บทที่ 2

วัสดุและวิธีทำการวิจัย

วัสดุ

1. ผลิตภัณฑ์ทดสอบ

ยาเม็ดเคลือบเมทธิลโดปาขนาด 250 มิลลิกรัม สุ่มซื้อจากร้านขายยาต่าง ๆ ได้ทั้งหมด 9 บริษัท ตัวอักษร (A, B, C ... I) แทนชื่อการค้าของยาเม็ดเคลือบ ได้แสดงข้อมูลของยาเม็ดเมทธิลโดปาแต่ละบริษัทไว้ในภาคผนวก ก.

2. สารเคมี

2.1 Working Standard Methyldopa Powder, ความแรง 98.72% (Merck Sharp & Dohme) เลขที่ผลิต KI 1660072

2.2 Internal Standard, 3,4-Dihydroxy Benzylamine Hydrobromide (Sigma) เลขที่ผลิต 68F-3675

2.3 Ferrous sulfate : p.a. (B.L.H. Chemical Ltd.) เลขที่ผลิต 5701217H

2.4 Potassium sodium tartrate : p.a. (Merck) เลขที่ผลิต 101CD35727845

2.5 Sodium metabisulfite : p.a. (B.D.H. Chemical Ltd.) เลขที่ผลิต 4533240G

2.6 Ammonium acetate : p.a. (Merck) เลขที่ผลิต 101 CD4570012

2.7 Disodium ethylenediaminetetracetate : p.a. (Merck) เลขที่ผลิต 707 KD3564718

2.8 Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer : p.a. (Koch-Light Laboratories Ltd.) เลขที่ผลิต 96583

2.9 Aluminium oxide : Nentral activity grade I (Merck) เลขที่ผลิต 925-134K

2.10 Potassium dihydrogen phosphate : p.a. (Merck) เลขที่ผลิต 825 A323473

2.11 Orthophosphoric acid : p.a. (Merck)

2.12 Sodium octanesulfonate (Merck) เลขที่ผลิต 107F-3724

2.13 Methanol : p.a. (Merck) เลขที่ผลิต 821K 10144409

2.14 Acetonitrile : HPLC grade เลขที่ผลิต 723 A23155610

2.15 Sodium hydroxide : p.a. (Merck) เลขที่ผลิต 642 C605098

2.16 Heparin : (Leo) เลขที่ผลิต E72C

3. <u>เครื่องมือ</u>

3.1 Analytical Balance (Mettler H51AR และ Sartorius 1615MP)

3.2 Disintegration Tester (GC-21, Hanson Research Corp., Northridge, Calif. USA)

3.3 Dissolution Apparatus (72 RL, Hanson Research Corp., Northridge, Calif. USA)

3.4 Spectrophotometer (Spectronic 2000, Bausch & Lomb, N.Y. USA)

3.5 Centrifuges (GmbH 302K, Sigma, West Germany)

3.6 Shaker (Edmund Buhler K818)

3.7 Digital pH meter (PBS 730, England)

3.8 Programmable Solvent Delivery System Module (Model 590, Water Assoc. USA)

3.9 Electrochemical Detector (Model 460, Waters Assoc. USA)

3.10 Fixed Loop Injector (Reodye, Waters Assoc. USA)

3.11 Unicorder U-228 (Pantos Nippon Denshi Kagaku)

<u>วิธีทดลอง</u>

1. <u>การศึกษาในหลอดทดลอง</u> (*In vitro* studies)

สุ่มซื้อยาเม็ดเคลือบเมทธิลโดปาจากร้านขายยาได้ทั้งหมด9บริษัท ยาเม็ดเคลือบทุกบริษัทมีปริมาณตัวยาตามที่ระบุไว้ในฉลากเท่ากับ 250 มิลลิกรัมต่อเม็ด นำยาเม็ดเคลือบทั้ง 9 บริษัทมาประเมินคุณภาพโดยการทดสอบตามวิธีของ USP. หรือ BP. ดังต่อไปนี้

1.1 <u>ปริมาณตัวยาสำคัญ</u> (Content of active ingredient)

หาปริมาณตัวยาเมทธิลโดปาในยาเม็ดโดยวิธีของ U.S.P. XXI (42) ดังนี้

ขั้นที่ 1 นำยาเม็ดเมทธิลโดปาจำนวน 20 เม็ดมาบดให้เป็นผงละเอียด จากนั้นชั่งผงยาอย่างละเอียด และถูกต้องให้สมมูลกับปริมาณยาเมทธิลโดปา 100

015969

มิลลิกรัมใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติม 0.1 N sulfuric acid 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 15 นาที ปรับให้ครบปริมาตรเขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองและทิ้งสารละลายที่กรองได้ 20 มิลลิลิตรแรก

สารละลายยาเมทธิลโดปามาตรฐานเตรียมโดยชั่งยาเมทธิลโดปามาตรฐาน (reference standard methyldopa) อย่างละเอียดและถูกต้อง 100 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย 0.1 N sulfuric acid จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ

ขั้นที่ 2 ปิเปตสารละลายที่กรองได้ในขั้นที่ 1 สารละลายมาตรฐานอย่างละ 5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตรคนละใบ สำหรับ volumetric flask ใบที่สามใส่น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรเพื่อเป็น blank เติม ferrous tartrate solution 5 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ทั้งสามใบ ปรับปริมาตรให้ครบด้วย buffer solution นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์

คำนวณความเข้มข้นของเมทธิลโดปาในสารละลายตัวอย่างโดยใช้สูตร

$C\ (A_u/A_s)$

โดยที่ C คือ ความเข้มข้นของยาเมทธิลโดปามาตรฐาน หน่วยเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

A_u, A_s คือ ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารละลายตัวอย่าง และสารละลายยามาตรฐาน ตามลำดับ

(การเตรียม ferrous tartrate solution และ buffer solution แสดงไว้ใน ภาคผนวก ข.)

1.2 <u>ทดสอบการแตกกระจายตัวของยาเม็ด</u> (Disintegration test)

นำยาเม็ดเคลือบเมทธิลโดปาทั้ง 9 บริษัทมาหาเวลาที่ใช้ในการแตกกระจายตัว (disintegration time) ตามวิธีของ B.P. 1980 (43) ดังนี้

ใส่ยาเม็ดแต่ละเม็ดลงในหลอดทั้งหกของเครื่อง disintegrator วาง dise ทับบนยาเม็ดแต่ละเม็ด จากนั้นจุ่มลงในตัวกลางคือ น้ำกลั่น ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เปิดเครื่องให้เดินจับเวลาที่ใช้ในการแตกกระจายตัว* ของยาเม็ดแต่ละเม็ด เฉลี่ยเวลาที่ใช้ในการแตกกระจายตัวของทั้งหกเม็ด

*เวลาที่ใช้ในการแตกกระจายตัว จะนับเวลาตั้งแต่เริ่มเปิดเครื่องจนถึงเวลาที่ไม่มียาเม็ดเหลือบนตะแกรง ยกเว้นชิ้นส่วนที่ไม่ละลายในตัวกลาง เช่น ส่วนเคลือบของยาเม็ด

1.3 <u>ทดสอบการละลายของยาเม็ด</u> (Dissolution test)

นำยาเม็ดทั้ง9บริษัทมาหาค่าคงที่อัตราเร็วของการละลาย (dissolution rate constant, K) ตามวิธี U.S.P. XXI (42) ดังนี้

ใส่ 0.1 N Hydrochloric acid จำนวน 900 มิลลิลิตรใน vessel เพื่อเป็นตัวกลางควบคุมอุณหภูมิที่ 37 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส จากนั้นใส่ยาเม็ดแต่ละเม็ดใน vessel เปิดเครื่องให้ใบพายหมุนด้วยอัตราเร็ว 50 รอบต่อนาที ยาที่ละลายจะถูกกรองผ่าน Filter เก็บตัวอย่างครั้งละ 5 มิลลิลิตรที่เวลาต่าง ๆ ตามความเหมาะสมของแต่ละบริษัท เมื่อเก็บตัวอย่างแล้วจะเติมตัวกลางซึ่งควบคุมอุณหภูมิในจำนวนที่เท่ากันลงแทนที่ทันที วิเคราะห์หาปริมาณยาเมทธิลโดปาที่ละลายโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์

คำนวณหาปริมาณการละลายโดยใช้กราฟมาตรฐานที่ทำขึ้นโดยใช้หลักสมการเส้นตรง (44) และคำนวณค่าคงที่อัตราเร็วการละลายโดยวิธี sigma-minus plot (แสดงวิธีไว้ในภาคผนวก ฉ.)

กราฟมาตรฐาน

ชั่งยาเมทธิลโดปามาตรฐานอย่างละเอียดและถูกต้อง 100 มิลลิกรัม ละลายด้วย 0.1 N HCl ใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ นำสารละลายยามาตรฐานมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 5-70 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยใช้ 0.1 N HCl เป็น blank จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เมื่อสารละลายยามีความเข้มข้นต่าง ๆ กันมาทำกราฟมาตรฐาน หาสมการเส้นตรงโดยวิธีความถดถอยเชิงเส้น (linear regression)

กราฟมาตรฐานทำขึ้นทุกครั้งที่เตรียมตัวกลางใหม่ ปริมาณยาที่ละลายของเมทธิลโดปาจะคำนวณจากกราฟมาตรฐานที่ใช้ตัวกลางเดียวกัน (ผลของกราฟมาตรฐานแสดงในภาคผนวก ง.)

1.4 <u>การประเมินผลการศึกษาในหลอดทดลอง</u>

นำข้อมูลที่ได้มาพิจารณาว่ายาเม็ดบริษัทใดผ่านมาตรฐานที่กำหนดในเภสัชตำรับ และเปรียบเทียบหาความแตกต่างของเวลาที่ใช้ในการแตกกระจายตัว, อัตราเร็วการละลายของยาเม็ดเมทธิลโดปาแต่ละบริษัท โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวน analysis of variance, ANOVA) และ Student's t-test ของโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPS.

2. การศึกษาในร่างกาย (*In Vivo* Studies)

2.1 ผลิตภัณฑ์ที่ทำการทดลอง

ยาเม็ดเคลือบเมทธิลโดปาที่จะนำมาทดลอง จะสุ่มจากยาเม็ดบริษัทที่มีค่าอัตราเร็วการละลายแตกต่างกันทั้งหมด 4 บริษัท คือ บริษัท A (บริษัท Merck Sharp & Dohme) ซึ่งเป็นบริษัทผู้ผลิตรายแรกถือเป็นยามาตรฐาน บริษัทผู้ผลิตภายในประเทศอีก 3 บริษัท คือยาบริษัท H, I และ B ซึ่งเป็นตัวแทนยาเม็ดเมทธิลโดปาที่มีอัตราเร็วการละลายสูง ปานกลาง และต่ำ ตามลำดับ

2.2 อาสาสมัคร

อาสาสมัครเป็นชายไทย สุขภาพดี อายุเฉลี่ย 22 ปี (19-27 ปี) น้ำหนักตัวเฉลี่ย 58.8 กิโลกรัม (47.5-67.0 กิโลกรัม) และส่วนสูงเฉลี่ย 170 เซนติเมตร (155-185 เซนติเมตร) ไม่เป็นโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร ตับและไต ได้รับการตรวจเลือดและการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ทางห้องปฏิบัติการและมีค่าต่าง ๆ ทางคลินิกปกติก่อนเข้าร่วมการวิจัย (แสดงไว้ในภาคผนวก ค.) ทุกคนจะได้รับคำอธิบายถึงวิธีการวิจัยและยินยอมเข้าร่วมในการทดลองโดยสมัครใจ อาสาสมัครจะต้องไม่ได้ใช้ยาอื่น ๆ มาก่อนเริ่มการทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์ และในระหว่างการทดลอง

2.3 ขนาดและวิธีการให้ยา

อาสาสมัครแต่ละคนจะได้รับยาเม็ดเคลือบเมทธิลโดปาขนาด 250 มิลลิกรัมจำนวน 1 เม็ด โดยรับประทานครั้งเดียวพร้อมน้ำ 1 แก้วก่อนอาหารเช้า และมีเงื่อนไขดังนี้ อาสาสมัครจะต้องงดอาหารรวมทั้งเครื่องดื่มทุกชนิด ยกเว้นน้ำ ดินก่อนการทดลองอย่างน้อย 10 ชั่วโมง และหลังรับประทานยาแล้ว 2 ชั่วโมง ยาจะถูกจัดและให้เลขระหัสโดยอาสาสมัครไม่ทราบว่าเป็นยาของบริษัทใดและได้รับยาโดยการสุ่มด้วยวิธีจับฉลากในครั้งแรก และมีระยะห่างระหว่างการรับประทานยาแต่ละครั้งนาน 1 สัปดาห์

2.4 แบบแผนการทดลอง

การทดลองเป็นแบบ Randomized Latin-square crossover design อาสาสมัครแต่ละคนได้รับยาเม็ดครบทุกบริษัท แต่ลำดับที่ได้รับจะแตกต่างกันไปตามที่สุ่มได้

ตารางที่ 1 ตารางให้ยา 4 บริษัท (A, B, H, I) แบบ Randomized Latin-square crossover design

อาสาสมัครคนที่	(สัปดาห์) 1	2	3	4
1	A	B	H	I
2	B	H	I	A
3	H	I	A	B
4	I	A	B	H
5	A	B	H	I
6	B	H	I	A
7	H	I	A	B
8	I	A	B	H
9	A	B	H	I
10	B	H	I	A
11	H	I	A	B
12	I	A	B	H

2.5 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างถูกเก็บโดยการเจาะจากหลอดเลือดดำที่แขนครั้งละประมาณ 5 มิลลิลิตรก่อนรับประทานยาและที่เวลา 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 และ 24.0 ชั่วโมงหลังได้รับยา ใส่ตัวอย่างเลือดใน heparinized tube นำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เก็บพลาสมาซึ่งเป็นส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -10°C จนกว่าจะวิเคราะห์หาปริมาณยา (วิเคราะห์ภายใน 3 วัน)

2.6 การวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา

วิเคราะห์หาความเข้มข้นของเมทธิลโดปาในพลาสมาโดยวิธี high-performance liquid chromatography ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Gregory และคณะ (45) ดังนี้

2.6.1 การเตรียม stock solution

เมทธิลโดปาและ internal standard (3,4-dihydroxy benzylamine) จะแยกกันเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรทั้งคู่ โดยละลายยาหรือ internal standard ด้วย 0.005 M Sodium metabisulfite ซึ่งถูกปรับให้ได้ pH 2.62 ด้วย orthophosphoric acid (stock solution จะเตรียมแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ใช้ภายใน 3 วัน) จากนั้นทำaliquot ของเมทธิลโดปาให้ได้ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 30.0 40.0 และ 50.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยทำให้เจือจางด้วย 0.005 M Sodium metabisulfite สำหรับ internal standard ทำ aliquot ให้ได้ความเข้มข้น 1.0, 40.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเจือจางด้วย 0.005 M Ssodium metabisulfite (aliquot เตรียมแล้วใช้ทันทีภายใน 1 วัน)

2.6.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเมทธิลโดปาในพลาสมาเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

ปิเปต aliquot ของเมทธิลโดปาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 0.1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมพลาสมาที่ปราศจากยา 0.9 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex จะได้ความเข้มข้นของเมทธิลโดปาในหลอดทดลองดังนี้ 0.01, 0.02, 0.05, 0.08, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0,4.0 และ 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เติม internal standard 50 ไมโครลิตร โดยที่หลอดที่ใส่ aliquot ของเมทธิลโดปาที่มีความเข้มข้น 0.1 ถึง 0.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะเติม internal standard ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ขณะที่หลอดที่ใส่ aliquot ของเมทธิลโดปาที่มีความเข้มข้น 1.0 ถึง 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะเติม internal standard ที่มีความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.6.3 การสกัดเมทธิลโดปาจากพลาสมา

ตัวอย่างพลาสมา 1 มิลลิลิตร

- เติม Internal Standard (1) ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงไป 50 ไมโครลิตร ในพลาสมาตัวอย่างที่เก็บในช่วงเวลา 1.0 - 10.0 ชั่วโมง สำหรับพลาสมาตัวอย่างที่เก็บเวลา 0.5 และ 24.0 ชั่วโมง เติม internal standard ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรลงไป 50 ไมโครลิตร เขย่าด้วย vortex นาน 10 วินาที
- เติม 0.05 M Sodium metabisulfite (2) 0.1 มิลลิลิตร

- เติม 5% w/v EDTA (2) 0.1 มิลลิลิตร
- ปรับ pH ให้ได้ 7.0 โดยเติม 0.065 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer (2) 2 มิลลิลิตร
- ปรับ pH ให้ได้ 8.0-8.6 โดยเติม 1 M NaOH 1 หยด
- เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex นาน 20 วินาที
- เติม alumina (acid-wash)(2) 135 มิลลิกรัม

นำสารละลายไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบหมุนรอบ (Roller) นาน 15 นาที

- ตั้งทิ้งไว้ให้ alumina ตกตะกอน จากนั้นเทสารละลายส่วนบนทิ้งไป
- ล้าง alumina ด้วยน้ำ 2 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายไปปั่นที่ความเร็ว 440 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ก่อนเทสารละลายส่วนบนทิ้ง
- เติม 0.05 M orthophosphoric acid (2) 1 มิลลิลิตร

นำไปเขย่าด้วย Shaker นาน 15 นาที

- นำไปปั่นที่ความเร็ว 440 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

แยกเอาสารละลายส่วนบนไว้เพื่อนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

(1) Internal Standard = 3,4-Dihydroxybenzylamine

(2) แสดงการเตรียมไว้ในภาคผนวก ข.

2.6.4 ภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

เครื่องมือ : HPLC Programmable Solvent Delivery System Module MOdel 590, Electrochemical Detector Model 460, Fixed Loop Injector (Water Assoc., USA) Unicorder V-228 (Denshi kagaku, Japan)

Column : μ-Bondapak C_{18}, 10 m irregular, Stainless Steel Column, ขนาด 30 เซนติเมตร x 3.9 มิลลิเมตร (i.d.) (Water Assoc., USA)

Mobile phase : (0.07 MKH_2PO_4 + 0.1 mM EDTA + 5 mM Sodium Octanesulfonate ปรับให้ได้ pH 3.20 ด้วย orthophosphoric acid) : acetonitride = 92 : 8

อัตราการไหล (Flow rate) : 2.0 มิลลิลิตร/นาที

Electrochemical Detector : Ag-AgCl electrode (reference electrode) Glassy carbon (working electrode) Potential + 0.80 V., Filter 1 sec., Time

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

constant 1 sec., Attenunate 20 nA

ความเร็วกระดาษ (Chart speed) : 0.25 เซนติเมตร/นาที

ปริมาตรที่ฉีด (Inject volume) : 20 ไมโครลิตร

อุณหภูมิ : อุณหภูมิห้อง

2.6.5 การหาความเข้มข้นของเมทธิลโดปาในตัวอย่างพลาสมา

ค่าอัตราส่วนความสูงของpeak ระหว่างเมทธิลโดปามาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นกับ internal standard ซึ่งได้จาก chromatogram นำไปสร้างกราฟมาตรฐานโดย plot ระหว่าง peak height ratio กับ ความเข้มข้นของเมทธิลโดปาในพลาสมา จากนั้นหาความเข้มข้นของเมทธิลโดปาในตัวอย่างพลาสมาจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น และเพื่อให้มั่นใจได้ว่าไม่มีการแปรปรวนของขั้นตอนและวิธีการวิเคราะห์ตลอดเวลาของการทดลองเนื่องจากช่วงเวลาของการทดลองนี้ใช้เวลานาน จึงได้ทำการทดสอบความแม่นยำในระหว่างการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน และในระหว่างวัน (within-run และ between-run precision ตามลำดับ) ด้วย

2.7 <u>การวิเคราะห์ทางเภสัชจลนศาสตร์</u>

ค่าความเข้มข้นของเมทธิลโดปาในพลาสมาตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับยาเม็ดเมทธิลโดปาขนาด 250 มิลลิกรัมของทั้ง 4 บริษัท ถูกนำมาวิเคราะห์หาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ทั้งวิธีใช้ Compartment และวิธี Non-compartment

วิธี compartment วิเคราะห์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ RSTRIP โปรแกรม RSTRIP จะ stripping ข้อมูลให้สมการมาทั้งแบบสองและสาม exponential ได้แก่

$$C_t = A_1 e^{-K_1 t} - A_2 e^{-K_2 t} \quad \text{——————} \quad (1)$$

$$C_t = A_1 e^{-K_1 t} + A_2 e^{-K_2 t} - A_3 e^{-K_3 t} \quad \text{———} \quad (2)$$

ซึ่งแสดงว่ายามีพฤติกรรมในร่างกายแบบหนึ่งหรือสอง compartment ตามลำดับ จากการ stripping จะได้ค่า initial parameter เช่น A_1, A_2, K_1, K_2 ..... เป็นต้น

จากนั้นโปรแกรมจะ iteration ข้อมูลแบบ least square ข้อมูลต่อไปทั้งสมการแบบสองและสาม exponential ในขั้นสุดท้าย โปรแกรมจะคำนวณค่า microparameter ให้ เช่น ค่าคงที่อัตราเร็วการดูดซึม (K_a) ค่าคงที่อัตราเร็วการกำจัด (K_{el}) ค่าความเข้มข้นของยาในพลาสมาสูงสุด (C_{pmax}) เวลาที่ความเข้มข้นของยาในพลาสมาสูงสุด (t_{max}) พื้นที่ใต้กราฟความเข้มข้นของยาในพลาสมา-เวลา ($AUC_{0\rightarrow t}$ และ $AUC_{0\rightarrow\infty}$) mean residence time (MRT) เป็นต้น

สมการที่ใช้คำนวณค่า microparameter ดังกล่าวมีดังนี้

ค่า K_a และ K_{el} หาได้จาก residual method ดังแสดงในภาคผนวก ฎ.

$$t_{max} = [1/(K_2-K_1)\ln(K_2/K_1)] + t_0 \qquad (3)$$

$$C_{max} = A_1e^{-K_1(t_{max}-t_0)} - A_2e^{-K_2(t_{max}-t_0)} \qquad (4)$$

$$AUC_{0\rightarrow t} = (A_1/K_1) + (A_2/K_2) \qquad (5)$$

$$AUC_{t\rightarrow\infty} = C_t/K_1 \qquad (6)$$

$$AUMC_{0\rightarrow t} = (A_1/K^2_1) + (A_2/K^2_2) \qquad (7)$$

$$AUMC_{t\rightarrow\infty} = (t.C_t)/K_1 + (C_t)/K^2_1 \qquad (8)$$

$$MRT = (AUMC_{0\rightarrow\infty})/(AUC_{0\rightarrow\infty})$$

$$= (AUMC_{0\rightarrow t} + AUMC_{t\rightarrow\infty})/(AUC_{0\rightarrow t} + AUC_{t\rightarrow\infty}) \qquad (9)$$

วิธี Non-compartment (model independent) เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลโดยไม่จำเป็นต้องแบ่งร่างกายออกเป็น compartment ไม่ต้องคำนึงว่าพฤติกรรมของยาจะเป็นแบบกี่ compartment หรือกี่ exponential วิเคราะห์โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม Non-compartment ให้ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ เช่น

- พื้นที่ใต้กราฟความเข้มข้นของยาในพลาสมา-เวลาตั้งแต่เวลาศูนย์ถึง t (area under the plasma concentration - time curve, $AUC_{0\rightarrow t}$) คำนวณด้วยกฎพื้นที่สี่เหลี่ยมคางหมู (linear trapezoidal rule) และพื้นที่ใต้กราฟความเข้มข้นของยาในพลาสมา-เวลาตั้งแต่ t ถึงเวลาอนันต์ ($AUC_{t\rightarrow\infty}$) มีค่าเท่ากับ C_t/K_1 (โดยที่ C_t คือความเข้มข้นของยาในพลาสมาที่เวลาสุดท้าย)

- พื้นที่ใต้กราฟความเข้มข้นของยาในพลาสมา.เวลา-เวลาตั้งแต่เวลาศูนย์ถึง t (area under the moment curve, $AUMC_{0 \rightarrow t}$) คำนวณด้วยกฎพื้นที่สี่เหลี่ยมคางหมู และพื้นที่ใต้กราฟความเข้มข้นของยาในพลาสมา.เวลา-เวลาตั้งแต่เวลา t ถึงเวลาอนันต์($AUMC_{t \rightarrow \infty}$) มีค่าเท่ากับ $(t.C_t)/K_1 + (C_t)/K_1^2$ (โดยที่ t คือเวลาสุดท้าย และ C_t คือความเข้มข้นที่เวลาสุดท้าย)

- mean residence time (MRT)

ค่าพารามิเตอร์ดังกล่าวแสดงได้ด้วยสมการดังนี้

$$AUC_{0 \rightarrow \infty} = \int_0^t C_t.dt + C_t/K_1 \qquad (10)$$

$$AUMC_{0 \rightarrow \infty} = \int_0^t t.C_t.dt + (t.C_t)/K_1 + (C_t)/K_1^2 \qquad (11)$$

$$MRT = (AUMC_{0 \rightarrow \infty})/(AUC_{0 \rightarrow \infty}) \qquad (12)$$

พารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์จะนำมาพิจารณาร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลดิบด้วยตาเพื่อตัดสินว่า สมการใดจะใช้อธิบายข้อมูลได้ดีที่สุด สมการใดจะใช้อธิบายพฤติกรรมของยาในร่างกายได้เหมาะสมที่สุด

2.8 <u>การประเมินการเอื้อประโยชน์ในร่างกายและการวิเคราะห์ทางสถิติ</u>

เปรียบเทียบการเอื้อประโยชน์ในร่างกายของยาเม็ดเมทธิลโดปา 4 บริษัทโดยใช้ค่าพารามิเตอร์ต่อไปนี้ :

ก. พื้นที่ใต้กราฟความเข้มข้นของยาในพลาสมา-เวลา ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$)
ข. ความเข้มข้นของยาในพลาสมาสูงสุด (C_{pmax})
ค. ระยะเวลาที่ความเข้มข้นของยาในพลาสมาสูงสุด (t_{max})
ง. ค่าคงที่อัตราเร็วการดูดซึม (K_a)
จ. mean residence time (MRT)

โดยที่พื้นที่ใต้กราฟความเข้มข้นของยาในพลาสมา-เวลา เป็นพารามิเตอร์ที่บ่งชี้ถึงขอบข่ายหรือปริมาณที่เข้าสู่ร่างกายว่ามากน้อยเพียงใด ขณะที่ระยะเวลาที่ความเข้มข้นของยาในพลาสมาสูงสุด ค่าคงที่อัตราเร็วการดูดซึมและ MRT เป็นพารามิเตอร์ที่บ่งชี้ถึงอัตราเร็วในการดูดซึมว่าเร็วช้าเพียงใด และความเข้มข้นของยาในพลาสมาสูงสุดเกี่ยวพันกันทั้งอัตราเร็วและขอบข่ายการดูดซึมของยา

นำค่าต่าง ๆ มาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อดูว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน และหากพบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ก็จะทดสอบว่าคู่ใดมีความแตกต่างโดยใช้ Student's t-test

3. <u>ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าพารามิเตอร์ของการทดลองในหลอดทดลองและการทดลองในร่างกาย</u>

ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าพารามิเตอร์ของการทดลองในหลอดทดลองและของการทดลองในร่างกายโดยการหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) จากนั้นใช้ t-test เพื่อทดสอบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ (ดูในภาคผนวก ฎ) ค่าพารามิเตอร์ในการทดลองในหลอดทดลองที่สนใจได้แก่ เวลาที่ใช้ในการแตกกระจายตัวและค่าคงที่อัตราเร็วของการละลาย ส่วนค่าพารามิเตอร์ของการทดลองในร่างกาย ถ้าการประเมินผลในข้อ 2.8 พบว่า พารามิเตอร์ใดมีความแตกต่างกันระหว่างบริษัทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็จะนำมาศึกษาหาความสัมพันธ์กับพารามิเตอร์ที่ได้จากการทดลองในหลอดทดลองต่อไป ซึ่งในที่นี้ได้แก่ พารามิเตอร์ที่เกี่ยวกับอัตราเร็วในการดูดซึมของยา เช่น ค่าคงที่อัตราการดูดซึม (K_a) เวลาที่ความเข้มข้นของยาในพลาสมาสูงสุด (t_{max}) และ mean residence time (MRT) เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย