บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

1. วัสดุ

ผลิตภัณฑ์ยาที่ใช้ทดสอบ

ทำการสุ่มซื้อยาแคปซูลไพรอกซิแคมขนาด 10 มิลลิกรัมให้ได้มากตำรับที่สุดจากสถานพยาบาลทั้งของรัฐบาลและเอกชนรวมทั้งและร้านขายยาต่าง ๆ ในกรุงเทพมหานครและต่างจังหวัด โดยใช้ Feldene(R) ขนาด 10 มิลลิกรัมแคปซูลเป็นตำรับต้นแบบ รายละเอียดสำหรับผลิตภัณฑ์ยาที่นำมาทำการทดสอบแสดงไว้ในภาคผนวก ก.

สารเคมี

1. ผงยาไพรอกซิแคมมาตรฐานที่ใช้อ้างอิง (working standard piroxicam powder) Biolab Co., Ltd. Lot No. PTC-2101 ความแรง 99.8%
2. ผงยาทีนอกซิแคมมาตรฐานที่ใช้อ้างอิง (working standard tenoxicam powder) Biolab Co. Ltd. Lot No. CHS-1691 ความแรง 99.97%
3. เมทานอล (methanol GR) E. Merck, Germany Lot No. 111 K 15638609
4. กรดเกลือเข้มข้น (concentrated hydrochloric acid. GR) E. Merck, Germany Lot No. 940 K 13065917
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide GR) E. Merck, Germany Lot No. 820

6. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate GR.) E. Merck, Germany Lot No. 022 A502173
7. เฮพาริน 5000 ยูนิต/มิลลิลิตร (heparin 5000 IU/ml) Leo. Pharmaceutical Product Lot No. K08B
8. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) E. Merck, Germany Lot No. 009 K13577604
9. ไตรเอทานอลามีน (triethanolamine) Industrial & Pharmaceutical Trade Lot No. TF 02.

<u>เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. เครื่องชั่งวิเคราะห์ (analytical balance) Sartorius 1615 MP, West Germany
2. เครื่องทดสอบการแตกกระจายตัวของยาเม็ด (disintegration tester) Model 64-700-136 Hanson research corp., Northridge, Calif., U.S.A.
3. เครื่องทดสอบการละลายของยาเม็ด (dissolution apparatus) 72 RL, Hanson Research Corp., Northridge Calif, U.S.A.
4. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) Spectronic 2000, Bausch and Lomb, N.Y., U.S.A.
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง เชิงตัวเลข (digital pH meter) Orion Model SA 520, Orion Research, U.S.A.
6. เครื่องผสมกระแสวน (vortex mixer) Vortex-Genuine, Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., U.S.A.
7. เครื่องหมุนเหวี่ยง (refrigerated centrifuge) Sigma 302K Lab. Centrifuge Gmbitt, West Germany
8. โซนิเคเตอร์ (sonicator) Bransonic, Branson a Smith Kline Company, U.S.A.

9. ไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ ลิควิด โครมาโทกราฟี (high Performance Liquid Chromatography) LC-3A Shimadzu, Japan

10. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่น ๆ ที่ใช้ในห้องทดลองปฏิบัติการทั่วไป

วิธีการวิจัย

การวิจัยนี้มี 2 ขั้นตอนคือ การวิจัยในหลอดทดลอง และการวิจัยในร่างกาย

ขั้นตอนที่ 1 การวิจัยในหลอดทดลอง

ผลิตภัณฑ์ยาแคปซูลไพรอกซิแคมทุกตำรับจะถูกนำมาทำการทดลองตามข้อกำหนดของเภสัชตำรับดังนี้

1.1 วิเคราะห์ดูความแปรปรวนของน้ำหนักของยาแคปซูล ตามที่กำหนดในเภสัชตำรับ B.P. 1988 โดยสุ่มยาแคปซูลบริษัทละ 20 แคปซูลมาทำการชั่งทั้งแคปซูล (intact capsule) ทีละ 1 แคปซูล เปิดแคปซูลออกโดยไม่ให้เสียสิ่งใดในส่วนของเปลือก และเอาเนื้อยาข้างในออกให้หมดเท่าที่จะทำได้แล้วชั่งเปลือกแคปซูล น้ำหนักของเนื้อยาเท่ากับผลต่างของการชั่งทั้งสอง แล้วนำผลมาคำนวณหาน้ำหนักเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

1.2 วิเคราะห์หาปริมาณของตัวยาสำคัญในยาแคปซูลไพรอกซิแคม ตามวิธีที่ระบุในเภสัชตำรับ USP XXII โดยนำยาแคปซูลไพรอกซิแคมจำนวน 20 แคปซูล มาแกะเปลือกแคปซูลออกแล้วเอาผงยาออกมาให้หมด แบ่งชั่งผงยาให้มีปริมาณยาไพรอกซิแคมเทียบเท่ากับ 50 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดตวงปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 0.01 นอร์มัล เมทานอลิก ไฮโดรคลอริก แอซิด (0.01 N. methanolic hydrochloric acid) ประมาณ 70 มิลลิลิตร เขย่านาน 30 นาที ปรับปริมาตรและผสมแล้วนำไปปั่นให้ตกตะกอนจนได้สารละลายส่วนใส ดูดสารละลายส่วนใสออกมา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดตวงปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผสมด้วย 0.01 นอร์มัล เมทานอลิก ไฮโดรคลอริก แอซิด ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงโดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์เทียบกับสารละลายมาตรฐานไพรอกซิแคมที่เตรียมในขนาดความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรใน 0.01 นอร์มัล เมทานอลิกไฮโดรคลอริก แอซิด ที่ความยาวคลื่น 333 นาโมเมตร แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซนต์ปริมาณตัวยาที่ระบุไว้ในฉลาก (% Labeled amount) โดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปริมาณตัวยาที่ระบุไว้ในฉลาก (\% Labeled amount)} = \frac{A_u \times C_s \times 500 \times \text{mean wt} \times 100}{A_s \times \text{น้ำหนักผงยาตัวอย่าง} \times 10}$$

เมื่อ A_u = การดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารละลายตัวอย่างไพรอกซิแคม

A_s = การดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารละลายไพรอกซิแคมมาตรฐาน

C_s = ความเข้มข้นของสารละลายไพรอกซิแคมมาตรฐาน

mean wt = น้ำหนักเฉลี่ยของยาแคปซูล

1.3 วิเคราะห์ความสม่ำเสมอของตัวยาสำคัญในแต่ละแคปซูล ตามวิธีที่กำหนดในเภสัชตำรับ USP XXII โดยใช้ยาไพรอกซิแคม 1 แคปซูล ละลายด้วย 0.01 นอร์มัล เมทานอลิก ไฮโดรคลอริก แอซิด ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เขย่านาน 30 นาที ปั่นให้ตกตะกอนกรองเอาส่วนใสออกมาวัดการดูดกลืนแสงโดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์เทียบกับสารละลายมาตรฐานไพรอกซิแคมที่เตรียมในความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใน 0.01 นอร์มัล เมทานอลิก ไฮโดรคลอริก แอซิด ที่ความยาวคลื่น 333 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณตัวยาที่ระบุไว้ในฉลากโดยใช้สูตร

เปอร์เซ็นต์ปริมาณตัวยาที่ระบุไว้ในฉลาก (% Labeled amount) $= \frac{A_u \times C_s \times 100 \times 100}{A_s \times 10}$

เมื่อ A_u = การดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารละลายตัวอย่างไพรอกซิแคม

A_s = การดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารละลายไพรอกซิแคมมาตรฐาน

C_s = ความเข้มข้นของสารละลายไพรอกซิแคมมาตรฐาน

1.4 วิเคราะห์หาเวลาที่ใช้ในการแตกกระจายตัวของยาแคปซูล ตามที่ระบุไว้ในเภสัชตำรับ B.P. 1988 โดยนำยามา 6 แคปซูลใส่ยาแต่ละแคปซูลลงในหลอดของเครื่องมือทดสอบหาการแตกกระจายตัวหลอดละ 1 เม็ด แล้วปิดทับด้วยแผ่นดิสก์ (disc) ทำการทดลองโดยใช้น้ำเป็นตัวกลางอุณหภูมิ $37 \pm 1^{\circ}C$ แล้วจับเวลาตั้งแต่เริ่มเปิดเครื่องจนกระทั่งยาแคปซูลในแต่ละหลอดแตกกระจายตัวลอดผ่านตะแกรงออกไปจนหมด นำเวลาที่ใช้ในการแตกกระจายตัวของทั้ง 6 แคปซูล มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

1.5 วิเคราะห์หาการละลายของยา ตามวิธีที่กำหนดในเภสัชตำรับ USP XXII โดยใช้เครื่องมือประเภทที่ 1 (Type I basket method) โดยมีสารละลายเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (simulated gastric fluid T.S.) เตรียมโดยปราศจากเปปซิน (pepsin) pH 1.2 ± 0.1 อุณหภูมิ $37 \pm 0.5^{\circ}C$ เป็นตัวกลาง (การเตรียมดูในภาคผนวก ข.) เครื่องมือหมุนด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 5 มิลลิลิตร ที่เวลา 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 135, 150, 165, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 330 และ 360 นาที แล้วเติมตัวกลางทำละลายที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ $37 \pm 0.5^{\circ}C$ ลงไป 5 มิลลิลิตร ทุกครั้งเมื่อดูดสารละลายตัวอย่างขึ้นมา นำสารละลายตัวอย่างที่เก็บที่ช่วงเวลาต่าง ๆ มาวัดหาค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 333 นาโนเมตร คำนวณหา %

การละลายของยาไพรอกซิแคมโดยใช้กราฟมาตรฐาน แล้วนำค่า % การละลายของยาที่เวลาต่าง ๆ มาสร้างเส้นกราฟการละลายของยา (dissolution profile) และคำนวณหาค่าอัตราเร็วคงที่ของการละลายของยาโดยใช้วิธีซิกมา-ไมนัส (sigma-minus)

การทำกราฟมาตรฐานสำหรับการคำนวณหาการละลายของยา

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน (stock standard solution) ของตัวยาไพรอกซิแคมในสารละลายเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร ที่ปราศจากเปปซิน pH 1.2 $\pm$ 0.1 ให้มีความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่งไพรอกซิแคม (working standard 99.8%) มา 0.0501 กรัมละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานของไพรอกซิแคมให้มีความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยดูดสารละลายมาตรฐานจากข้อ 1 (stock standard solution) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 มิลลิลิตร ตามลำดับแล้วเจือจางด้วยสารละลายเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหารปราศจากเปปซิน pH 1.2$\pm$0.1 จนครบ 50 มิลลิลิตร

3. นำสารละลายมาตรฐานเหล่านี้ไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) โดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 333 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแล้วหาค่าความลาดชันและจุดตัดแกนตั้งของเส้นกราฟ (y) โดยใช้หลักสมการเส้นตรงดังสมการ

$$y = a + bx$$

เมื่อ y = ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้

x = ความเข้มข้นของไพรอกซิแคม (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

b = ความลาดชัน

a = จุดตัดแกนตั้งของเส้นกราฟ

และใช้สมการนี้เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างในการทดลอง

1.6 การประเมินผล นำข้อมูลที่ได้มาพิจารณาว่ายาแคปซูลไพรอกซิแคมของบริษัทใดได้มาตรฐานตามที่กำหนดในเภสัชตำรับ แล้วเปรียบเทียบหาความแตกต่างของเวลาที่ใช้ในการแตกกระจายตัว และอัตราเร็วคงที่ของการละลายของยาแคปซูลไพรอกซิแคม 10 มิลลิกรัมของบริษัทต่าง ๆ ที่ผลิตได้เองภายในประเทศกับผลิตภัณฑ์ต้นแบบโดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และ t-test

ขั้นตอนที่ 2 : การวิจัยในร่างกาย

เป็นขั้นตอนการวิจัยเพื่อหาการเอื้อประโยชน์ในร่างกายของยาแคปซูลไพรอกซิแคมในอาสาสมัครคนไทย การวิจัยในขั้นตอนนี้มีดังนี้

2.1 ตัวอย่างยาแคปซูล

ยาแคปซูลไพรอกซิแคมที่จะนำมาศึกษาคัดเลือกมาจากผลิตภัณฑ์ของ 4 บริษัท โดยพิจารณาจากคุณสมบัติการละลายของยาเป็นหลัก ได้แก่

- ผลิตภัณฑ์ต้นแบบ คือ Feldene(R) 10 มิลลิกรัมแคปซูล
- ผลิตภัณฑ์ที่มีผลการทดลองในหลอดทดลองคือ อัตราการละลายเร็ว
- ผลิตภัณฑ์ที่มีผลการทดลองในหลอดทดลองคือ อัตราการละลายปานกลาง
- ผลิตภัณฑ์ที่มีผลการทดลองในหลอดทดลองคือ อัตราการละลายช้า

2.2 อาสาสมัครใช้คนปกติ มีสุขภาพดี เพศชายล้วนจำนวน 24 คน เป็นคนไทยอายุระหว่าง 20-50 ปี ไม่เป็นโรคตับ โรคไต และโรคระบบทางเดินอาหาร ไม่ได้รับยาอื่นใดก่อนเริ่มการทดลอง 1 สัปดาห์และตลอดระยะเวลาการทดลองไม่แพ้ยาไพรอกซิแคม อาสาสมัครทุกคนได้รับฟังคำอธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการทดลองโดยละ

เอียดเกี่ยวกับตัวยา การทดลองรวมทั้งฤทธิ์ข้างเคียงต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นระหว่างการทดลอง และยินยอมเข้าร่วมการทดลองโดยความสมัครใจ คุณสมบัติของอาสาสมัครแต่ละคนแสดงไว้ในภาคผนวก ค.

2.3 แบบแผนการทดลอง

เนื่องจากยามีค่าครึ่งชีวิตยาวนาน ดังนั้นเพื่อความเหมาะสมจึงออกแบบการทดลองเป็นแบบการทดลองข้ามชนิดไม่สมบูรณ์ (incomplete cross over design) อาสาสมัครแต่ละคนจะได้รับยาคนละ 2 ตำรับแตกต่างกันไป ห่างกันอย่างน้อย 3 สัปดาห์ เพื่อให้แน่ใจว่ายาถูกขับถ่ายออกจากร่างกายหมดก่อนจะรับประทานยาตำรับต่อไป ดังตารางที่ 1 โดยยาแต่ละตำรับจะให้อาสาสมัครรับประทาน 12 คน และยาแต่ละตำรับจะมีการรับประทานนำซึ่งกันและกัน

2.4 ขนาดและวิธีการให้ยา

อาสาสมัครแต่ละคนจะได้รับยาแคปซูลไพรอกซิแคมขนาด 10 มิลลิกรัม จำนวน 2 แคปซูลพร้อมน้ำ 1 แก้ว

2.5 เงื่อนไขการทดลอง

2.5.1 อาสาสมัครจะต้องงดอาหาร และเครื่องดื่มทุกชนิดยกเว้นน้ำก่อนการทดลองอย่างน้อย 10 ชั่วโมง และหลังรับประทานยาแล้ว 2 ชั่วโมง

2.5.2 ผลิตภัณฑ์ยาแต่ละชนิดจะถูกจัดและให้รหัส โดยอาสาสมัครไม่ทราบว่าเป็นยาของบริษัทใด

2.5.3 อาสาสมัครจะได้รับยา โดยการสุ่มด้วยวิธีจับฉลาก

2.5.4 ระยะห่างระหว่างการทดลองแต่ละครั้งนานอย่างน้อย 3 สัปดาห์

ตารางที่ 1 แบบแผนการทดลองข้ามชนิดไม่สมบูรณ์

อาสาสมัครคนที่	ชนิดยาที่รับประทานสัปดาห์ที่	
	1	4
1	A	B
2	B	C
3	C	D
4	D	A
5	B	D
6	A	C
7	B	A
8	C	B
9	D	C
10	A	D
11	D	B
12	C	A
13	A	B
14	B	C
15	C	D
16	D	A
17	B	D
18	A	C
19	B	A
20	C	B
21	D	C
22	A	D
23	D	B
24	C	A

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6 การเก็บตัวอย่างเลือด

จัดเก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะจากหลอดเลือดดำบริเวณแขนครั้งละ 7-10 มิลลิลิตร ก่อนการให้ยาและที่เวลา 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 120, 168 ชั่วโมงหลังการให้ยา ตัวอย่างเลือดทั้งหมดจะนำมาปั่นเพื่อแยกเอาพลาสมาออกมาโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกพลาสมาออกมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกระทั่งถึงเวลาวิเคราะห์

2.7 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดจากการเจาะเลือดมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของยา ด้วยวิธีที่พัฒนามาจากวิธีการของ J.S. Dixon และ J.R. Lowe (Dixon,J.S., 1984) โดยใช้ไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ขั้นตอนการวิเคราะห์จะประกอบด้วย

2.7.1 เครื่องมือวิเคราะห์

เครื่องสำเร็จ (apparatus) : เครื่องสูบ (pump) HPLC LC-3A, Shimadzu, Japan
เครื่องตรวจหา (detector) SPD-1 spectrophotometric
เครื่องรวมหน่วย (integrator) C-RIA Chromatopac

คอลัมน์ (column) : Lichrospher(R); C_{18}, endcapped 5 um, 125 x 4 m.m.

พรี-คอลัมน์ (pre-column) : Lichro CART(R); RP-18, endcapped 5 um, 4 x 4 m.m.

วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) : 40:60 โดยปริมาตรของเมทานอลต่อ 0.085 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (pH 5.6) (v/v methanol : 0.085 M phosphate buffer pH 5.6)

ผสมกับ ไตรเอทานอลามีน 0.1 มิลลิลิตร (0.1 ml of triethanolamine)

อินเทอร์นอล สแตนดาร์ด (internal standard) : ทีนอกซิแคม 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรในน้ำ (tenoxicam 10 mcg/ml in water)

เครื่องตรวจหา (detector) : อัลตราไวโอเลต 361 นาโนเมตร (UV 361 nm)

อัตราเร็วของการไหล (Flow rate) : 1 มิลลิลิตร/นาที (1 ml/min)

ปริมาตรที่ฉีด (injection volume) : 20 ไมโครลิตร (20 mcl)

รีเทนชั่น ไทม์ (retention time) : สำหรับไพรอกซิแคม 4.1 นาที
สำหรับทีนอกซิแคม 3.1 นาที

2.7.2 การเตรียมตัวอย่างพลาสมา ทำตามขั้นตอนดังนี้

พลาสมา 1 มิลลิลิตร

↓ - เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร
- เติมสารละลายทีนอกซีแคม (10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 100 ไมโครลิตร
- เติม 0.1 โมลาร์ ไฮโดรคลอริก แอซิด 1 มิลลิลิตร)

ผสมแบบหมุนอย่างเร็ว (whirly mixed) 5000 รอบ/นาที นาน 15 วินาที

↓ - เติมไดคลอโรมีเทน 8 มิลลิลิตร

ปิดฝา เขย่าแนวนอนด้วยเครื่องเขย่าความแรง 400 รอบ/นาที นาน 3 นาที

↓

หมุนเหวี่ยงที่ 1,800 รอบ/นาที ที่ 10°C นาน 10 นาที

↓

แยกเอาชั้นล่าง (organic phase) มา 4 มิลลิลิตร

↓

ระเหยให้แห้งโดยใช้แก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ < 35°C

↓ - เติมวัฏภาคเคลื่อนที่ 125 ไมโครลิตร

ฉีดสารละลาย 20 ไมโครลิตรเข้าเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ ลิควิด โครมาโตกราฟี

คำนวณหาอัตราส่วนระหว่างความสูงของเส้นโค้งของยาต่อความสูงของเส้นโค้งของอินเทอร์นอล สแตนดาร์ด นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบหาค่าความเข้มข้นของยาในพลาสมากับกราฟมาตรฐาน

<u>การทำกราฟมาตรฐานสำหรับคำนวณหาความเข้มข้นของยาในพลาสมา</u>

เตรียมสารละลายมาตรฐานของยาไพรอกซิแคมในพลาสมาให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.2, 2.0, และ 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำสารละลายเหล่านี้ไปวิเคราะห์ด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ ลิควิด โครมาโตกราฟีตามวิธีที่ได้กล่าวข้างต้น แล้วคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างความสูงของเส้นโค้งของยาต่อความสูงของเส้นโค้งของอินเทอร์นอล สแตนดาร์ด นำค่าอัตราส่วนความสูงของเส้นโค้งเหล่านี้ และค่าความเข้มข้นของยาไปสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้หลักสมการเส้นตรง

2.8 ความสมบูรณ์ของการสอบวิเคราะห์ (assay validation)

วิธีวิเคราะห์จะถูกประเมินตามวิธีดังต่อไปนี้

2.8.1 ความแม่นยำ (precision)

ก. ความแม่นยำของการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (within run precision) ของการสกัดและโครมาโตกราฟ (chromatograph) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ หาโดยการวิเคราะห์กราฟมาตรฐาน 3 เส้นที่ทำภายในวันเดียวกัน แล้วเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างความสูงของเส้นโค้งของไพรอกซิแคมต่อทีนอกซีแคม แล้วคำนวณหาสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (Coefficient of variation, % CV) สำหรับแต่ละความเข้มข้น

ข. ความแม่นยำของการวิเคราะห์ระหว่างวัน (between run precision) ของการสกัดและโครมาโตกราฟ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ทำโดยการเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานที่ทำในแต่ละวัน (จำนวน 4 วัน) และคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย

ค. การได้กลับคืน (recovery)

เปรียบเทียบความสูงของเส้นโค้ง (peak height) ของความเข้มข้นต่างๆ ของไพรอกซิแคม และทีนอกซิแคม ที่ความเข้มข้น 6 ค่า คือ 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เปรียบเทียบผลที่ได้จากสารละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่และจากพลาสมา เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (% recovery) ของไพรอกซิแคม และอินเทอร์นอล สแตนดาร์ด คำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน (percent recovery)} = \frac{\text{ความสูงของเส้นโค้งที่ได้จากการสกัดสารจากพลาสมา}}{\text{ความสูงของเส้นโค้งที่ได้จากสารละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่}} \times 100$$

2.9 การวิเคราะห์และประเมินผลข้อมูล

2.9.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์

จากค่าความเข้มข้นของยาไพรอกซิแคมที่เปลี่ยนแปลงไปตามเวลาต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ยาแคปซูลแต่ละตำรับในอาสาสมัครแต่ละคนจะนำมาวิเคราะห์หาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ที่เกี่ยวข้องโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ CSTRIP ผลการวิเคราะห์พบว่า เภสัชจลนศาสตร์ของยาแคปซูลไพรอกซิแคมเป็นแบบเปิดห้องเดียว (one-compartment open model) ที่มีการดูดซึมยาและการขจัดยาเป็นแบบจลนศาสตร์อันดับที่ 1 (First-order process) โดยสมการสำหรับคำนวณหาความเข้มข้นของยาในพลาสมาเขียนได้ดังนี้ (Shargel, L. 1980)

$$C_t = Ae^{-Kt} - Ae^{-K_a t}$$

เมื่อ C_t = ความเข้มข้นของยาไพรอกซิแคมในพลาสมาที่เวลาใด ๆ

t = เวลา

A = ค่าคงที่ = ความเข้มข้นของยาที่จุดตัดบนแกน Y

K = อัตราเร็วคงที่ของการขจัดยา

K_a = อัตราเร็วคงที่ของการดูดซึมยา

ค่าพารามิเตอร์ A, K และ K_a ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้คอมพิวเตอร์ ส่วนพารามิเตอร์อื่นซึ่งจำเป็นต้องใช้ในการเปรียบเทียบหาความแตกต่างระหว่างตำรับยาต่าง ๆ อันได้แก่ความเข้มข้นของยาสูงสุดในพลาสมา (C_{max}) เวลาที่ความเข้มข้นของยาสูงสุดในพลาสมา (t_{max}) พื้นที่ใต้เส้นโค้งของความเข้มข้นของยาในพลาสมากับเวลา (AUC) และค่าครึ่งชีวิตของยา ($t_{1/2}$) จะคำนวณโดยสมการตามลำดับดังนี้

$$C_{max} = Ae^{-Kt_{max}} - Ae^{-K_a t_{max}} \quad \text{.....สมการ (1)}$$

$$t_{max} = \frac{\ln (K_a/K)}{(K_a - K)} \quad \text{.....สมการ (2)}$$

$$AUC = \frac{A}{K} - \frac{A}{K_a} \quad \text{.....สมการ (3)}$$

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{K} \quad \text{.....สมการ (4)}$$

นอกจากนี้ยังหาค่าความเข้มข้นของยาสูงสุดในพลาสมา, เวลาที่ความเข้มข้นของยาสูงสุดในพลาสมาได้จากข้อมูลจริง และหาพื้นที่ใต้เส้นโค้งระหว่างความเข้มข้นของยา-เวลาจากข้อมูลจริงโดยใช้วิธีกฎสี่เหลี่ยมคางหมู (trapezoidal rule) เพื่อการพิจารณาเปรียบเทียบผลกับวิธีวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.9.2 การประเมินผลความสมมูลของยาในร่างกาย

พารามิเตอร์ที่ใช้ในการประเมินได้แก่ C_{max}, t_{max} และ AUC ซึ่งจะทำการเปรียบเทียบและหาความแตกต่างของพารามิเตอร์เหล่านี้ที่ได้รับจากอาสาสมัครแต่ละคน หลังจากการให้ยาแคปซูลไพรอกซิแคมตำรับต่าง ๆ โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และ t-test ผลการประเมินจะทำให้ทราบว่าผลิตภัณฑ์ยาตำรับต่าง ๆ มีความสมมูลกันในร่างกาย เมื่อค่าพารามิเตอร์ที่นำมาทดสอบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.9.3 การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการทดลองในหลอดทดลอง คือ เวลาที่ใช้ในการแตกกระจายตัวของยา และอัตราการละลายของยากับค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการทดลองในร่างกายคือ C_{max}, t_{max} และ AUC เพื่อดูว่าขั้นตอนใดระหว่างเวลาที่ใช้ในการแตกกระจายตัวของยาแคปซูล หรืออัตราการละลายของยาเป็นขั้นตอนที่มีผลต่อการเอื้อประโยชน์ในร่างกายของยา โดยใช้การทดสอบสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient)

2.10 ข้อกำหนด

2.10.1 เภสัชจลนศาสตร์ของยาแคปซูลไพรอกซิแคมเป็นแบบเชิงเส้น (Linear) นั่นคืออัตราเร็วของการขจัดยา หรือกระบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในร่างกาย เช่น การกระจายยาจะแปรตามปริมาณหรือความเข้มข้นของยาที่มีอยู่ในร่างกาย หรืออีกนัยหนึ่งจะกล่าวได้ว่ากระบวนการต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นล้วนเป็นแบบจลนศาสตร์อันดับหนึ่ง (First-order process)

2.10.2 การศึกษาเปรียบเทียบเพื่อหาความแตกต่างของค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ทางสถิติจะใช้ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%