกของแป้งโซเดียมคาร์บอเนตเมทิลโดยใช้พาวเดอร์เอ็กซ์เรย์ดิฟแฟรกชัน (powder X - ray diffraction) ทำโดยการนำแป้งมาอัดลงสู่บ่อดูดด้วยแรงอัดที่พอดีให้แป้งเกาะติดบ่อดูดระหว่างการทำทดลองและทำให้ผิวหน้าของแป้งเรียบ จากนั้นจึงนำไปใส่ในเครื่องพาวเดอร์เอ็กซ์เรย์ดิฟแฟรกโทมิเตอร์ D 500 Siemens ซึ่งใช้กระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมป์ ความต่างศักย์ 20 กิโลโวลต์ ใช้อะตอมทองแดงเป็นเป้า (target) และกรองรังสีด้วยนิเกิล (Ni filter) เริ่มสแกน (scan) ตั้งแต่ 2θ เท่ากับ 10 ไปจนถึง 60 องศา โดยใช้อัตราเร็ว 5 องศาต่อนาที

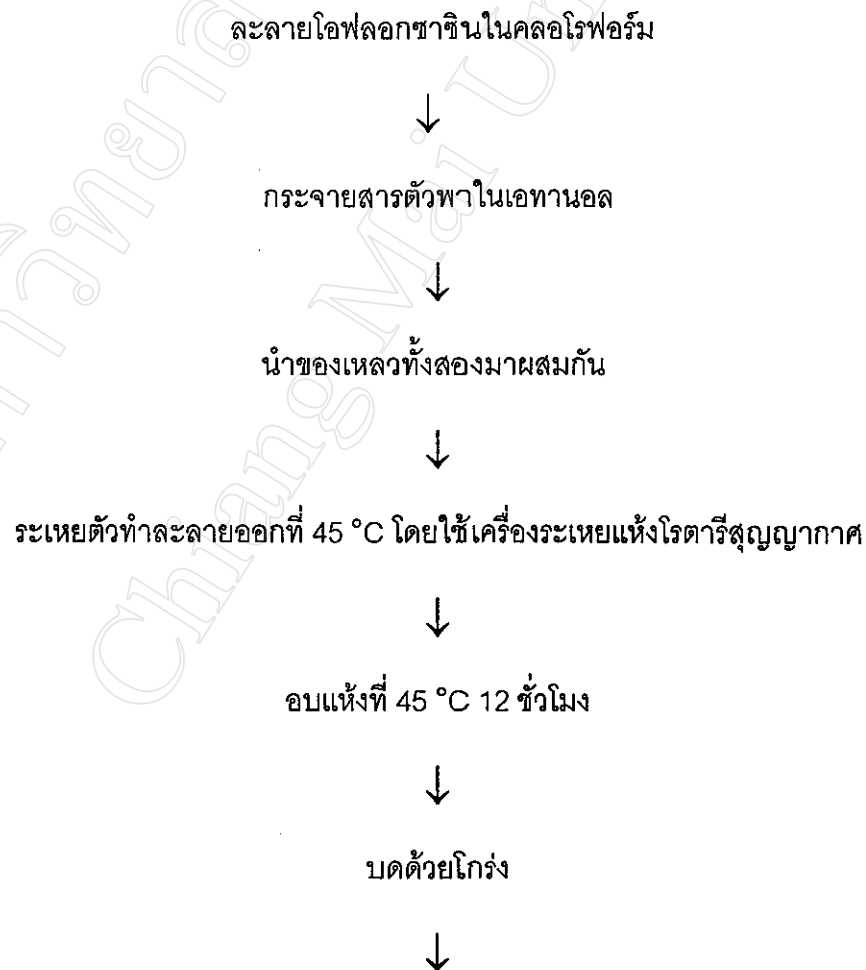
2.5 พฤติกรรมเมื่อได้รับความร้อน (thermal behavior)

การศึกษาพฤติกรรมเมื่อได้รับความร้อนของแป้งโซเดียมคาร์บอเนตเมทิลโดยใช้วิธีดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริเมตรี ทำโดยการชั่งแป้งโซเดียมคาร์บอเนตเมทิลให้ทราบปริมาณที่แน่นอนในช่วง 3 - 5 มิลลิกรัมบรรจุลงในอะลูมิเนียมแพน (DSC aluminium pan) จากนั้นนำไป

ใส่ในเครื่องดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ (differential scanning calorimeter) เพื่อวัดปริมาณพลังงานหรือความร้อนที่สารตัวอย่างดูดหรือคายออกมา สภาพะที่ใช้ในการวิเคราะห์จะเริ่มให้ความร้อนตั้งแต่อุณหภูมิ 50°C ไปจนถึง 300°C อัตราเร็วในการเพิ่มความร้อนเท่ากับ 10°C ต่อนาที ภายใต้ก๊าซไนโตรเจนที่มีอัตราการไหล 20 มิลลิลิตรต่อนาที

3. การเตรียมโอฟลอกซาซินโซลิดิสเพอร์ชัน

นำแป้งโซเดียมคาร์บอกซีเมทิลที่เตรียมได้ทั้ง 6 ชนิด และมอลโตเดกซ์ทรินมาใช้เป็นสารตัวพาในการเตรียมโอฟลอกซาซินโซลิดิสเพอร์ชัน โดยเตรียมที่อัตราส่วนของตัวยาต่อสารตัวพาต่างๆ กัน คือ $1:9$, $3:7$, และ $1:1$ โดยน้ำหนัก ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมดังต่อไปนี้



ผ่านแรงเบอร์ 80 / 200



ได้อิฟลอกซาซินโซลิดิสเพอร์ชันที่อยู่บนแรงเบอร์ 200

4. การศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพของอิฟลอกซาซินโซลิดิสเพอร์ชันที่เตรียมได้

4.1 ลักษณะทางกายภาพ

ศึกษาลักษณะภายนอกของอิฟลอกซาซินโซลิดิสเพอร์ชันที่เตรียมได้ โดยการสังเกตด้วยตาเปล่าและใช้ SEM เพื่อดูลักษณะรูปร่างและขนาดของผลึกตัวยากับสารตัวพาในโซลิดิสเพอร์ชัน สำหรับการเตรียมอิฟลอกซาซินโซลิดิสเพอร์ชันก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วย SEM นั้น ทำโดยการนำอิฟลอกซาซินโซลิดิสเพอร์ชันไปผ่านขบวนการทำให้แห้งโดยใช้ความเย็น (lyophilization) และเคลือบด้วยโลหะทองก่อนทำการวิเคราะห์

4.2 ความเป็นผลึก

การศึกษาความเป็นผลึกของอิฟลอกซาซินในรูปโซลิดิสเพอร์ชันโดยใช้พาวเดอร์-เอ็กซ์เรย์ดิฟแฟรกชัน ทำโดยการนำอิฟลอกซาซินโซลิดิสเพอร์ชันมาอัดลงสู่เบ้าด้วยแรงอัดที่พอดีให้เกาะติดเบ้าไม่หลุดระหว่างการทดลองและทำให้ผิวหน้าเรียบ จากนั้นจึงนำไปใส่ในเครื่องพาวเดอร์เอ็กซ์เรย์ดิฟแฟรกโทมิเตอร์ D 500 Siemens ซึ่งใช้กระแสไฟฟ้า 10 มิลลิแอมป์ ความต่างศักย์ 20 กิโลโวลต์ ใช้อะตอมทองแดงเป็นเป้า (target) และกรองรังสีด้วยนิเกิล (Ni filter) เริ่มสแกน (scan) ตั้งแต่ 2 θ เท่ากับ 10 ไปจนถึง 60 องศา โดยใช้อัตราเร็ว 5 องศาต่อนาที

4.3 พฤติกรรมเมื่อได้รับความร้อน

การศึกษาพฤติกรรมเมื่อได้รับความร้อนโดยใช้ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริเมตรี ทำโดยการชั่งอิฟลอกซาซินโซลิดิสเพอร์ชันให้ทราบปริมาณที่แน่นอนในช่วง 3 - 5 มิลลิกรัม บรรจุลงในอะลูมิเนียมแพน จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์จะเริ่มให้ความร้อนตั้งแต่อุณหภูมิ 50°C ไปจนถึง 300 °C อัตราเร็ว

ในการเพิ่มความร้อนเท่ากับ $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ต่อนาที ภายใต้ก๊าซไนโตรเจนที่มีอัตราการไหล 20 มิลลิลิตร ต่อนาที

4.4 อัตราการละลายของตัวยาโอฟลอกซาซินจากโซลิดดิสเพอร์ชันที่เตรียมได้

การศึกษ้อัตราการละลายของตัวยาโอฟลอกซาซินจากโซลิดดิสเพอร์ชันที่เตรียมได้ ทำโดยการชั่งโอฟลอกซาซินโซลิดดิสเพอร์ชันที่อัตราส่วนของตัวยาต่อสารตัวพาต่างๆ คือ $1 : 9$, $3 : 7$, และ $1 : 1$ ให้ได้ปริมาณตัวยาเท่ากันคือ 100 มิลลิกรัม ใส่ลงในภาชนะ (vessel) ที่มีน้ำเป็นตัวกลาง (medium) ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิของน้ำที่ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ อัตราเร็วในการหมุนของใบพัด (paddle) เท่ากับ 100 รอบต่อนาที ทำการเก็บสารละลายตัวอย่างครั้งละ 5 มิลลิลิตร ในเวลาที่ $1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30$, และ 60 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องยูวีสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV spectrophotometer) เพื่อหาปริมาณตัวยาโอฟลอกซาซินเทียบกับกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาอัตราการละลายของตัวยาภายใน 5 นาทีแรก