บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ

1. ผลิตภัณฑ์ทดสอบ

ยาเม็ด acyclovir ขนาด 200 มิลลิกรัม จาก 3 บริษัท ให้รหัสบริษัทเป็น A,B และ C แทนผลิตภัณฑ์ยาจากบริษัทนั้น ๆ

เกณฑ์การเลือกยาที่นำมาศึกษา

ยาเม็ด acyclovir ขนาด 200 มิลลิกรัม จาก 3 บริษัท คือ

1. ยาต้นตำรับ Batch No.C0696A ผลิตเมื่อเดือน มกราคม 2536 ราคายาเม็ดละ 44 บาท*

2. ยาที่ผลิตในประเทศไทยและมีจำหน่ายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ Batch No. 309736 ผลิตเมื่อ 3 กันยายน 2536 ราคายาเม็ดละ 32 บาท*

3. เลือกยาที่ผลิตในประเทศไทยและมีจำหน่ายตามท้องตลาดทั่วไป 1 ชนิด จากบริษัทผู้ผลิตทั้งหมด 11 บริษัท คือ บริษัท General Drugs House, Silom Medical, Biolab, Chew Brothers, Siam bhesach, T.O. Chemical, Seng Thai Company, Atlentic Pharmaceutical, Sriprasit Dispensary, M&H Manufactering, LBS. Batch No.9324104 ผลิตเมื่อเดือน กุมภาพันธ์ 2536 ราคายาเม็ดละ 28 บาท*

หมายเหตุ * ราคายาเป็นราคาที่ได้จากบริษัทผู้ผลิตโดยตรง

2. สารเคมี

	ผู้ผลิต
2.1 70% perchloric acid	J.T. Baker.
2.2 methanol HPLC grade	J.T. Baker.
2.3 heparin 5,000 unit/ml	LEO Pharmaceutical Products
2.4 acycloguanosine (acyclovir)	Sigma Chemical CO.

3. เครื่องมือ HPLC

	ผู้ผลิต
3.1 High Pressure Liquid Chromatography	Waters Assoc, USA.
3.2 UV detector model 481	Waters Assoc, USA.
3.3 Water model HPLC pump	Waters Division of millipore, USA.
3.4 Fixed loop injector (Rheodyne)	Water Assoc, USA.
3.5 Waters 740 data module	Water Division of millipore, USA

3.6 เครื่องมือที่ใช้ในการสกัด acyclovir จากพลาสมา

3.6.1 Vortex-2-Genic	Scientific industries
3.6.2 Pipetman P. 1000, 200, 100, 10	Gilson (France) Medical electronics
3.6.3 Angle centrifuge	Ivan Sorvall, Inc., USA

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาการเอื้อประโยชน์ในร่างกาย (Bioavailability studies)

1. เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัคร มีดังนี้

- เพศชาย 5 คน เพศหญิง 5 คน อายุ 18-50 ปี น้ำหนัก 40-75 กิโลกรัม
- มีประวัติเคยติดเชื้อเฮอร์ปีส์ ซิมเพล็กซ์ ไวรัส (herpes simplex viruses)
- ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ มีค่าอยู่ในเกณฑ์ปกติ ซึ่งได้แก่
  - Hematology tests : complete blood cell count (CBC)
  - Clinical chemistry test : fasting plasma glucose, blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (S_{cr}), serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT),serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT), total bilirubin
- ไม่ติดเหล้าหรือบุหรี่
- ไม่ได้รับยาใด ๆ ก่อนการทดลอง 1 สัปดาห์ หรือในระหว่างการทดลอง
- ไม่ดื่มชา กาแฟ และเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ก่อนเริ่มทำการทดลองและระหว่างการทดลอง

อาสาสมัครที่ไม่นำมาศึกษา

- หญิงที่อยู่ในระยะตั้งครรภ์
- มีประวัติโรคตับ โรคไต โรคเบาหวาน มีภาวะพร่องอิมมูน(ตรวจได้ทางคลินิก) ได้รับยาจำพวกกระตุ้นภาวะอิมมูน และมีประวัติเป็นโรคอื่น ๆ
- ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการมีค่าผิดปกติ

การยินยอมรับการศึกษา

ผู้รับการทดลองยินยอมเข้าร่วมการทดลองโดยสมัครใจ โดยลงชื่อในหนังสือยินยอมเพื่อเป็นลายลักษณ์อักษร และสามารถยกเลิกการทดลอง เมื่อใดก็ได้ ถ้าไม่ประสงค์จะร่วมโครงการต่อ

ไป โดยอธิบายวิธีการศึกษาให้เข้าใจโดยละเอียด พร้อม ๆ กับชี้แจงให้ทราบถึงอาการไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้น

2. ขนาดและวิธีการให้ยา

อาสาสมัครต้องอดอาหาร 1 คืน (อย่างน้อย 8 ชั่วโมง) ก่อนให้รับประทานยาวันที่ทำการทดลองอาสาสมัครจะได้รับยาเม็ด acyclovir 200 มิลลิกรัม 4 เม็ด ร่วมกับน้ำ 200 มิลลิลิตร และให้อดอาหารต่ออีก 2 ชั่วโมง จึงให้รับประทานอาหาร

3. แบบแผนการทดลอง

แบบแผนการทดลองการให้ยารับประทาน เป็นแบบการทดลองข้ามแบบสุ่มโดยปกปิดทั้งสองด้าน (randomized crossover design with double blind)

ตารางที่ 3 ตารางการให้ยาเม็ด acyclovir 3 บริษัท (A, B และ C) แบบ randomized allocation crossover design

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

โดยอาสาสมัครทั้ง 10 คน จะได้รับยา acyclovir ของทั้ง 3 บริษัทในขนาด 200 มิลลิกรัม 4 เม็ด ผลิตภัณฑ์ยาจะมีรหัสบริษัทเป็น A, B และ C โดยจะมี 1 บริษัท ที่ผลิตจากต่างประเทศ เป็นยาที่นำมาเปรียบเทียบกับยาที่ผลิตในประเทศไทย ระยะห่างการให้ยาแต่ละบริษัทจะนานอย่างน้อย 1 สัปดาห์ เพื่อให้แน่ใจว่ายาที่ได้รับไปครั้งก่อน ถูกขับออกจากร่างกายหมดก่อนเริ่มการทดลองให้ยาใหม่ครั้งต่อไป

4. การเก็บตัวอย่าง

เก็บเลือด 3 ml ใน centrifuge tube ที่ใส่ heparin 10 ไมโครลิตร (5,000 ยูนิต/มิลลิลิตร) ที่เวลา 20, 40 นาที, 1, 1.5, 2, 3, 5, 7 และ 9 ชั่วโมง หลังรับประทานยา และนำไปปั่นแยกพลาสมาที่ 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำชั้นพลาสมามาเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ไม่ควรเก็บนานมากกว่า 1 เดือน และไม่ควรให้ถูกแสง จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์หาระดับยา acyclovir ในพลาสมา (Molokhia et al., 1990)

5. การวิเคราะห์หาระดับปริมาณยา acyclovir ในพลาสมา

โดยวิธี High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) (Cronqvist and Nilson-Ehle, 1988; Molokhia et al., 1990) และ Validate วิธีวิเคราะห์โดยหาความเที่ยงตรง(Precision) ความแม่นยำ(accuracy) และความไว(sensitivity)

5.1 การเตรียม stock solution

เตรียม acyclovir ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น [double distilled water (DDW)] เก็บในตู้เย็น ไม่ให้ถูกแสง และห้ามเก็บนานมากกว่า 1 เดือน (Molokhia et al., 1990)

5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน acyclovir ในพลาสมา เพื่อสร้างกราฟ

นำ acyclovir ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 150, 100, 50 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้นใส่ acyclovir ที่ความเข้มข้นต่างๆ 10 ไมโครลิตร ลงในพลาสมาที่ปราศจากยาปริมาณ 1000 ไมโครลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จะได้ความเข้มข้นของ acyclovir ในหลอดทดลองดังนี้ 3, 1.5, 1, 0.5 และ 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปผ่านขั้นตอนการสกัด

5.3 การสกัด acyclovir จากพลาสมา

1. นำ plasma 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด centrifuge

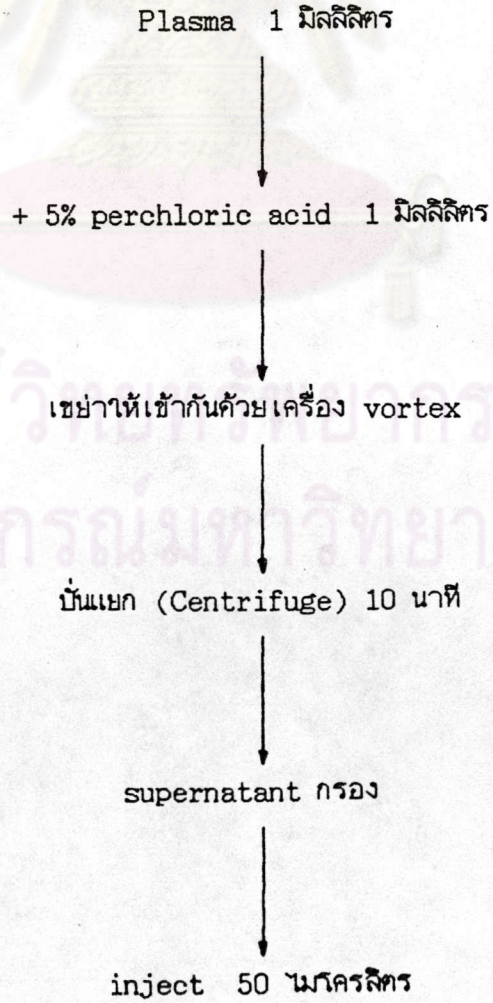
2. เติม 5% perchloric acid 1 มิลลิลิตร

3. นำไปเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นาน 1 นาที และนำไปปั่นแยกที่ 3,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที

4. นำสารละลายส่วนบน กรองด้วย membrane ขนาดช่องของกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร

5. นำส่วนที่ได้ไปฉีดเข้าเครื่อง High pressure liquid chromatography ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

<u>รูปที่ 4</u> แผนผังแสดงขั้นตอนการสกัด acyclovir จากพลาสมา



5.4 ภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Column : Stainless steel column (15 เซนติเมตร x 3.9 มิลลิเมตร id.) บรรจุด้วย Novapak C_{18} 4 ไมโครเมตร

Mobile phase : methanol+double distilled water(1.5:98.5(volume:volume)

Flow rate : 1 มิลลิลิตร/นาที, pressure 1,000 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร

Detector : UV detector, Attenuation 0.01 AUFS, UV : 250 นาโนเมตร

Chart speed : 0.1 เซนติเมตร/นาที

Inject volume : 50 ไมโครลิตร

Column temperature : อุณหภูมิห้อง

5.5 การหาค่าความเข้มข้นของ acyclovir ในตัวอย่างพลาสมา

โดยใช้ค่า peak area ของ acyclovir มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น ซึ่งได้จากโครมาโตแกรม นำไปสร้างกราฟมาตรฐาน โดย plot ระหว่าง peak area กับความเข้มข้นของ acyclovir ในพลาสมา นำข้อมูลที่ได้มาหาสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression) จากนั้นหาความเข้มข้นของ acyclovir ในตัวอย่างพลาสมาจากสมการถดถอยเชิงเส้นตรง แสดงวิธีทำในภาคผนวก ข. และได้ศึกษาความเข้มข้นมาตรฐานของ acyclovir ทุกวันที่มีการวิเคราะห์หา acyclovir ในพลาสมาหรือทุกครั้งที่วิเคราะห์ตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การรวบรวมข้อมูล (Data collection)</u>

การหาค่าการเอื้อประโยชน์ในร่างกายและค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของยา acyclovir ได้จากโปรแกรม MKMODEL ผลิตโดย N. Halford แห่ง Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, University of Aucland, School of Medicine, Private Bag, Aucland, New Zealand ปี ค.ศ.1988 (วิธีคำนวนหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ อยู่ในภาคผนวก ค)

เปรียบเทียบการเอื้อประโยชน์ในร่างกายของยาเม็ด acyclovir 3 บริษัท โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ ต่อไปนี้

Ka (absorpion rate constant)(ชั่วโมง$^{-1}$) คือ ค่าคงที่อัตราเร็วการดูดซึมยา

T_{max} (The time of peak plasma concentration)(ชั่วโมง) คือ เวลาที่ความเข้มข้นในพลาสมาสูงสุด ณ เวลา T_{max} การดูดซึมจะสูงสุด และอัตราเร็วของการดูดซึมยาจะเท่ากับอัตราเร็วการกำจัดยา ได้จากกราฟเส้นโค้งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวยาในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ

C_{pmax} (The peak plasma concentration)(ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) คือ ความเข้มข้นสูงสุดในพลาสมา ได้จากกราฟเส้นโค้งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวยาในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ

$AUC_{0-\infty}$ (area under the plasma concentration time curve)(ไมโครกรัม.ชั่วโมง/มิลลิลิตร) คือ พื้นที่ใต้เส้นโค้งของกราฟความเข้มข้นของยาในพลาสมากับเวลา จากเวลา 0 ถึง ∞ ค่า AUC จะบอกถึงปริมาณของยา ซึ่งเข้าสู่ระบบไหลเวียนของเลือด

เปรียบเทียบค่าเภสัชจลนศาสตร์ในร่างกายของยาเม็ด acyclovir 3 บริษัท โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ ต่อไปนี้

Kel (elimination rate constant) (ชั่วโมง$^{-1}$) คือ ค่าคงที่ของการกำจัดยา

$t_{1/2}$ (half life) คือ ค่าครึ่งชีวิตของการกำจัดยา (ชั่วโมง) หาได้จากสูตร

$$t_{1/2} = 0.693/kel$$

Vd (Volume of distribution)(ลิตร/กิโลกรัม) คือปริมาตรการกระจายตัว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

นำค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้คือ Ka, T_{max}, C_{pmax}, $AUC_{0-\infty}$, Kel, $t_{1/2}$ และ Vd เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเพศชายและหญิง และทดสอบความแตกต่างระหว่าง 3 บริษัท คือ A, B และ C เพื่อดูว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two way analysis of variance) และถ้าพบว่ามีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงทดสอบดูว่าคู่ใดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ Duncan's new multiple range test