

การศึกษาการละลายของยา orlistat  
เพื่อประเมินความเท่าเทียมกันของตำรับยา

นางสาว พิมพ์สมน เจียมบุญศรี  
นางสาว พิมพ์พิกา กาญจนดำเกิง

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

พ.ศ. 2549

The study of orlistat solubility as a marker for  
pharmaceutical equivalence evaluation

Miss Pimsumon jiamboonsri  
Miss Pimpikar Kanchanadumkerng

A SPECIALPROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR  
THE BACHELEOR DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY  
FACULTY OF PHARMACY  
MAHIDOL UNIVERSITY

โครงการพิเศษ

เรื่อง การศึกษาการละลายของยา orlistat  
เพื่อประเมินความเท่าเทียมกันของตำรับยา

.....  
(นางสาว พิมพ์สุมน เจริญบุญศรี)

.....  
(นางสาว พิมพ์พิกา กาญจนดำเกิง)

.....  
(รองศาสตราจารย์ กอบธัม สติรกุล)  
อาจารย์ที่ปรึกษา

## บทคัดย่อ

### การศึกษาการละลายของยา orlistat เพื่อประเมินความเท่าเทียมกันของตำรับยา

พิมพ์สุมน เจียมบุญศรี, พิมพ์กา กาญจนดำเกิง

อาจารย์ที่ปรึกษา: กอบรัมม์ สติกรกุล

ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

คำสำคัญ : การละลาย, Dissolution, ยา Orlistat

Orlistat เป็นยาที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ที่กระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก จึงนำมาใช้รักษาผู้ป่วยโรคอ้วน ซึ่งยา Orlistat เป็นยาที่มีการดูดซึมน้อยมาก (Bioavailability < 1%) และเป็นยาที่ละลายน้ำได้น้อยมากในช่วง pH ของร่างกาย โครงการพิเศษนี้จึงได้ทำการศึกษากการละลายของยา Orlistat เพื่อประเมินความเท่าเทียมกันของตำรับยาและใช้เป็นแนวทางในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการปลดปล่อยของยาที่เกิดขึ้นในร่างกายและที่เกิดขึ้นโดยการทดสอบภายนอกร่างกาย การทดสอบการละลายของยา Orlistat ในตัวทำละลายต่างๆ ซึ่งมีสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8) ซึ่งมีสารลดแรงตึงผิว โซเดียมลอริลซัลเฟต 1% , โซเดียมลอริลซัลเฟต 2% , ทวิน 20 1% และ ทวิน 20 2% พบว่า ยา Orlistat ละลายได้ดีที่สุดใน สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8) ซึ่งมีสารลดแรงตึงผิวโซเดียมลอริลซัลเฟต 2% จึงได้เลือกสารละลายนี้มาทำการทดสอบ Dissolution ของยา Orlistat สองตำรับ โดยใช้ USP dissolution apparatus I (basket) แล้ววัดปริมาณยาที่ละลายออกมาโดยวิธี HPLC ซึ่งใช้ Venusil™ AQ-C18 column ขนาด 150 mm x 4.6 mm i.d. มีขนาดอนุภาค 5 µm ที่อัตราเร็ว 1.5 ml/ min และใช้ UV detector ที่ 205 nm เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย acetonitrile และ 0.1% phosphoric acid ในอัตราส่วน 95 : 5 ปริมาตร/ปริมาตร ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 10 นาที และ Orlistat เคลื่อนที่ออกมาที่เวลาประมาณ 5 นาที และใช้ similarity factor ( $f_2$ ), difference factor ( $f_1$ ) ทดสอบความแตกต่าง พบว่าการละลายของยา Orlistat ทั้งสองตำรับ ไม่มีความแตกต่างกัน ( $f_1 = 8.59$  ,  $f_2 = 65.04$  ) จากผลการทดลองนี้แสดงว่า ยา Orlistat ต่างตำรับให้การละลายที่เหมือนกันในสารละลายโซเดียมลอริลซัลเฟต 2% ซึ่งเป็นสารละลายที่เหมาะสม เพื่อประเมินความเท่าเทียมกันของตำรับยาในหลอดทดลอง

## Abstract

### The study of orlistat solubility as a marker for pharmaceutical equivalence evaluation

Pimsumon jiamboonsri, Pimpikar Kanchanadumkerng

Project adviser: Korbtham Satirakul

Department of Pharmaceutical Technology ,Faculty of Pharmacy ,Mahidol University

Keyword: Solubility, Dissolution, Orlistat

Orlistat is a antiobesity agent which inhibits the action of gastrointestinal lipases. The drug is absorbed to a minimal extent, with oral bioavailability <1% and it is a lipophilic substance with very low solubility in water within the physiological pH range. The objective of this special project was to study of orlistat solubility as a marker for pharmaceutical equivalence evaluation and using as the protocol for studying in vitro in vivo corelationships (IVIVCs). In the solubility experiment ,surfactant were added in phosphate buffer (1%SLS, 2%SLS, 1%Tween20 , 2%Tween20 ). Orlistat can be dissolved in 2%SLS more than others hence it was used as the medium in dissolution test . The USP dissolution apparatus I (basket) with HPLC method was used for obtaining dissolution profile. An isocratic separation was achieved using a Venusil™AQ-C18 ,150 mm x 4.6 mm i.d., 5µm particle size column with flow rate of 1.5 ml/min and using a UV detector to monitor the eluate at 205 nm. The mobile phase consisted of acetonitrile:0.1% phosphoric acid (95:5 ,v/v).Complete separation was achieved in run time of approximately 10 min with the drug eluting at approximately 5 min. The similarity factor ( $f_2$ ) and difference factor ( $f_1$ ) were used to test for similarity. The dissolution profile showed the similarity of two formulation of Orlistat ( $f_1 = 8.59$  ,  $f_2 = 65.04$  ). From this experiment , the 2%SLS in phosphate buffer (pH 6.8) was suitable medium of dissolution test for pharmaceutical equivalence evaluation.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงตามความมุ่งหมายได้ด้วยความช่วยเหลือจาก รองศาสตราจารย์กอบธัม สติรกุล ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งได้ให้คำแนะนำในการค้นคว้าข้อมูล การดำเนินงานตลอดการวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างกรวิจัย นอกจากนี้ยังได้รับการอำนวยความสะดวกในด้านการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่จำเป็นสำหรับการวิจัยจากเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเภสัชกรรม ผู้ทำการวิจัยมีความซาบซึ้งใจในความอนุเคราะห์เหล่านี้เป็นอย่างมาก จึงขอแสดงความขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

นางสาวพิมพ์สุมน เจียมบุญศรี  
นางสาวพิมพ์พิกา กาญจนดำเกิง

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ช
บทนำ	1
ทบทวนวรรณกรรม	2
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย	6
ผลการวิจัย	10
วิจารณ์ผลการวิจัย	26
สรุปผลการวิจัย และ ข้อเสนอแนะ	28
เอกสารอ้างอิง	30

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลการวิเคราะห์ orlistat standard ที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm	12
2	ผลการวิเคราะห์ orlistat standard ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm	13
3	ผลการทดสอบการละลายของยา orlistat ในสารละลายต่างๆ	14
4	ผลการวิเคราะห์ Xenical® capsules ที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm	15
5	ผลการวิเคราะห์ Xenical® capsules ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm	16
6	Dissolution profile of Xenical® lot. M1153 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm)	17
7	Dissolution profile of Xenical® lot. M1153 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)	17
8	ผลการวิเคราะห์ orlistat capsules (local drugs) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm	20
9	ผลการวิเคราะห์ orlistat capsules (local drugs) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm	21
10	Dissolution profile of orlistat capsules (local drugs) lot. TR-001 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm)	22
11	Dissolution profile of orlistat capsules (local drugs) lot. TR-001 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)	22
12	การเปรียบเทียบ similarity ของยา generic และ local drugs ที่ทำการศึกษา ที่ 15, 30, 45, 60 และ 75 นาที	25
13	ผลการศึกษาความคงตัวของ orlistat in methanol ที่เก็บที่ -20 °c และป้องกันแสง	25



## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างของ orlistat	2
2	กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ orlistat 1 mg/ml in methanol	10
3	กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ 0.02 M phosphate buffer pH 6.8	11
4	กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ 0.02 M phosphate buffer pH 6.8 + SLS 2 %	11
5	ตัวอย่าง chromatogram ของ orlistat standard ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ 205 และ 210 nm.	12
6	กราฟมาตรฐาน (standard curve) ของ orlistat ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm	13
7	กราฟมาตรฐาน (standard curve) ของ orlistat ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210nm	13
8	ตัวอย่าง chromatogram ของ Xenical® capsules ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ 205 และ 210 nm	17
9	Dissolution profile of Xenical® lot. M1153 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm)	18
10	Dissolution profile of Xenical® lot. M1153 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)	18
11	ตัวอย่าง chromatogram ของ orlistat capsules (local drugs) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ 205 และ 210 nm	19
12	Dissolution profile of orlistat capsules (local drugs) lot. TR-001 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm)	23
13	Dissolution profile of orlistat capsules (local drugs) lot. TR-001 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)	23

รูปที่		หน้า
14	Comparative dissolution profile of Xenical® และ local drugs (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm)	24
15	Comparative dissolution profile of Xenical® และ local drugs (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)	24

## สัญลักษณ์ และ คำย่อ

°c	=	องศาเซลเซียส
SLS	=	โซเดียมลอริลซัลเฟต
HPLC	=	High performance liquid chromatography
pH	=	ความเป็นกรดเป็นด่าง
USP	=	The United States Pharmacopoeia
min	=	นาที
wk	=	สัปดาห์
conc	=	ความเข้มข้น
% w/v	=	ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร
% v/v	=	ร้อยละโดยปริมาตร
M	=	molarity
N	=	normality
g	=	กรัม
mg	=	มิลลิกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
mm	=	มิลลิเมตร
nm	=	นาโนเมตร
rpm	=	รอบต่อนาที
$r^2$	=	coefficient of determination
SD	=	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
RSD	=	relative standard deviation

## บทนำ

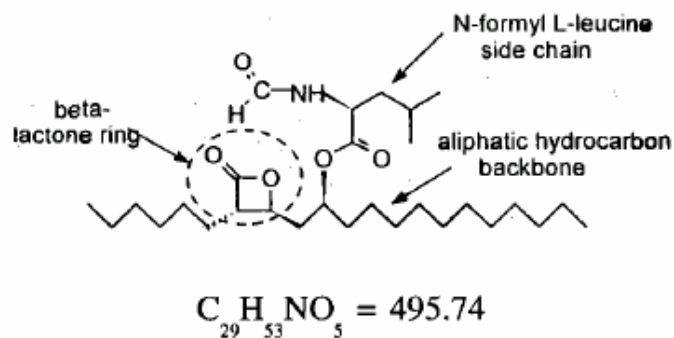
ในปัจจุบันโรคอ้วนเป็นโรคที่เป็นปัญหาสำคัญของสาธารณสุขเมืองไทย อันเป็นสาเหตุให้เกิดโรคอื่นๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคความดันโลหิตสูง โรคไขมันในเลือดผิดปกติ และโรคเบาหวาน เป็นต้น การใช้ยาก็เป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคอ้วน โดยเฉพาะยากกลุ่มใหม่ซึ่งน่าสนใจ เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมไขมันโดยยับยั้งเอนไซม์ไลเปส , สามารถใช้ในการรักษาในระยะยาวได้ และป้องกันการเกิดเบาหวานชนิดที่ 2 ในผู้ป่วยโรคอ้วนด้วย ยานี้คือ orlistat

การเปรียบเทียบตำรับของยาแคปซูล การละลายนับเป็นคุณสมบัติสำคัญอย่างหนึ่งที่ใช้เปรียบเทียบ โดยปัจจัยที่มีผลต่อการละลาย จะขึ้นอยู่กับ ชนิดและปริมาณสารช่วยในสูตรตำรับ เช่น สารช่วยแตกตัว สารช่วยลื่น สารเพิ่มปริมาณ สารช่วยยึดเกาะ และ การละลายของ เป็นต้น นอกจากนี้มีหลายการทดลองที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการละลายของยากับการออกฤทธิ์ในร่างกาย การละลายจึงจัดเป็นตัวบอกระดับคุณภาพของยา ผลการละลายที่เหมือนกันของแต่ละตำรับจะให้ประสิทธิภาพต่อร่างกายเหมือน เมื่อให้ผลการทดสอบประสิทธิภาพภายนอกร่างกายที่เหมือนกันด้วย ( in vivo – in vitro correlation) แม้ว่าการทดสอบการละลายของยา orlistat ซึ่งเป็นยาที่ละลายน้ำยาก และไม่มีกำหนดในเกณฑ์ตำรับ จึงควรมีวิธีการและสารละลายตัวกลางที่เหมาะสมที่สามารถทดสอบลักษณะการละลายของยา orlistat เพื่อพัฒนาวิธีในการเปรียบเทียบ dissolution ของยาตำรับ orlistat

นอกจากนี้ด้วยกลไกการออกฤทธิ์ของยาจะเป็นแบบ local effect ที่ทางเดินอาหาร และยามีการดูดซึมที่น้อยมาก (bioavailability <1%) การวัดระดับยาในกระแสเลือดจึงเป็นไปได้ยาก หากต้องการจะเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของยา ควรค้นคว้าหาวิธีการทดสอบการยับยั้ง lipase activity ในหลอดทดลอง นำมาสัมพันธ์กับการละลายของยาเพื่อเปรียบเทียบตำรับ และใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาตำรับให้เหมาะสมต่อไป

## บททวนวรรณกรรม

Orlistat , (N-formyl-L-leucine(1S)-1-[[[(2S,3S)-3-hexyl-4-oxo-2-oxetanyl]methyl] dodecyl ester (1) เป็นยาลดความอ้วน ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไลเปส ที่บริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก โดยตัวยาคจะไป สร้างพันธะโควาเลนต์กับหมู่ serine ของเอนไซม์ไลเปส ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์ เป็นโมโนกลีเซอไรด์ได้ จึงลดการดูดซึมไขมันจากการรับประทานอาหาร ประมาณ 30 % (9)



รูปที่ 1 โครงสร้างของ orlistat

รูปแบบของยา orlistat เป็นยาในรูปแบบแคปซูล ประกอบด้วยตัวยาสำคัญ 120 มิลลิกรัม รับประทานวันละ 3 แคปซูล พร้อมอาหารมื้อหลัก (ระหว่างอาหาร หรือภายใน 1 ชั่วโมงหลัง รับประทานอาหาร) ในกรณีที่อาหารมื่อนั้น ๆ ไม่มีอาหารไขมันหรือไม่ได้รับประทานอาหารในมื่อนั้นก็ไม่จำเป็นต้องใช้ยา orlistat ในอาหารมื่อนั้น (8)

คุณสมบัติด้านฟิสิกส์เคมีของยา มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว เป็น lipophilic substance และละลายน้ำได้น้อยมากภายใต้สภาวะ pH ของร่างกาย (7)

ยาที่มีการละลายน้ำได้น้อยก่อให้เกิดความท้าทายในการพัฒนาวิธีการทดสอบเพื่อแยกความแตกต่างที่เกิดขึ้นกับสูตรตำรับได้ และใช้เป็นตัวแทนบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างการปลดปล่อยของยาที่เกิดขึ้นในร่างกายและที่เกิดขึ้นโดยหลอดทดลองภายนอกในร่างกาย (in vivo-in vitro correlation) ซึ่งการออกแบบวิธีการทดสอบการปลดปล่อยตัวยา ต้องพิจารณาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับตัวยาสำคัญ และรูปแบบผลิตภัณฑ์ยา เพื่อช่วยในการคัดเลือกตัวกลางที่ใช้ในการทดสอบและเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ

การคัดเลือกตัวกลางสำหรับยาที่ละลายน้ำได้น้อยนั้น การใช้สารละลายในช่วง pH ที่อยู่ในร่างกายนั้นอาจไม่เพียงพอในการทำให้เกิดการละลายได้ดังนั้น อาจใช้สารลดแรงตึงผิวในการเพิ่มการละลายของตัวยา สารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุ และไม่มีประจุที่ได้รับการยอมรับให้ใช้

ได้แก่ได้แก่ sodium lauryl sulfate(SLS), polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween), cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB), polyoxyl castor oil (Cremophor), hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), polyethylene glycol tert-octylphenyl ether (Triton), nonylphenoethoxylate (Tergitol), cyclodextrins และ lecithin โดยทั่วไปแล้ว สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุจะมีความเกี่ยวเนื่องทางชีววิทยามากกว่าและมักจะเป็นทางเลือกแรกเมื่อต้องการเติมสารลดแรงตึงผิว โดยอาจนำสารลดแรงตึงผิวมาใช้เป็นสารทำให้เปียกหรือเมื่อถึงจุดวิกฤติในการเกิดไมเซลล์ (critical micelle concentration (CMC)) อาจนำมาใช้ในการละลายตัวยาได้ นอกจากนี้การคัดเลือกเครื่องมือเพื่อใช้ในการทดสอบต้องพิจารณาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของตัวยาสำคัญ (ค่าการละลายและความคงตัว) รวมทั้งรูปแบบสูตรตำรับมีบทบาทสำคัญในการคัดเลือกเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบการปลดปล่อยของยาออกจากผลิตภัณฑ์โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับตัวยาที่ละลายน้ำได้น้อย โดยการทดสอบดังกล่าวจะใช้เครื่องมือที่ได้รับการพิสูจน์ว่ามีความเหมาะสมดังที่ได้แสดงไว้ใน United States Pharmacopoeia (USP) ในหัวข้อ Dissolution และ Drug Release โดย USP apparatus I (basket method) ใช้กับยาในรูปแบบของแข็ง เช่น แคปซูลหรือยาเม็ดที่ความเร็วรอบ 50-100 รอบต่อนาที USP apparatus II (paddle method) ใช้กับยาในรูปแบบของแข็ง เช่น ยาเม็ดหรือแคปซูล ที่ความเร็วรอบ 50 หรือ 75 รอบต่อนาที โดยทั้งวิธี paddle และ basket ต่างก็ใช้ตัวกลางในปริมาตรตั้งแต่ 500-1000 มิลลิลิตร (3)

การพัฒนาวิธีทดสอบการละลาย ทำได้หลายวิธีมีทั้งการปรับปรุงอุปกรณ์ และเลือกสารละลายทดสอบที่เหมาะสม มีการทดลองที่แสดงว่ายาเม็ด ranitidine มีผลการละลายที่แตกต่างกันมากทั้งภายในห้องปฏิบัติการเดียวกันและระหว่างห้องปฏิบัติการ โดย Cappola ได้พัฒนาวิธีการทดสอบเพื่อลดความแปรผันของผลการทดสอบการละลายโดยใช้ basket แทน paddle ซึ่งจะช่วยให้มีอัตราและการละลายของตัวยานี้ เนื่องจาก basket ทำให้เกิดภาวะ sink condition ซึ่งช่วยให้พื้นที่ผิวของยาสัมผัสกับสารละลายทดสอบมากขึ้น และยังช่วยป้องกันการติดที่ก้นภาชนะด้วย(10)

การวัดปริมาณตัวยาสำคัญ orlistat A. Mohammadi และคณะได้ศึกษาความคงตัวของยา orlistat โดยใช้วิธี high performance liquid chromatographic (HPLC) แบบ UV detector สามารถใช้วัดปริมาณของยา orlistat ได้ที่ 210 nm (1)

ในการพิจารณาวิธีที่ใช้เปรียบเทียบ dissolution profiles ของยา ซึ่งแบ่งวิธีเปรียบเทียบได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่

A Model Independent Approach Using a Similarity Factor

B Model Independent Multivariate Confidence Region Procedure

## C Model Dependent Approach

พบว่าวิธีเปรียบเทียบ dissolution profiles ของยา เป็นคู่ๆ เป็นวิธีที่ง่าย และสะดวกที่สุด คือ Similarity factor ( $f_2$ ) ซึ่งอาจใช้ Difference factor ( $f_1$ ) ร่วมด้วย โดย Difference factor ( $f_1$ ) จะคำนวณ เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่าง 2 curves แต่ละเวลาและวัดถึงความสัมพันธ์ของความผิดพลาด (relative error) ของทั้ง 2 curves

$$f_1 = \frac{\sum_{t=1}^n |\bar{R}_t - \bar{T}_t|}{\sum_{t=1}^n \bar{R}_t} \times 100$$

Similarity factor ( $f_2$ ) จะวัดความเหมือนของทั้ง 2 curves ในรูปแบบ % dissolution

$$f_2 = 50 \log \left[ \frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^n (\bar{R}_t - \bar{T}_t)^2}{n}}} \right]$$

เมื่อ  $R_t$  คือ % dissolution เฉลี่ยที่เวลาต่างๆของ reference

$T_t$  คือ % dissolution เฉลี่ยที่เวลาต่างๆของ test

$n$  คือ จำนวนครั้งของเวลาที่เก็บตัวอย่างสารละลาย

ข้อกำหนดจำเพาะสำหรับการเปรียบเทียบแบบ Similarity factor และ Difference factor มีดังนี้

1. กำหนดให้ใช้ยาอย่างน้อย 12 เม็ด / แคปซูล ต่อหนึ่งตำหรับที่ทดสอบทั้ง reference และ test product
2. ให้ใช้ค่าเฉลี่ยของการละลาย จากทั้ง 2 curves ในแต่ละจุดเวลาในการคำนวณค่า  $f_1$  และ  $f_2$
3. ในการตัดสินใจว่า dissolution profiles จะเหมือนกัน เมื่อ  $f_1$  มีค่าเข้าใกล้ 0 และ  $f_2$  มีค่าเข้าใกล้ 100 โดยทั่วไปจะยอมรับว่า dissolution profiles เหมือนกันเมื่อ  $f_1$  มีค่า 0-15 และ  $f_2$  มีค่า 50-100

การใช้วิธีแบบ Model Independent Approach Using a Similarity Factor เป็นวิธีที่เหมาะสมในการเปรียบเทียบ dissolution profiles เมื่อเก็บสารละลายตัวอย่างในการทดสอบการ

ลาย 3-4 จุดเวลาหรือมากกว่าและต้องทำการทดสอบภายใต้สภาวะเดียวกัน รวมทั้งเวลาที่เก็บสารละลายต้องเป็นเวลาเดียวกัน ซึ่งจะทำให้การเก็บสารละลายทุก 15 นาที (2)

Zhao และ Kim ได้ศึกษา Platycodin D ในการยับยั้ง pancreatic lipase activity โดยการวัดค่า IC50 จากการทำปฏิกิริยาหลายชั้นตอนจนเกิดสี (colorimetric assay) ด้วยวิธี microplate reader เมื่อ 1,2-diglyceride ทำปฏิกิริยากับ pancreatic lipase จะได้ end product เป็น quinone dye ขึ้น (5)

จะเห็นได้ว่า การละลายของยา orlistat จะสามารถให้เป็นตัวเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาได้ เมื่อมีการทำการทดลอง lipase activity ภายในหลอดทดลองร่วมด้วย ซึ่งจะบอกได้ว่าการละลายมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพต่อร่างกาย แต่อย่างไรก็ตามในการทดสอบการละลายต้องใช้ตัวกลางที่เหมาะสมด้วย



## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทำวิจัย

### 1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้

- dissolution apparatus (Model VK 7000, Vankel Industries Inc., U.S.A.)
- HPLC instrument (Shimazu® LC-10AD, Japan)
- UV spectrophotometer (HITACHI U-3200, NISSEI SANGYO, Japan)
- test tube ขนาด 15 cm
- beaker ขนาด 50, 100, 250, 1000 mL
- volumetric flask ขนาด 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 2000 mL
- volumetric pipet ขนาด 1, 2, 5, 10 mL
- graduated cylinder ขนาด 10, 25, 100, 250, 1000 mL
- weighting bottle
- vortex mixer

### 2. สารเคมีที่ใช้

- orlistat reference standard (Batch No. A-045466/15320)
- Xenical® capsules (Lot No. M1153)
- orlistat local capsules (Lot No. TRS-01)
- 0.02 M phosphate buffer (เตรียมจาก monobasic potassium phosphate, J.T. Baker Chemical Co., Lot No. 517585)
- 0.1 N hydrochloric acid (เตรียมจาก Analytical grade hydrochloric acid fuming 37%, Lot No. K26014917, Merck KGaA, Germany)
- 0.1 N sodium hydroxide (เตรียมจาก anhydrous sodium hydroxide, CARLO ERBA REAGENTI, Lot No 3B003023E)
- sodium lauryl sulphate (APS Ajax Finechem, Batch No. F0B061)
- tween 20 (S.Tong chemicals Co.,Ltd, Lot No. 134043)
- methanol (HPLC grade, LABSCAN Asia Co.,Ltd, Batch No. 06 10 0051)
- phosphoric acid (Analytical grade, LABSCAN Asia Co.,Ltd, Batch No. 06 07 0012)
- acetonitrile (Analytical reagent A.R., LABSCAN Asia Co.,Ltd, Batch No. 06 09 0078)
- purified water

### 3. วิธีทำการวิจัย

#### 3.1. การหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

เตรียมสารละลายสำหรับ scan หาสเปกตรัมการดูดกลืนแสง ดังนี้

- สารละลาย orlistat ใน methanol 0.1 mg/ml

เตรียมจาก stock solution ที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml

- สารละลาย 0.02 M phosphate buffer pH 6.8

เตรียมโดยชั่ง monobasic potassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) จำนวน 2.722 g แล้วละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นใน volumetric flask ขนาด 1000 ml แล้วทำการปรับ pH ด้วย sodium hydroxide solution

- สารละลาย 0.02 M phosphate buffer pH 6.8 ที่มีสารลดแรงตึงผิว sodium lauryl sulphate 2 %

เตรียมโดยชั่ง SLS จำนวน 2 g มาละลายในสารละลาย 0.02 M phosphate buffer pH 6.8 จำนวน 100 ml โดยใช้ความร้อนช่วย

นำสารละลายตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ไป scan หาค่าการดูดกลืนแสงที่ ช่วงความยาวคลื่น 200-230 nm

#### 3.2. การศึกษาการละลายของยา orlistat ในตัวทำละลายโดยอาศัยสารลดแรงตึงผิวต่างๆในความเข้มข้นต่างกัน

3.2.1 การทำกราฟมาตรฐานของ orlistat standard ใน methanol

- ชั่ง orlistat standard อย่างถูกต้อง 50 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask 50 ml  
- ละลายด้วย methanol จนได้สารละลายใส แล้วปรับปริมาตรจนครบ 50 ml จะได้สารละลายความเข้มข้น 1 mg/ml เพื่อใช้เป็น stock solution

- นำสารละลายข้างต้นมาเจือจางสารละลายความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, และ 0.5 mg/ml

- นำสารละลายความเข้มข้นต่างๆ ไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้ HPLC ภายใต้อุณหภูมิ

HPLC instrument (Shimadzu® LC-10AD, Japan)

SPD-10AV variable wavelength UV detector : 205 , 210 nm

SIL-10AD autoinjector : 50 microlitre

RF 10A version 1.1 software LC program : integrator

Column : Venusil™ AQ C18 column (5 µm particle size , 150 x 4.6 mm)

Mobile phase : 0.1 % phosphoric acid in water : acetonitrile (5:95 %v/v)

Flow rate : 1.5 ml/min

Temperature : 25 °c

- นำข้อมูลที่ได้ไปพล็อตกราฟระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ(แกน y) กับความเข้มข้น (แกน x) และคำนวณหาสมการ linear regression

3.2.2. ทดสอบการละลายของยา orlistat ในสารละลายทดสอบ 5 ชนิด

3.2.2.1. นำตัวอย่าง orlistat standard 10 mg ในสารละลายทดสอบ 10 ml โดยใช้สารละลายทดสอบต่างๆ ดังนี้

- 0.02 M phosphate buffer pH 6.8
- 0.02 M phosphate buffer pH 6.8 + sodium lauryl sulphate (SLS) 1%
- 0.02 M phosphate buffer pH 6.8 + sodium lauryl sulphate (SLS) 2 %
- 0.02 M phosphate buffer pH 6.8 + tween 20 1%
- 0.02 M phosphate buffer pH 6.8 + tween 20 2 %

3.2.2.2. นำมาหาปริมาณที่ละลายได้ โดยใช้ HPLC

3.3. การทดสอบ dissolution ของยา Xenical® กับ Orlistat capsules (Local drugs) โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น

3.3.1. นำยา orlistat capsules ทั้ง 2 ตำรับ ( generic and local drugs) จำนวนตำรับละ 6 capsules มาทดสอบการละลายโดยใช้สารละลายทดสอบที่ได้จากการเปรียบเทียบผลการละลายแล้วจาก 3.2.2. ได้แก่

- 0.02 M Phosphate buffer pH 6.8 + sodium lauryl sulphate (SLS) 2 %
- USP method 2 (basket)
- 100 rpm
- ทำการสุ่มตัวอย่างที่ 15, 30, 45, 60, 75 นาที

3.3.2. นำตัวอย่างมาหาปริมาณโดยใช้ HPLC

3.3.3. ทำการเปรียบเทียบการละลายของยา 2 ตำรับโดยใช้ similarity factor ( $f_2$ ) และ difference factor ( $f_1$ ) ซึ่งหาได้จากสูตร

$$f_1 = \frac{\sum_{t=1}^n |\bar{R}_t - \bar{T}_t|}{\sum_{t=1}^n \bar{R}_t} \times 100$$

$$f_2 = 50 \log \left[ \frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^n (\overline{Rt} - \overline{Tt})^2}{n}}} \right]$$

เมื่อ Rt คือ % dissolution เฉลี่ยที่เวลาต่างๆของ reference

Tt คือ % dissolution เฉลี่ยที่เวลาต่างๆของ test

n คือ จำนวนครั้งของเวลาที่เก็บตัวอย่างสารละลาย

### 3.4. การศึกษาความคงตัวของยา

3.4.1 นำ orlistat solution ความเข้มข้น 1 mg/ml ที่เตรียมขึ้นใหม่มาวิเคราะห์ปริมาณ โดยวิธี HPLC

3.4.2 นำสารละลายใน 3.4.1 มาเก็บที่อุณหภูมิ -20 °c โดยป้องกันแสง

3.4.3 นำสารละลายที่เก็บไว้มาหาปริมาณโดย HPLC เมื่อเวลาผ่านไป 3 และ 4 สัปดาห์

3.4.4 คำนวณหาปริมาณที่เปลี่ยนแปลงไป

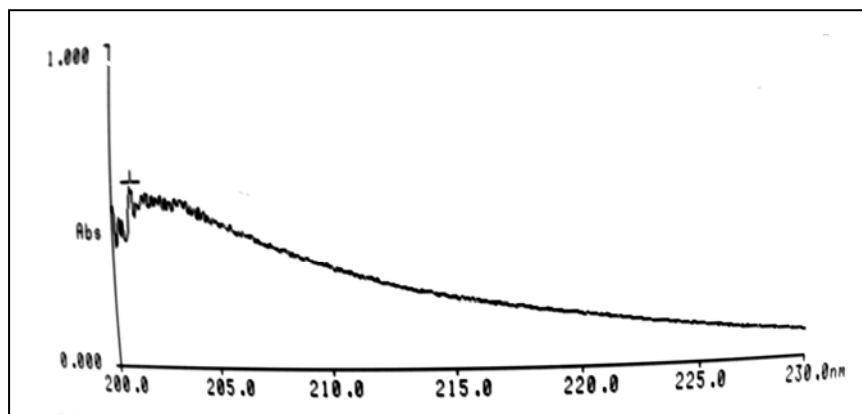
### 3.5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

## ผลการวิจัย

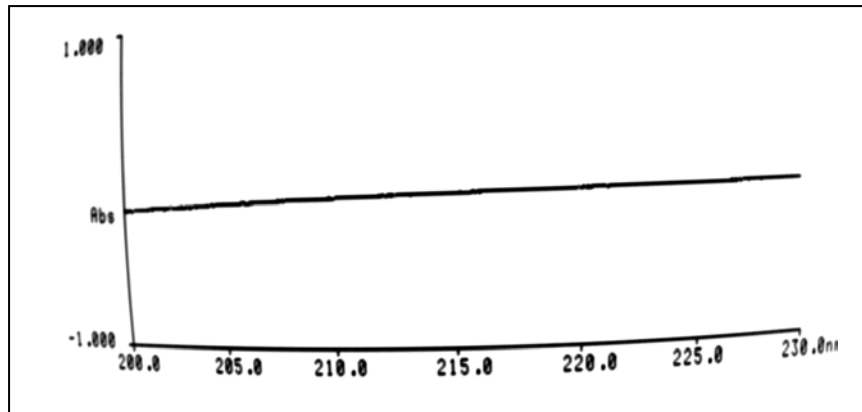
### 1. การหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

ผลการ scan หาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ได้สเปกตรัมการดูดกลืนแสง ดังนี้

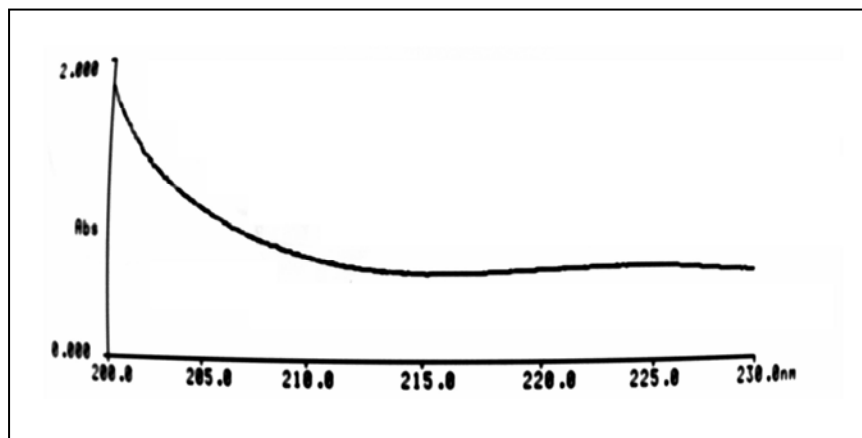
- สารละลาย orlistat ใน methanol 0.1 mg/ml  
ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดคือ 201 nm (ค่าการดูดกลืนแสง = 0.5693) และที่ 205 nm = 0.4563 ดังรูปที่ 2
- สารละลาย 0.02 M phosphate buffer pH 6.8  
ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ น้อยกว่า 0 ในช่วง 200-230 nm ดังรูปที่ 3
- สารละลาย 0.02 M phosphate buffer pH 6.8 ที่มีสารลดแรงตึงผิว sodium laryl sulphate 2 %  
ที่ความยาวคลื่น 205 nm ให้ค่าการดูดกลืนแสง 0.979 และที่ความยาวคลื่นที่มากกว่า 205 nm จะให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 0 ดังรูปที่ 5



รูปที่ 2 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ orlistat 1 mg/ml in methanol



รูปที่ 3 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ 0.02 M phosphate buffer pH 6.8



รูปที่ 4 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของ 0.02 M phosphate buffer pH 6.8 + SLS 2 %

## 2. การศึกษาการละลายของยา orlistat ในตัวทำละลายโดยอาศัยสารลดแรงตึงผิวต่างๆในความเข้มข้นต่างกัน

### 2.1 กราฟมาตรฐานของ orlistat standard ใน methanol ที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 และ 210 nm

พบว่า retention time ของ orlistat standard peak อยู่ในช่วง 5-6 นาที ตามรูปที่ 5 (พบว่าในรูปที่ 5 retention time จะเท่ากับ 5.77 นาที) และผลการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ orlistat (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, และ 0.5 mg/ml) และ พื้นที่ของ peak เป็นไปตามตารางที่ 1 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm) และ ตารางที่ 2 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)

เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปพล็อตกราฟระหว่าง area under peak (แกน y) และ concentration of orlistat (แกน x) จะได้ standard curve ของ orlistat standard ใน methanol ดังแสดงในรูปที่ 6 (ที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm) และรูปที่ 7 (ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)

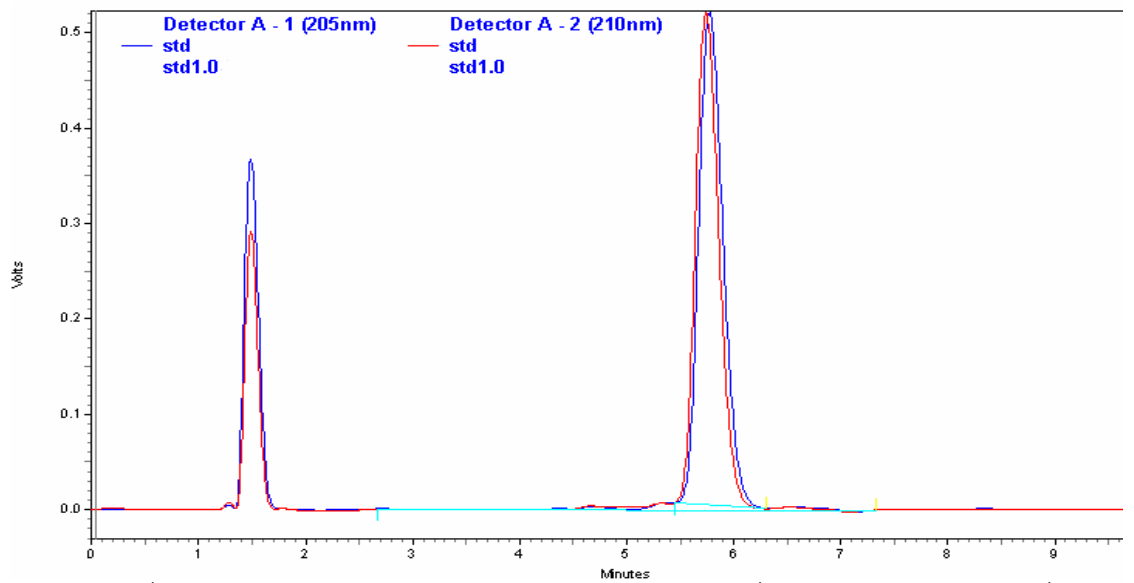
เมื่อทำการหาความสัมพันธ์เส้นตรงด้วยวิธี linear regression analysis พบว่า

- ที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm

ได้สมการ  $y = (8 \times 10^6)x + 55438$  โดยมีสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ ( $r^2$ ) = 0.9999

- ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm

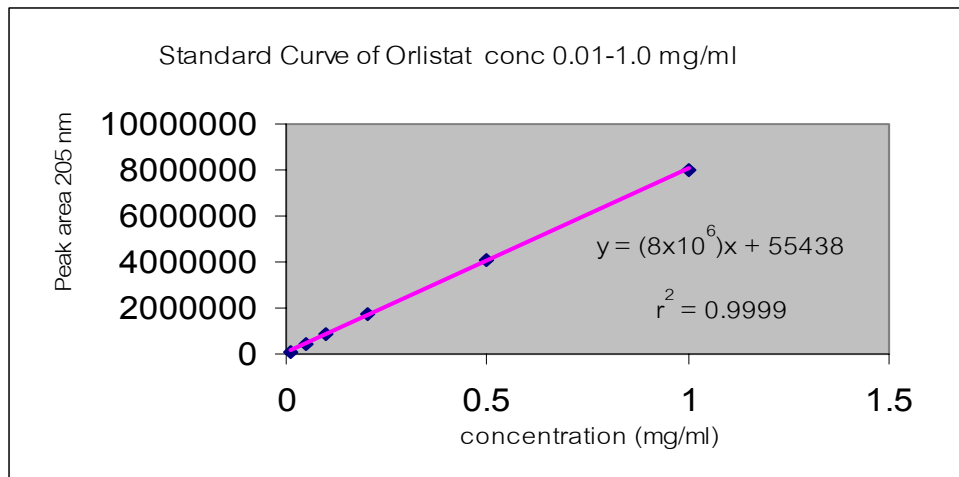
ได้สมการ  $y = (4 \times 10^6)x + 5868.7$  โดยมีสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ ( $r^2$ ) = 1.0000



รูปที่ 5 ตัวอย่าง chromatogram ของ orlistat standard ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ 205 และ 210 nm.

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ orlistat standard ที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm

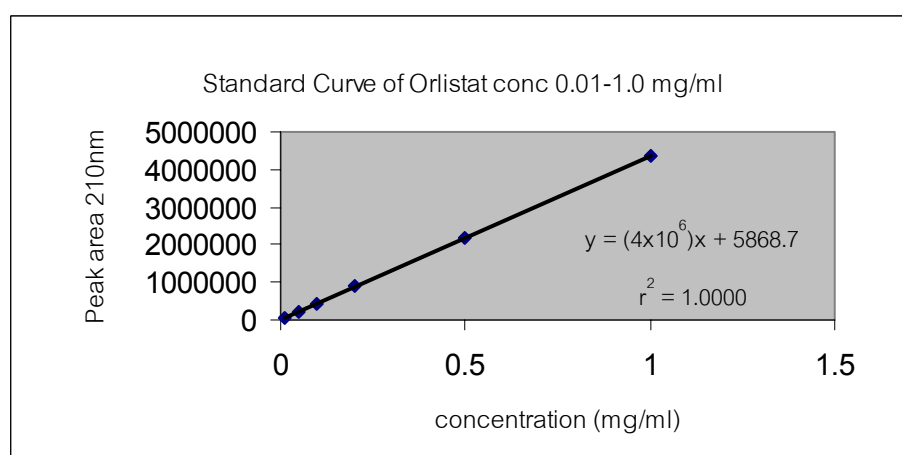
conc (mg/ml)	area-1	area-2	area-3	average	SD	%RSD
0.01	99475	97236	97620	98110	1197.3	1.22
0.05	426834	424666	423665	425055	1619.9	0.38
0.1	863533	877766	869423	870241	7151.6	0.82
0.2	1665371	1709093	1714152	1696205	26822.9	1.58
0.5	4104910	4100650	4101262	4102274	2303.3	0.06
1	7958204	7971333	8168100	8032546	117576.9	1.46



รูปที่ 6 กราฟมาตรฐาน (standard curve) ของ orlistat ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm ซึ่งจากกราฟได้สมการดังนี้  $y = (8 \times 10^6)x + 55438$  ,  $r^2 = 0.9999$

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ orlistat standard ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm

conc(mg/ml)	area-1	area-2	area-3	average	SD	%RSD
0.01	48073	48076	48048	48066	15.4	0.03
0.05	213957	214121	216777	214952	1582.9	0.74
0.1	436236	443538	437088	438954	3992.7	0.91
0.2	872004	884741	886430	881058	7886.6	0.90
0.5	2197494	2193611	2203222	2198109	4834.9	0.22
1	4341381	4260567	4450915	4350954	95534.4	2.20



รูปที่ 7 กราฟมาตรฐาน (standard curve) ของ orlistat ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210nm ซึ่งจากกราฟได้สมการดังนี้  $y = (4 \times 10^6)x + 5868.7$  ,  $r^2 = 1.0000$



## 2.2 ทดสอบการละลายของยา orlistat ในสารละลายทดสอบ 5 ชนิด

จากการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาที่ละลายได้ในสารละลายทดสอบ 5 ชนิด ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3 ซึ่งพบว่า orlistat สามารถละลายใน phosphate buffer ได้ดีขึ้นเมื่อมีการใส่สารลดแรงตึงผิว คือ sodium lauryl sulphate ที่ความเข้มข้น 2 %

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบการละลายของยา orlistat ในสารละลายต่างๆ

Solubility	Peak area at 205 nm	Amount of dissolved orlistat
Methanol	3552564	0.44
0.02 M Phosphate buffer pH 6.8	0	0.00
0.02 M Phosphate buffer pH 6.8 + SLS 1% w/v	265839	0.03
0.02 M Phosphate buffer pH 6.8 + SLS 2% w/v	434066	0.05
0.02 M Phosphate buffer pH 6.8 + Tween 20 1% w/v	0	0.00
0.02 M Phosphate buffer pH 6.8 + Tween 20 2% w/v	0	0.00

## 3. การทดสอบ dissolution ของยา Xenical® กับ Orlistat capsules (Local drugs) โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น

### 3.1 การทดสอบการละลายของยา Xenical® capsules

จากการวิเคราะห์ปริมาณยาที่ละลายสะสมโดยวิธี HPLC พบว่า retention time ของ orlistat peak จากสารละลายตัวอย่างที่สุ่มเก็บ มีค่าอยู่ในช่วง 5-6 นาที ตามที่แสดงในรูปที่ 8 (พบว่า retention time จากตัวอย่างที่แสดงเท่ากับ 5.44 นาที) สำหรับ peak อื่นๆ จะเป็น solvent peak ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการเก็บตัวอย่างจำนวน 6 capsules ที่เวลา 15, 30, 45, 60 และ 75 นาที นำตัวอย่างมาวิเคราะห์โดยทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง (n = 3) และเทียบความเข้มข้นของ orlistat จาก standard curve

ผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวยาที่ละลายได้ ปริมาณยาสะสม และ % labeled amount หรือ % dissolve (ยา 1 capsules มีตัวยา orlistat 120 mg) แสดงในตารางที่ 4 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm) และ ตารางที่ 5 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)

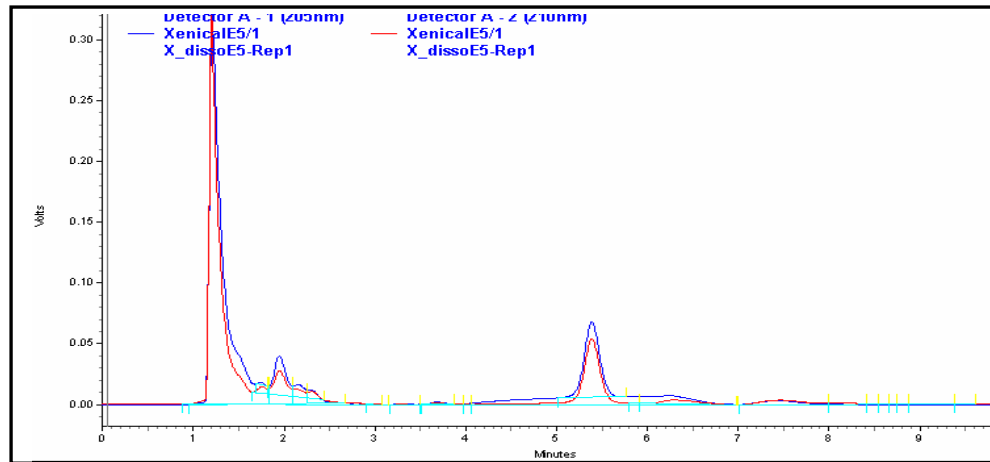
เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปสร้าง dissolution profile ของ Xenical® capsules ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6, รูปที่ 9 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm) และ ตารางที่ 7, รูปที่ 10 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ Xenical® capsules ที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm

Xenical		Area1	Area2	Average	mg orlistat dissolved	Cumulative amount	% dissolved
Capsule	Time (min)						
1	15	405002	407716	406359	39.479	39.479	32.90
	30	590648	584079	587364	59.842	60.061	50.05
	45	601577	597592	599585	61.216	61.549	51.29
	60	703622	699483	701553	72.688	73.028	60.86
	75	823311	826002	824657	86.537	86.941	72.45
2	15	488897	484608	486753	48.523	48.523	40.44
	30	539524	539895	539710	54.481	54.750	45.63
	45	626327	631653	628990	64.525	64.827	54.02
	60	746299	740006	743153	77.368	77.726	64.77
	75	795596	793938	794767	83.175	83.604	69.67
3	15	422301	478381	450341	44.427	44.427	37.02
	30	486927	483398	485163	48.344	48.591	40.49
	45	639005	640541	639773	65.738	66.006	55.01
	60	572114	574227	573171	58.245	58.610	48.84
	75	744538	743255	743897	77.452	77.775	64.81
4	15	326940	323868	325404	30.371	30.371	25.31
	30	380541	429287	404914	39.316	39.485	32.90
	45	601853	613809	607831	62.144	62.363	51.97
	60	828352	858187	843270	88.631	88.976	74.15
	75	923742	895550	909646	96.098	96.591	80.49
5	15	183787	166090	174939	13.444	13.444	11.20
	30	315741	309127	312434	28.912	28.987	24.16
	45	430788	430262	430525	42.197	42.358	35.30
	60	517872	514874	516373	51.855	52.090	43.41
	75	581860	577281	579571	58.965	59.253	49.38
6	15	191338	191374	191356	15.291	15.291	12.74
	30	325654	332517	329086	30.785	30.870	25.73
	45	444817	446259	445538	43.886	44.057	36.71
	60	515721	523676	519699	52.229	52.473	43.73
	75	590021	576924	583473	59.404	59.694	49.75

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ Xenical® capsules ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm

Xenical		Area1	Area2	Average	mg orlistat dissolved	Cumulative amount	% dissolved
Capsule	Time (min)						
1	15	219289	219742	219515.5	48.071	48.071	40.06
	30	319342	316740	318041	70.239	70.506	58.75
	45	312267	316265	314266	69.389	69.780	58.15
	60	368241	366062	367151.5	81.289	81.674	68.06
	75	430938	437990	434464	96.434	96.886	80.74
2	15	260959	259579	260269	57.240	57.240	47.70
	30	292142	294780	293461	64.708	65.026	54.19
	45	343571	347204	345387.5	76.392	76.751	63.96
	60	407172	400306	403739	89.521	89.945	74.95
	75	427766	426261	427013.5	94.758	95.255	79.38
3	15	422301	478381	450341	100.006	100.006	83.34
	30	486927	483398	485162.5	107.841	108.397	90.33
	45	639005	640541	639773	142.628	143.228	119.36
	60	572114	574227	573170.5	127.643	128.435	107.03
	75	744538	743255	743896.5	166.056	166.765	138.97
4	15	73578	73657	73618	15.243	15.243	12.70
	30	170220	171192	170706	37.088	37.173	30.98
	45	269300	270181	269741	59.371	59.577	49.65
	60	325633	327756	326695	72.186	72.516	60.43
	75	353392	354346	353869	78.300	78.701	65.58
5	15	82396	84819	83608	17.491	17.491	14.58
	30	162263	163769	163016	35.358	35.455	29.55
	45	224633	223899	224266	49.139	49.336	41.11
	60	267827	266493	267160	58.791	59.064	49.22
	75	300603	298692	299648	66.100	66.427	55.36
6	15	99963	99652	99808	21.136	21.136	17.61
	30	169563	171699	170631	37.072	37.189	30.99
	45	224658	224641	224650	49.226	49.432	41.19
	60	266743	260416	263580	57.985	58.258	48.55
	75	293589	295319	294454	64.932	65.254	54.38



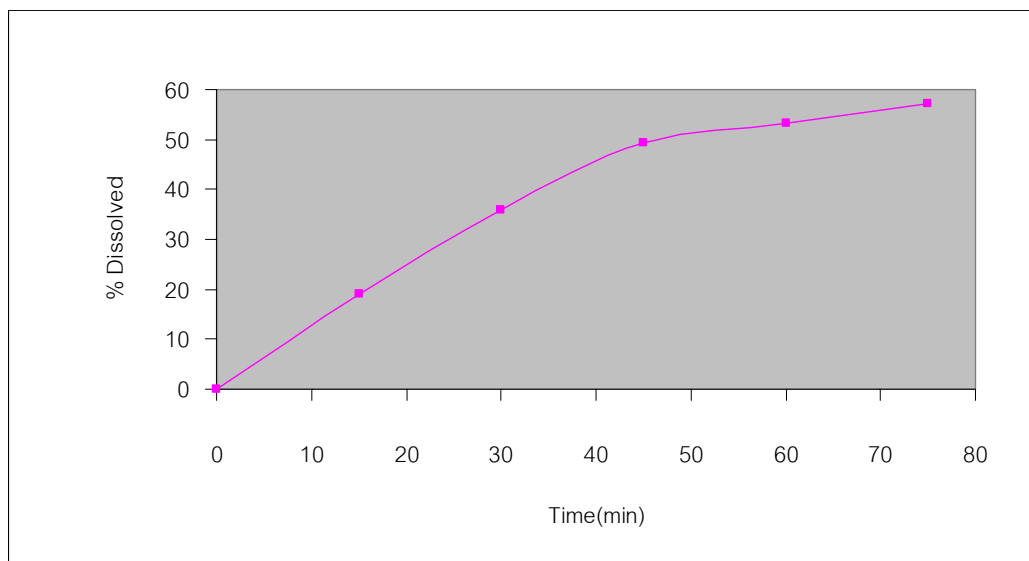
รูปที่ 8 ตัวอย่าง chromatogram ของ Xenical® capsules ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ 205 และ 210 nm

ตารางที่ 6 Dissolution profile of Xenical® lot. M1153 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm)

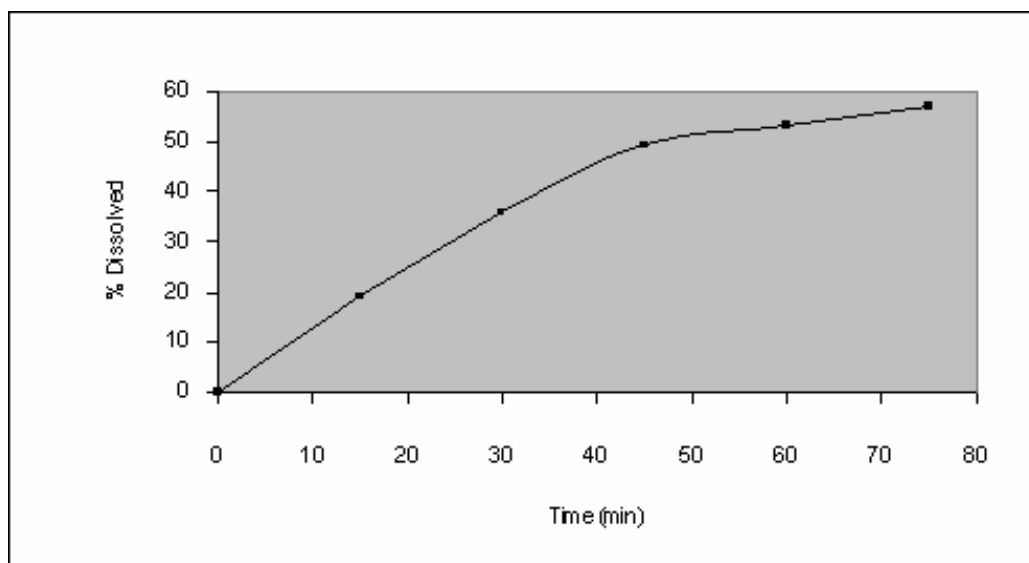
Time (min)	15	30	45	60	75
Xenical1	32.90	50.05	51.29	60.86	72.45
Xenical2	40.44	45.63	54.02	64.77	69.67
Xenical3	37.02	40.49	55.01	48.84	64.81
Xenical4	25.31	32.90	51.97	74.15	80.49
Xenical5	11.20	24.16	35.30	43.41	49.38
Xenical6	12.74	25.73	36.71	43.73	49.75
Average	26.60	36.49	47.38	55.96	64.42
SD	12.4	10.6	8.9	12.6	12.6
%RSD	46.66	29.11	18.84	22.47	19.54

ตารางที่ 7 Dissolution profile of Xenical® lot. M1153 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)

Time (min)	15	30	45	60	75
Xenical1	40.06	58.75	58.15	68.06	80.74
Xenical2	47.70	54.19	63.96	74.95	79.38
Xenical3	83.34	90.33	119.36	107.03	138.97
Xenical4	12.70	30.98	49.65	60.43	65.58
Xenical5	14.58	29.55	41.11	49.22	55.36
Xenical6	17.61	30.99	41.19	48.55	54.38
Average	36.00	49.13	62.24	68.04	79.07
SD	27.3	23.9	29.4	21.7	31.4
%RSD	75.91	48.66	47.28	31.93	39.77



รูปที่ 9 Dissolution profile of Xenical® lot. M1153 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm)



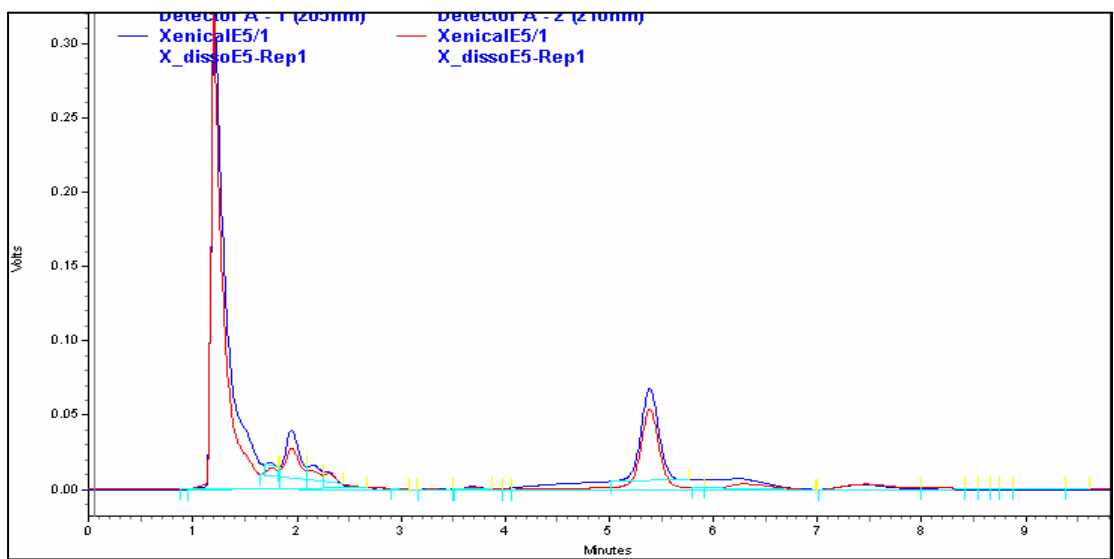
รูปที่10 Dissolution profile of Xenical® lot. M1153 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)

### 3.2 การทดสอบการละลายของยา orlistat capsules (local drugs)

จากการวิเคราะห์ปริมาณยาที่ละลายสะสมโดยวิธี HPLC พบว่า retention time ของ orlistat peak จากสารละลายตัวอย่างที่สุ่มเก็บ มีค่าอยู่ในช่วง 5-6 นาที ตามที่แสดงในรูปที่ 11 (พบว่า retention time จากตัวอย่างที่แสดงเท่ากับ 5.38 นาที) สำหรับ peak อื่นๆ จะเป็น solvent peak ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการเก็บตัวอย่างจำนวน 6 capsules ที่เวลา 15, 30, 45, 60 และ 75 นาที นำตัวอย่างมาวิเคราะห์โดยทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง (n = 3) และเทียบความเข้มข้นของ orlistat จาก standard curve

ผลการวิเคราะห์ปริมาณตัวยาที่ละลายได้ ปริมาณยาสะสม % dissolve แสดงในตารางที่ 8 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm) และ ตารางที่ 9 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)

เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปสร้าง dissolution profile ของ Xenical® capsules ได้ผล ดังแสดงในตารางที่ 10, รูปที่ 12(วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm) และ ตารางที่ 11, รูปที่ 13(วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)



รูปที่ 11 ตัวอย่าง chromatogram ของ orlistat capsules (local drugs) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ที่ 205 และ 210 nm

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ orlistat capsules (local drugs) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm

Local drugs		Area1	Area2	Average	mg orlistat dissolved	Cumulative amount	% dissolved
Capsule	Time (min)						
1	15	0	0	0	0.000	0.000	0.00
	30	130826	123060	126943	8.044	8.044	6.70
	45	203878	205258	204568	16.777	16.822	14.02
	60	205267	207524	206395.5	16.983	17.076	14.23
	75	234227	265801	250014	21.890	21.984	18.32
2	15	382238	382016	382127	36.753	36.753	30.63
	30	548404	546901	547652.5	55.374	55.578	46.32
	45	701984	703571	702777.5	72.826	73.133	60.94
	60	731046	724288	727667	75.626	76.030	63.36
	75	737576	740403	738989.5	76.900	77.320	64.43
3	15	252206	251780	251993	22.112	22.112	18.43
	30	508111	509973	509042	51.030	51.153	42.63
	45	697190	691125	694157.5	71.856	72.139	60.12
	60	686660	691575	689117.5	71.289	71.688	59.74
	75	763237	762510	762873.5	79.586	79.983	66.65
4	15	379701	379324	379512.5	36.458	36.458	30.38
	30	569723	565041	567382	57.594	57.796	48.16
	45	679415	679416	679415.5	70.197	70.517	58.76
	60	697929	702431	700180	72.533	72.923	60.77
	75	743003	743183	743093	77.361	77.764	64.80
5	15	441899	439176	440537.5	43.324	43.324	36.10
	30	550768	550773	550770.5	55.725	55.966	46.64
	45	667066	669306	668186	68.934	69.244	57.70
	60	752277	753722	752999.5	78.476	78.859	65.72
	75	773850	776471	775160.5	80.969	81.405	67.84
6	15	50642	51653	51147.5	0.000	0.000	0.000
	30	328668	330223	329445.5	30.826	30.823	25.69
	45	524694	522710	523702	52.680	52.851	44.04
	60	645524	647334	646429	66.486	66.779	55.65
	75	695566	697236	696401	72.108	72.478	60.40

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ orlistat capsules (local drugs) ที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm

Local drugs		Area1	Area2	Average	mg orlistat dissolved	Cumulative amount	% dissolved
Capsule	Time (min)						
1	15	0	0	0	0.000	0.000	0.00
	30	54858	56283	55571	11.183	11.183	9.32
	45	93118	95683	94401	19.920	19.982	16.65
	60	98921	98053	98487	20.839	20.950	17.46
	75	116449	116932	116691	24.935	25.051	20.88
2	15	190020	191369	190695	41.586	41.586	34.65
	30	282552	275559	279056	61.467	61.698	51.42
	45	360579	364543	362561	80.256	80.597	67.16
	60	373217	377109	375163	83.091	83.537	69.61
	75	372713	373138	372926	82.588	83.049	69.21
3	15	126575	126966	126771	27.203	27.203	22.67
	30	256509	257753	257131	56.534	56.685	47.24
	45	352835	349527	351181	77.695	78.009	65.01
	60	347922	350008	348965	77.197	77.628	64.69
	75	386152	385731	385942	85.516	85.945	71.62
4	15	190658	190845	190752	41.599	41.599	34.67
	30	287978	284324	286151	63.064	63.295	52.75
	45	344690	344093	344392	76.168	76.518	63.76
	60	355607	356523	356065	78.794	79.217	66.01
	75	377194	375283	376239	83.333	83.771	69.81
5	15	223376	223456	223416	48.948	48.948	40.79
	30	279794	278777	279286	61.519	61.791	51.49
	45	337086	338514	337800	74.685	75.026	62.52
	60	380824	383727	382276	84.692	85.106	70.92
	75	393889	394755	394322	87.402	87.873	73.23
6	15	25136	24591	24864	4.274	4.274	3.56
	30	163904	164137	164021	35.584	35.608	29.67
	45	265414	264353	264884	58.278	58.476	48.73
	60	327377	326807	327092	72.275	72.599	60.50
	75	349148	349056	349102	77.227	77.629	64.69

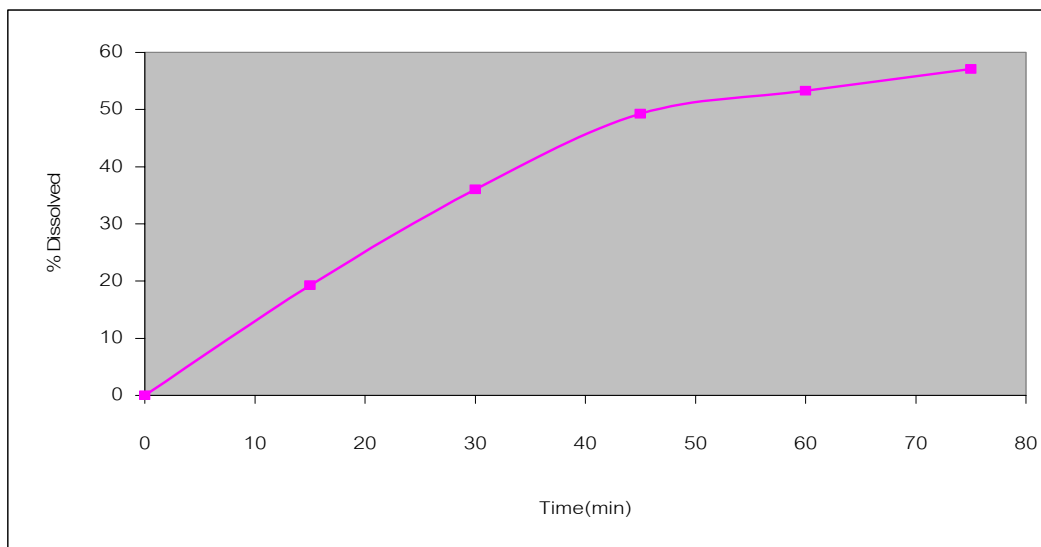


ตารางที่ 10 Dissolution profile of orlistat capsules (local drugs) lot. TR-001 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm)

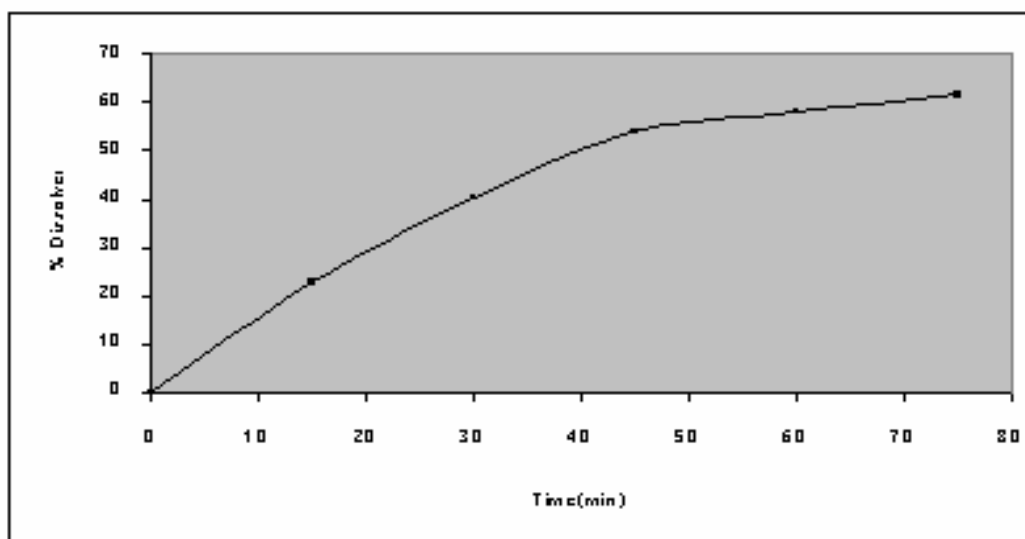
Time (min)	15	30	45	60	75
Xenical1	0.00	6.70	14.02	14.23	18.32
Xenical2	30.63	46.32	60.94	63.36	64.43
Xenical3	18.43	42.63	60.12	59.74	66.65
Xenical4	30.38	48.16	58.76	60.77	64.80
Xenical5	36.10	46.64	57.70	65.72	67.84
Xenical6	0.00	25.69	44.04	55.65	60.40
Average	19.26	36.02	49.26	53.24	57.07
SD	16.0	16.6	18.4	19.4	19.2
%RSD	83.06	46.05	37.27	36.46	33.56

ตารางที่ 11 Dissolution profile of orlistat capsules (local drugs) lot. TR-001 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)

Time (min)	15	30	45	60	75
Xenical1	0.00	9.32	16.65	17.46	20.88
Xenical2	34.65	51.42	67.16	69.61	69.21
Xenical3	22.67	47.24	65.01	64.69	71.62
Xenical4	34.67	52.75	63.76	66.01	69.81
Xenical5	40.79	51.49	62.52	70.92	73.23
Xenical6	3.56	29.67	48.73	60.50	64.69
Average	22.72	40.31	53.97	58.20	61.57
SD	17.3	17.5	19.4	20.3	20.1
%RSD	76.09	43.31	35.98	34.88	32.72



รูปที่ 12 Dissolution profile of orlistat capsules (local drugs) lot. TR-001 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm)

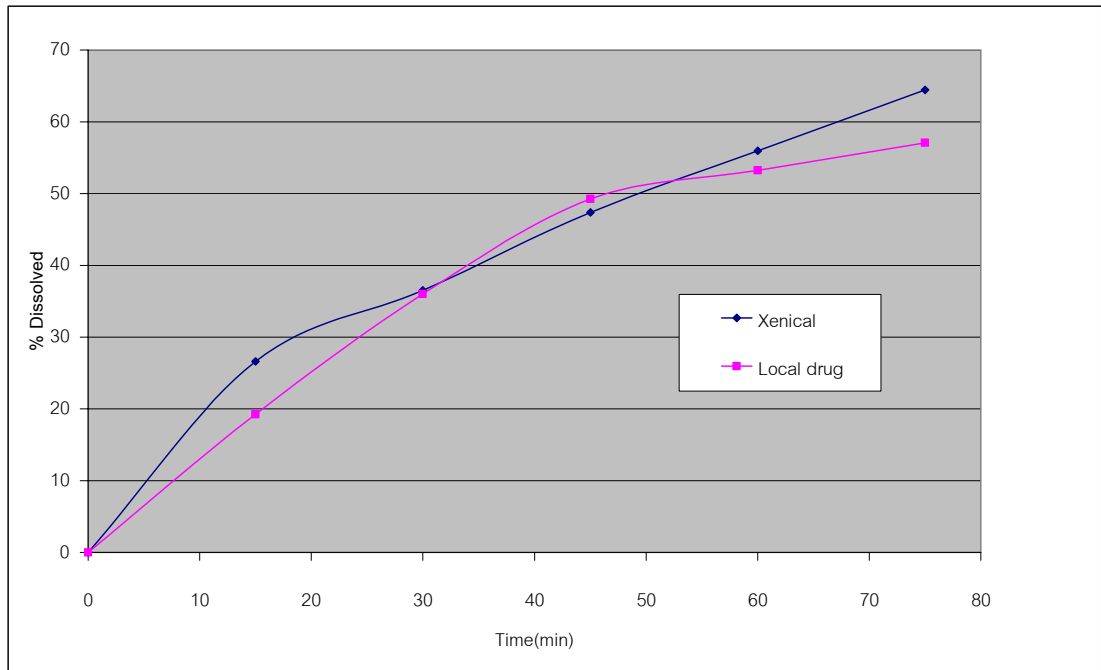


รูปที่ 13 Dissolution profile of orlistat capsules (local drugs) lot. TR-001 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)

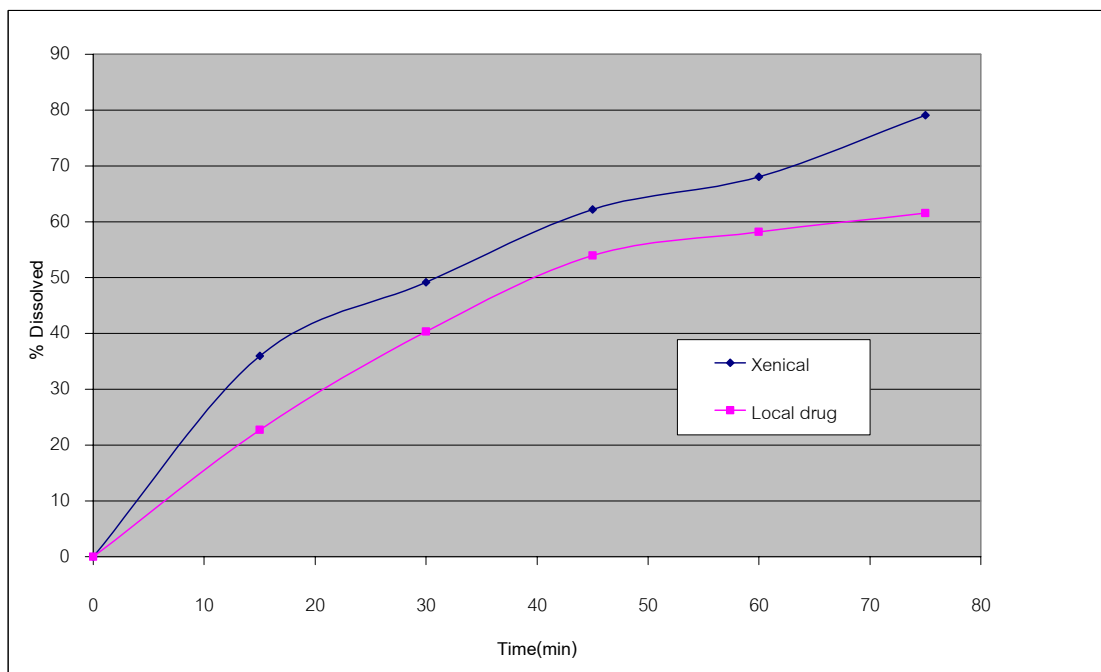
### 3.3 เปรียบเทียบ dissolution profiles ของยา orlistat capsules 2 ตำรับ

เมื่อนำ dissolution profile ของ Xenical® และ orlistat capsules (local drugs) มาเปรียบเทียบกัน ได้ผลดังรูปที่ 14 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm) และรูปที่ 15 (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)

คำนวณหาค่า  $f_1$  และ  $f_2$  และสรุปผลเป็น similarity และ difference ได้ดังแสดง  
ในตารางที่ 12



รูปที่ 14 Comparative dissolution profile of Xenical® และ local drugs (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 205 nm)



รูปที่ 15 Comparative dissolution profile of Xenical® และ local drugs (วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 210 nm)

ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบ similarity ของยา generic และ local drugs ที่ทำการศึกษา ที่ 15, 30, 45, 60 และ 75 นาที

สารละลายทดสอบ	detected wavelength	f <sub>2</sub> factor	similarity	f <sub>1</sub> factor	difference
Phosphate buffer	205 nm	8.59	yes	65.04	no
pH 6.8 + 2% SLS	210 nm	17.49	no	46.62	yes

#### 4. การศึกษาความคงตัวของยา

จากการทดลองเก็บสารละลาย stock solution ที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml ไว้ที่ -20 °c และป้องกันแสงโดยการห่อฟอลด์ยอลูมิเนียม แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณ orlistat โดยวิธี HPLC เมื่อเวลาผ่านไป 3 และ 4 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณยาที่ลดลง คิดเป็นร้อยละเทียบกับปริมาณเริ่มต้น (0 สัปดาห์) มีค่า เท่ากับ 1.19 และ 3.62 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ผลการศึกษาความคงตัวของ orlistat in methanol ที่เก็บที่ -20 °c ป้องกันแสง

stability test	area-1	area-2	area-3	average	% change
0 wk	7958204	7971333	8168100	8032546	0
3wk	7909771	7925406	7976794	7937324	1.19
4 wk	7664697	7758710	7803053	7742153	3.62

## วิจารณ์ผลการวิจัย

### 1. การหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

การทดลองหาค่าการดูดกลืนแสงนี้ทำเพื่อหาความยาวคลื่นที่สามารถตรวจสอบปริมาณสารได้อย่างถูกต้องที่สุด โดยจะทำการศึกษาสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารที่เกี่ยวข้องคือ phosphate buffer และ sodium lauryl sulphate ที่อาจมีผลรบกวนการดูดกลืนแสงของสารสำคัญ คือ ยา orlistat ซึ่งความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด คือ 201 nm (ค่าการดูดกลืนแสง = 0.5693) ดังรูปที่ 2

จากผลการศึกษาพบว่า phosphate buffer ไม่มีการรบกวนการดูดกลืนแสงของ orlistat คือ phosphate buffer ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่า 0 ในช่วงความยาวคลื่น 200-230 nm ดังรูปที่ 3 แต่พบว่า SLS จะรบกวนการดูดกลืนแสงของ orlistat ที่ความยาวคลื่น 205 nm ดังรูปที่ 4 (ค่าการดูดกลืนแสง 0.979) และพบว่ายิ่งความยาวคลื่นต่ำ จะมีค่าการดูดกลืนแสงมาก คือ ส่งผลรบกวนการดูดกลืนแสงของ orlistat มาก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกความยาวคลื่นที่ 205 และ 210 nm เพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณ orlistat

### 2. การศึกษาการละลายของยา orlistat ในตัวทำละลายโดยอาศัยสารลดแรงตึงผิวต่างๆในความเข้มข้นต่างกัน

orlistat เป็นยาที่ละลายน้ำได้น้อยนั้น การใช้สารละลายในช่วง pH ที่อยู่ในร่างกายนั้นอาจไม่เพียงพอในการทำให้เกิดการละลายได้ ดังนั้นอาจใช้สารลดแรงตึงผิวในการเพิ่มการละลายของตัวยา สารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุและไม่มีประจุที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ โดยทั่วไปได้แก่ sodium lauryl sulfate (SLS) และ polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20) จากผลการศึกษาการละลายของยา orlistat ในสารละลายทดสอบต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า orlistat สามารถละลายได้ใน phosphate buffer ที่มี SLS 2% ได้มากกว่า การใช้ tween ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ดังนั้นจึงเลือก phosphate buffer + SLS 2% เป็นตัวกลางที่ใช้ทดสอบการละลายของยา orlistat

### 3. การทดสอบ dissolution ของยา Xenical® กับ Orlistat capsules (Local drugs) โดยใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น และเปรียบเทียบ dissolution profile ของยา 2 ตำรับ

จากการทดสอบการละลายของยา orlistat ทั้ง 2 ตำรับ พบว่าที่เวลา 75 นาที Xenical® มี % dissolved วัดที่ 205 nm = 64.42 % และที่ 210 nm = 79.07% ส่วน Local drug วัดที่ 205

nm = 57.07 % และที่ 210nm = 61.57 % จะเห็นได้ว่า Xenical® มีการละลายที่มากกว่า local drug

เมื่อทำการเปรียบเทียบกราฟการละลาย (dissolution profile) ของยา 2 ตำรับ ที่ 15, 30, 45, 60 และ 75 นาที ดังแสดงในตารางที่ 12 พบว่าที่ 205 nm ยา 2 ตำรับมีการละลายที่เหมือนกัน ( $f_2 = 8.59$ ,  $f_1 = 65.04$ ) ในขณะที่ที่ 210 nm ให้การละลายที่แตกต่างกัน ( $f_2 = 17.49$ ,  $f_1 = 46.62$ )

ผลการทดลองที่ได้สามารถสรุปผลออกมาได้ 2 แนว จะเห็นได้ว่าที่ 205 nm จะสามารถตรวจหาปริมาณ orlistat ได้มากกว่าที่ 210 nm แต่ที่ 205 nm ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าอาจเนื่องมาจากมี SLS ระบบการดูดกลืนแสงของ orlistat

จากการทดลองสรุปได้ว่าปัจจัยที่ทำให้ยาทั้งสองตำรับมีการละลายที่ต่างกัน คือชนิดและปริมาณสารช่วยในตำรับ เช่น สารช่วยแตกตัว สารช่วยลื่น สารเพิ่มปริมาณ และสารช่วยยึดเกาะ เป็นต้น นอกจากนี้ยังอาจเป็นผลจากขนาดของแกรนูลด้วย

#### 4. การศึกษาความคงตัวของยา

ผลการศึกษาความคงตัวของ orlistat in methanol ในสภาวะ  $-20^{\circ}\text{C}$  และป้องกันแสงโดยการห่อฟอลด์ยอลูมิเนียม แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณ orlistat โดยวิธี HPLC เมื่อเวลาผ่านไป 3 และ 4 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณยาที่ลดลง คิดเป็นร้อยละเทียบกับปริมาณเริ่มต้น (0 สัปดาห์) มีค่าเท่ากับ 1.19 และ 3.62 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 13 ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ คือ ปริมาณตัวยาคัญลดลงจากผลที่เคยวิเคราะห์ได้ ณ เวลาเริ่มต้น (initial) น้อยกว่า 5 %

## สรุปผลการวิจัย

1. Orlistat ละลายได้ดีที่สุดใน phosphate buffer pH 6.8 + SLS 2% w/v
2. สารละลาย phosphate buffer pH 6.8 + SLS 2% w/v สามารถใช้เป็น medium ในการทดสอบ dissolution ของยา orlistat ได้ดี
3. การละลายของยา Orlistat ทั้งสองตำรับ ไม่มีความแตกต่างกัน ( $f_1 = 8.59$  ,  $f_2 = 65.04$  )  
เมื่อใช้การวัดที่ความยาวคลื่น 205 nm
4. การละลายของยา Orlistat ทั้งสองตำรับ มีความแตกต่างกัน ( $f_1 = 17.49$  ,  $f_2 = 46.62$ )  
เมื่อใช้การวัดที่ความยาวคลื่น 210 nm
5. ยา orlistat มีความคงตัวใน  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  และมีการป้องกันแสงในระยะเวลา 4 สัปดาห์

## ข้อเสนอแนะ

1. การทดลองนี้เป็นเพียงการทดลองขั้นต้น เพื่อหาสารละลายทดสอบที่เหมาะสมเท่านั้น
2. ควรทำการศึกษาต่อ ในหัวข้อต่อไปนี้
  - กรณีนี้ได้ผลการทดสอบความเหมือนของยา orlistat 2 ตำรับออกมา 2 แนวทางคือที่ 205 nm ไม่มีความแตกต่าง ขณะที่เมื่อวัดที่ 210 nm มีความแตกต่าง จึงควรทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณ orlistat โดยการนำยาตำรับเดียวกันมาเปรียบเทียบกัน
  - ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบการละลายของยา 2 ตำรับ ควรทำการทดสอบในตัวกลางชนิดอื่นอีก เพื่อหาสารละลายที่เหมาะสมสำหรับตัวยานั้น
  - ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบการละลายของยา 2 ตำรับ ควรทำการศึกษายา 12 เม็ด/ ตำรับ
  - ควรมีการทำ validation ของวิธีและเครื่องมือเพื่อการศึกษา in vivo-in vitro correlation
  - ควรทำการศึกษา Enzyme activities เพิ่มเติมเพื่อใช้ในการประเมิน Bioequivalence

## ประโยชน์ที่ได้รับ

1. สามารถพัฒนา dissolution method ที่เหมาะสมเพื่อประเมินความเท่าเทียมกันของตำรับ
2. สามารถใช้เป็น protocol ในการศึกษา Pharmaceutical equivalence ของ generic - drugs



## เอกสารอ้างอิง

1. Mohammadi, A., Haririan, I., Rezanour, N., Ghiasi, L., Walker, R.B. A stability indicating high performance liquid chromatographic assay for the determination of orlistat in capsules. *Journal of Chromatography A*, 2006 ; 1116 (1-2) :153-157
2. FDA, Guidance for industry : Dissolution testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms;1997
3. Cynthia K.Brown , Hitesh P. Chokshi , Beverly Nickerson , Robert A.Reed , Brain R.Rohrs, Pankaj A.Shah. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. *Pharmaceutical Technology* , 2004 : 56-65
4. Mehdi Ansari , Maryam Kazemipour , Javad Talebnia. The development and validation of a dissolution method for clomipramine solid dosage forms. *Dissolution Technologies* ,August 2004 ; 11(3) :16-24
5. Hai Lin Zhao , Yeong Shik Kim . Determination of the kinetic properties of Platycodin D for the inhibition of pancreatic lipase using a 1,2-Diglyceride based colorimetric assay.*Archives of Pharmacal Research* , 2004 ; 27(10) : 1048-1052
6. Paola Bertocchi , Eleonora Antoniella , Luisa Valvo , Stefano Alimonti , Adriana Memoli. Diclofenac sodium multisource prolonged release tablets-a comparative study on the dissolution profiles.*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 37(2005) : 679-685
7. EMEA guideline. Scientific discussion for the approval of Xenical [Online] 2005:[14 screens]. Available from:URL:<http://www.emea.eu.int/humandocs/PDFs/EPAR/Xenical/106698en6.pdf> [Accessed 2005 Dec 12]
8. The American Society of Health-System Pharmacists. Medlineplus drug information : Orlistat. The MedMaster™ Patient Drug Information database provides information [Online] 2002 : [4 screens]. Available from:URL:<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/medmaster/a601244.html> [Accessed 2005 Dec 12]

9. Orlistat : Clinical pharmacology. Rx List The information drug index [Online] 2004  
:[10screens].Available from:URL:[http://www.rxlist.com/cgi/generic/orlistat\\_cp.htm](http://www.rxlist.com/cgi/generic/orlistat_cp.htm) [Accessed 2005 Dec 12]
10. Cappola ML.A better dissolution method for ranitidine tablets USP. Pharm Dev Technol 2001;6(1):11-7