

## บทที่ 2

### อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

#### วัสดุ

##### 1. ผลิตภัณฑ์ทดสอบ

ยาเม็ด propranolol ขนาด 40 มก. จาก 4 บริษัท ให้รหัสบริษัทเป็น A, B, C และ D แทนผลิตภัณฑ์ยาจากบริษัทต่าง ๆ

##### เกณฑ์การเลือกยานำมาศึกษา 4 ชนิด

เลือกศึกษา ยา propranolol 3 ชนิด จาก 6 ชนิดที่หาซื้อได้ในท้องตลาด เพื่อมาศึกษาเปรียบเทียบการเอื้อประโยชน์ในร่างกายเปรียบเทียบกับบริษัทต้นแบบ โดยเลือกจากการศึกษาการละลาย และเวลาที่ใช้ในการกระจายตัวของยาทั้ง 6 ชนิด พบว่า ปริมาณยา propranolol ที่ละลายใน 1% HCl และเวลาที่ใช้ในการแตกกระจายตัวเข้ามาตรฐาน USPXXII ทั้ง 6 ชนิด ดังนั้นจึงเลือกศึกษา ยา propranolol จากบริษัทที่ใช้เวลาในการกระจายตัวสูง, กลาง และต่ำแตกต่างกันมาก คือ 15 วินาที, 9 นาที และ 16 นาที

##### 2. สารเคมี

ชื่อ	ผู้ผลิต
2.1 Glacial acetic acid (AR)	วิทยาศาสตร์ กรุงเทพฯ
2.2 Diethyl ether (AR)	May & Baker Ltd. Dagenhorn England.
2.3 1-Heptane-sulfonic acid sodium salt	Sigma chemical CO. (USA)

ชื่อ	ผู้ผลิต
2.4 Methanol (HPLC)	Baker analyzed, England
2.5 Sodium carbonate anhydrous (AR)	Mallinckrodt, Inc., USA
2.6 Sodium metabisulfite	Merck, German
2.7 Internal standard, Labetalol Hydrochloric	Sigma, USA
2.8 DL-propranolol Hydrochloride	Sigma, USA
2.9 Heparin 5,000 unit/ml	Leo, Denmark
2.10 Nitrogen Gas	TIG GAS, Thailand

### 3. เครื่องมือ HPLC

	ผู้ผลิต
3.1 High performance liquid chromatography	Waters Asssoc. USA
3.2 Jasco Model FP-210 Spectrofluorometric detector	Japan Spectroscopic Co, ltd.
3.3 Water model 510 HPLC pump	Waters Division of milipore, USA
3.4 Radial compression separation system (RCM 100) Model 746	Waters Asssoc. USA
3.5 Fixed Loop Injector (Reodyne)	Waters Asssoc. USA
3.6 Waters 746 data modulle	Waters Division of milipore, USA
3.7 เครื่องมือที่ใช้ในการสกัด propranolol จากพลาสมา	
3.7.1 Vortex-2-Genic	Scientific industries
3.7.2 Pipetman P.1000	Gilson (France)
3.7.3 Pipetman P.100	Medical electronics Gilson (France)
3.7.4 Angle centrifuge	Medical electronics Ivan Sorvall, Inc., USA.
3.7.5 Micro pipette. 0.5-5 ml	Socorex, Swiss.

## ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

### การศึกษาการเอื้อประโยชน์ในร่างกาย (Bioavailability studies)

#### 1. เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัคร มีดังนี้

- เพศชาย 5 คน เพศหญิง 5 คน สุขภาพแข็งแรง อายุ 20-40 ปี น้ำหนัก 40-75 กิโลกรัม
- ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ CBC, hemoglobin, creatinine, SGOT, SGPT, BUN มีค่าปกติ และผลการตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจปกติ
- ผู้รับการทดลองยินยอมเข้าร่วมการทดลองโดยสมัครใจ และได้ทำหนังสือยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร สามารถยกเลิกการทดลองเมื่อใดก็ได้ ถ้าไม่ประสงค์จะร่วมโครงการต่อไป โดยอธิบายวิธีการศึกษาให้เข้าใจโดยละเอียด พร้อมทั้งชี้แจงให้ทราบถึงอาการไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้น
- ไม่ได้รับยาใดๆ ก่อนการทดลอง 1 สัปดาห์ หรือในระหว่างการทดลอง
- ไม่ได้ดื่มกาแฟและเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนเริ่มทำการทดลองและระหว่างการทดลองไม่ได้ดื่มเครื่องดื่มผสมแอลกอฮอล์ ชา กาแฟ

#### อาสาสมัครที่ไม่นำมาศึกษา

- หญิงที่อยู่ในระยะตั้งครรภ์
- มีประวัติเป็นโรคตับ โรคไต โรคเบาหวาน โรคหอบหืด โรคความดันโลหิตสูง และโรคของหัวใจและหลอดเลือด
- ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการมีค่าผิดปกติ

#### 2. ขนาดและวิธีการให้ยา

อาสาสมัครต้องอดอาหาร 1 คืน (อย่างน้อย 10 ชม.) ก่อนให้รับประทานยา วันที่ทำการทดลองอาสาสมัครจะได้รับ ยาเม็ด propranolol 40 mg. 2 เม็ด ร่วมกับน้ำ 200 ml และให้อุดอาหารต่ออีก 2 ชม. จึงให้รับประทานอาหาร

### 3. แบบแผนการทดลอง

แบบแผนการทดลองการให้ยารับประทานเป็นแบบ randomized crossover design with double blind (การทดลองข้ามแบบสุ่ม)

ตารางที่ 2 ตารางให้ยา 4 บริษัท (A,B,C และ D) แบบ Randomized complete crossover design

อาสาสมัครคนที่	สัปดาห์			
	1	2	3	4
1	A	B	C	D
2	B	C	D	A
3	C	D	A	B
4	D	A	B	C
5	A	B	C	D
6	B	C	D	A
7	C	D	A	B
8	D	A	B	C
9	A	B	C	D
10	B	C	D	A

โดยอาสาสมัครทั้ง 10 คน จะได้รับยา propranolol ของทั้ง 4 บริษัท ในขนาด 40 มก. 2 เม็ด ผลผลิตยามีรหัสบริษัทเป็น A,B,C, และ D โดยจะมี 1 บริษัท ที่ผลิตจากต่างประเทศ เป็นยาที่นำมาเปรียบเทียบกับยาที่ผลิตในประเทศไทย ระยะห่างของการให้ยาแต่ละบริษัทจะนานอย่างน้อย 1 สัปดาห์ เพื่อให้แน่ใจว่ายาที่ได้รับไปครั้งก่อนถูกขับออกจากร่างกายหมดก่อนเริ่มการทดลองให้ยาใหม่ครั้งต่อไป

#### 4. การเก็บตัวอย่าง

เก็บเลือด 8 ml ใน centrifuge tube ที่ใส่ heparin 20  $\mu$ l (5,000 unit/ml) ที่เวลา 0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8 และ 24 ชม. หลังรับประทานยา และนำไปปั่นแยกพลาสมาที่ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำชั้นพลาสมาไปแช่แข็งในตู้เย็น จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์หาระดับยา propranolol ในเลือด ขณะเก็บตัวอย่างเลือด อาสาสมัคร จะได้รับการจับชีพจร และวัดความดันโลหิต ด้วย sphygmomanometer ตามเวลาดังกล่าวตลอดการทดลอง

#### 5. การวิเคราะห์หาระดับปริมาณยา propranolol ในพลาสมา

โดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) (Drum mer, 1981; กัดทอง เจริญพร, 1986) และประเมินคุณสมบัติทางเคมีวิเคราะห์ ได้แก่ การศึกษาความเที่ยงตรง (precision study) ความแม่นยำ (accuracy) และความไว (sensitivity)

##### 5.1 การเตรียม stock solution

เตรียม propranolol ความเข้มข้น 2,000 ng/ml ใน methanol และเตรียม labetalol ความเข้มข้น 400  $\mu$ g/ml ใน methanol และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}$  C ใ้ภายใน 7 วัน

##### 5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน propranolol ในพลาสมา

เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

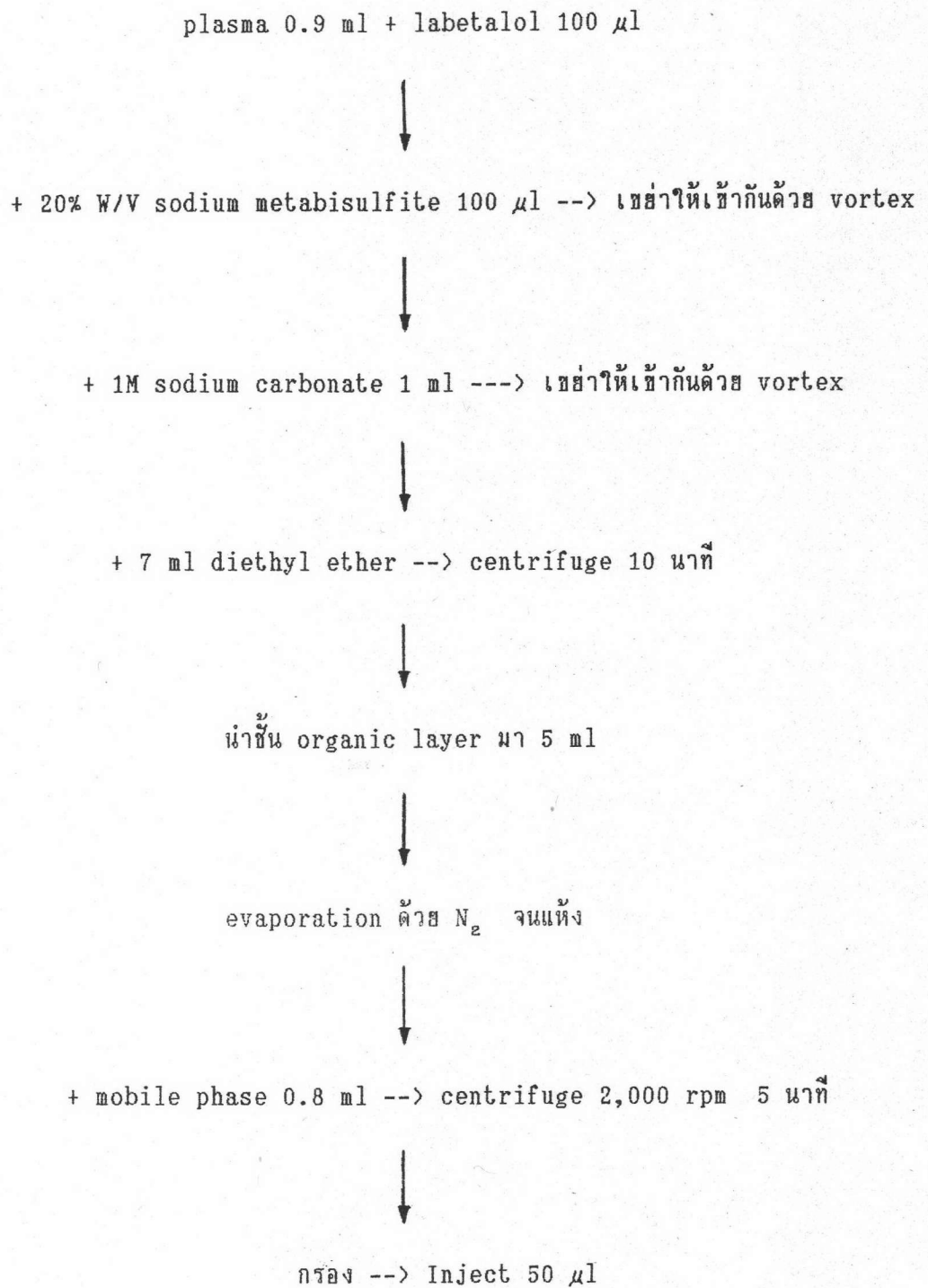
นำ propranolol ที่ความเข้มข้น 2,000 ng/ml เจือจางด้วย methanol ให้ได้ความเข้มข้น 1,500, 1,000, 500, 250, 125, และ 62.5 ng/ml หลังจากนั้น ใส่ propranolol ที่ความเข้มข้นต่างๆ 0.1 มิลลิลิตร ลงในพลาสมาที่ปราศจากยาปริมาณ 0.8 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex และเติม labetalol ความเข้มข้น 400  $\mu$ g/ml

0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ความเข้มข้นของ propranolol ในหลอดทดลองดังนี้ 200, 150, 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25 ng/ml นำไปผ่านขั้นตอนการสกัด

### 5.3 การสกัด propranolol จากพลาสมา

1. นำพลาสมา 0.9 ml เติม internal standard (labetalol 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 100  $\mu\text{l}$
2. เติม 20% W/V sodium metabisulfite 100  $\mu\text{l}$
3. ทำให้เป็นด่างด้วย 1M sodium carbonate 1 ml เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex
4. นำมาสกัดด้วย Ether 7 ml centrifuge 2,000 rpm 10 นาที
5. นำชั้น organic layer มา 5 ml ทำให้แห้งด้วย ก๊าซไนโตรเจน
6. นำส่วนที่เหลือ (residue) มาละลายด้วย mobile phase 0.8 ml centrifuge 2,000 rpm นาน 5 นาที
7. กรอง และฉีดเข้าเครื่อง HPLC

รูปที่ 7 แผนผังแสดงขั้นตอนการสกัด propranolol จากพลาสมา



#### 5.4 ภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Injector	: Fixed loop injector 50 $\mu$ l
Column	: Radial pak liquid chromatography cartridge 3 micron particle ขนาด 8 มิลลิเมตร x 10 เซนติเมตร จาก Waters divisions of Milipore
Mobile phase	: 0.006 M. 1-Heptane sulfonic acid sodium salt ใน 1% glacial acetic acid : methanol = 40:60
อัตราการไหล (Flow rate)	: 1.2 มิลลิลิตร/นาที
Spectrofluorometer	: Excitation wavelength 296 nm.
Detector	: Emission wavelength 340 nm.
อุณหภูมิ column	: อุณหภูมิห้อง

#### 5.5 การหาค่าความเข้มข้นของ propranolol ในตัวอย่างพลาสมา

โดยใช้ค่าอัตราส่วนของพื้นที่ใต้ peak ระหว่าง propranolol มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นกับ internal standard (labetalol) ซึ่งได้จาก chromatogram นำไปสร้างกราฟมาตรฐาน โดย plot ระหว่าง peak area ratio กับความเข้มข้นของ propranolol ในพลาสมา จากนั้นหาความเข้มข้นของ propranolol ในตัวอย่างพลาสมาจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น ได้ศึกษาความเข้มข้นมาตรฐานของ propranolol ทุกวันที่มีการวิเคราะห์หา propranolol ในเลือดและนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณของยาในตัวอย่างวิเคราะห์

#### 6. การประเมินการเอื้อประโยชน์ในร่างกายและการวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบการเอื้อประโยชน์ในร่างกายของยาเม็ด propranolol 4 บริษัท  
โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ต่อไปนี้



## 6.1 ทาค่า Pharmacokinetic parameters ต่างๆ ดังนี้

$C_{P_{max}}$  (The peak plasma concentration) คือ ความเข้มข้นสูงสุดในพลาสมา (ng/ml) ได้จาก กราฟเส้นโค้งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวยาในพลาสมาที่เวลาต่างๆ

$T_{max}$  (The time of peak plasma concentration) คือ เวลาที่ความเข้มข้นในพลาสมาสูงสุด (ชม.) ได้จาก กราฟเส้นโค้งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวยาในพลาสมาที่เวลาต่างๆ

$AUC_{0 \rightarrow 24}$  (The area under the plasma concentration-time curve) (ng/ml.hr) คือ พื้นที่ใต้เส้นโค้งของกราฟความเข้มข้นของยาในพลาสมา กับเวลา จากเวลา 0 ถึง 24 ชม. ค่า AUC จะบอกถึงปริมาณของ active drug ซึ่งเข้าสู่ระบบไหลเวียนของเลือด ซึ่งหาได้ จาก Trapezoidal rule

$t_{1/2}$  (half life) คือ เวลาครึ่งชีวิตของการกำจัดยา (ชม.) หาได้จากสูตร

$$t_{1/2} = 0.693/K_{el}$$

$K_{el}$  (Elimination rate constant) (ชม.<sup>-1</sup>) คือ ค่าคงที่อัตราเร็วการกำจัดยา

$K_a$  (Absorption rate constant) (ชม.<sup>-1</sup>) คือ ค่าคงที่อัตราเร็วการดูดซึมยา

หมายเหตุ : การหาค่า  $K_a$  และ  $K_{el}$  ได้จากการวิเคราะห์ผลโดยวิธี โปรแกรม CSTRIP

## 6.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้ คือ  $C_{P_{max}}$ ,  $t_{max}$ ,  $AUC_{0 \rightarrow 24}$ ,  $K_a$ ,  $K_{el}$  และ  $t_{1/2}$  เปรียบเทียบกันระหว่าง 4 บริษัทคือ A,B,C และ D เพื่อดูว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way analysis of variance) และ ถ้าพบว่ามี ความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงทดสอบดูว่าคู่ใดมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยวิธี Duncan's new multiple range test