

## บทที่ 5

### อภิปรายผล

#### อภิปรายผลการทดลอง

Metformin เป็นยาที่มี polarity สูง มีค่า pka เท่ากับ 12.4 มีฤทธิ์เป็นด่างอ่อนทำให้ยากต่อการตรวจวิเคราะห์ระดับยาในเลือด เนื่องจากสามารถแตกตัวได้สูง ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของ metformin ในพลาสมาโดยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) และใช้ UV detector เป็นเครื่องตรวจวัด เทคนิคการวิเคราะห์เป็นแบบ ion suppression โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Huupponen R. et al. และ Jean D. et al. ใช้ column เป็น  $\mu$ bondapak C18 และ mobile phase เป็น 0.01 M potassium dihydrogen phosphate pH 7.5 : acetonitrile ในอัตราส่วน 60 : 40 และสกัดโดยใช้ 10% trichloroacetic acid ในการตกตะกอนโปรตีน ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก ตกตะกอนได้ดี

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ metformin ในพลาสมาด้วยวิธี HPLC นี้พบว่า เป็นวิธีที่สะดวก ให้ผลรวดเร็วภายในเวลา 16 นาที ใช้ปริมาณตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อย ตัวอย่าง chromatogram ของการวิเคราะห์ยา metformin ในพลาสมาแสดงไว้ใน รูปที่ 9 จะเห็นว่าทั้ง peak ของ metformin และ phenformin ที่ใช้เป็น internal standard แยกจากกันอย่างชัดเจนโดยมี retention time ประมาณ 7.5-8 นาที และ 13.5-14 นาทีตามลำดับ

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ metformin ในพลาสมาด้วยวิธี HPLC ตามวิธีการศึกษาในรายงานนี้ มีความน่าเชื่อถือวัดได้จากค่าความเที่ยงตรง (precision) โดยดูจากค่าสัมประสิทธิ์ของการกระจาย (% coefficient of variation) ทั้งภายในวันเดียวกัน (intra-day) และระหว่างวัน (inter-day) ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 7% ค่าความถูกต้องอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คิดจากค่าวิเคราะห์กลับคืน (% recovery) อยู่ระหว่าง 93.5-105% ระดับของยาต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (limit of detection) คือ 0.125 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร และมีความสัมพันธ์ระหว่าง area ratio กับความเข้มข้นเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0-3 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ได้ค่า coefficient of determination ( $r^2$ ) เท่ากับ 0.998 การหาความเข้มข้นของยา metformin จะหาโดยผ่านสมการถดถอยเชิงเส้นตรงที่สร้างขึ้น

เกณฑ์การคัดเลือกยาเม็ด metformin เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบชีวสมมูล ในร่างกายเปรียบเทียบกับบริษัทต้นแบบ พิจารณาคัดเลือกโดยผ่านการทดลองว่าผลิตภัณฑ์ทั้ง

2 ตำรับมี pharmaceutical equivalent โดยประเมินจาก การละลาย(dissolution profile) และปริมาณตัวยาสำคัญในแต่ละเม็ด (% label amount) โดยศึกษาตามมาตรฐาน USPXXII และ BP. 1993 พบว่ายาทั้ง 2 ตำรับมี pharmaceutical equivalent

จากการศึกษาครั้งนี้ใช้อาสาสมัครเพศชายจำนวน 12 คน โดยให้งดอาหารก่อนการทดลองประมาณ 6 ชั่วโมง และขณะทำการทดลอง 4 ชั่วโมง เนื่องจากอาหารมีผลต่อการดูดซึมยา metformin โดยจะมีการดูดซึ้ลดลง ขนาดยา metformin ที่ให้อาสาสมัครรับประทาน 1000 มิลลิกรัม พบว่าไม่ทำให้เกิดอาการแพ้ยา หรืออาการไม่พึงประสงค์จากยาในอาสาสมัครแต่อย่างใด

การศึกษาความเข้มข้นของ metformin ในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ เป็นไปตาม ตารางที่ 3 และ 4 หลังการให้ยาเม็ด metformin 500 มิลลิกรัม 2 เม็ด สองตำรับในอาสาสมัครเพศชายจำนวน 12 คน การเก็บตัวอย่างเลือดใช้เวลาจนถึง 24 ชั่วโมง ซึ่งเพียงพอสำหรับการศึกษาชีวสมมูลภายในร่างกายของยา metformin ที่ต้องใช้เวลาในการเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 3 เท่าของค่าครึ่งชีวิต และยา metformin มีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 2-6 ชั่วโมง (Andre J. 1996)

การเปรียบเทียบชีวสมมูลภายในร่างกายของยาพิจารณาจากอัตราเร็วและปริมาณยาที่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายดังนี้

1. อัตราเร็วของการดูดซึมพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์เหล่านี้คือ เวลาที่ความเข้มข้นของยา metformin ในพลาสมาสูงสุด (Tmax) ความเข้มข้นสูงสุดของยา metformin ในพลาสมา (Cmax) ค่าคงที่อัตราเร็วในการดูดซึมยา (Ka) ซึ่งค่าเหล่านี้บอกอัตราเร็วของการดูดซึมยา
2. พารามิเตอร์ที่บ่งชี้ถึงปริมาณยาที่ถูกดูดซึมเข้ากระแสโลหิตคือ ค่าพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มข้นยาในพลาสมากับเวลาที่ 0 ถึง  $\infty$  ชั่วโมง ( $AUC_{0-\infty}$ )

จากข้อมูลตารางที่ 8 แสดงค่าอัตราเร็วของการดูดซึม (Ka) จะเห็นได้ว่าอาสาสมัครทั้ง 12 คน มีค่า Ka อยู่ระหว่าง 0.66-2 ชั่วโมง<sup>-1</sup> ซึ่งอัตราเร็วการดูดซึมยาอาจแตกต่างกันได้ในแต่ละคน เนื่องจากผลทางสรีรวิทยาที่แตกต่างกันเช่นการเคลื่อนไหวของทางเดินอาหาร การไหลเวียนของกระแสโลหิต และของเหลวที่หลังในทางเดินอาหาร ซึ่งสิ่งเหล่านี้มีผลต่ออัตราการดูดซึมยา และเมื่อนำค่าเฉลี่ยของ Ka ทั้ง 2 ตำรับ มาเทียบกันพบว่า ยา A มีค่าเท่ากับ  $1.24 \pm 0.59$  ชั่วโมง<sup>-1</sup> ยา B เท่ากับ  $1.09 \pm 0.36$  ชั่วโมง<sup>-1</sup> และเมื่อนำค่าเฉลี่ยทั้ง 2 ตำรับมาทดสอบทางสถิติโดยใช้ unpaired Student's t - test พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P > 0.05)

จากตารางที่ 5 เมื่อพิจารณาค่าความเข้มข้นสูงสุด (Cmax) พบว่าในอาสาสมัครทั้ง 12 คนมีค่า Cmax แตกต่างกันในแต่ละคน ซึ่งค่าความเข้มข้นสูงสุดอาจแตกต่างกันได้ในแต่ละคนเนื่องจากการที่แต่ละคนมีอัตราเร็วในการดูดซึมไม่เท่ากันจากสาเหตุที่กล่าวแล้วข้างต้น และค่าเฉลี่ย Cmax ยา A เท่ากับ  $2.322 \pm 0.634$  ยา B เท่ากับ  $2.42 \pm 0.497$  ไมโครกรัม / มิลลิลิตร เมื่อนำค่าเฉลี่ยของทั้ง 2 ตำรับมาทดสอบทางสถิติพบว่ายาทั้ง 2 ตำรับมีชีวสมมูลต่อกัน โดยมีค่า 90% confidence interval อยู่ในช่วง 89-125 และเมื่อทดสอบด้วย ANOVA แบบ two way cross over พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

ค่า Cmax จากการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Pentikainen et al. เมื่อให้อาสาสมัครรับประทาน metformin 1 กรัมครั้งเดียว พบว่ามีค่า Cmax ประมาณ  $1.98 \pm 0.40$  ไมโครกรัม / มิลลิลิตร และการศึกษาของ Yuen K.H. et al. ให้ยาโดยการรับประทานครั้งเดียว 500 มิลลิกรัม พบว่ามีค่า Cmax ประมาณ 1.686 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร

เวลาที่ความเข้มข้นของยาสูงสุดในพลาสมา (Tmax) จากตารางที่ 6 พบว่าค่า Tmax ของยา 2 ตำรับในอาสาสมัคร 12 คน อยู่ในช่วง 1-3 ชั่วโมง แต่เมื่อนำค่าเฉลี่ย Tmax ของยา metformin ทั้ง 2 ตำรับ Tmax ของยา A และ B มีค่า  $1.95 \pm 0.81$  ชั่วโมง และ  $1.91 \pm 0.55$  ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อนำค่าเฉลี่ยของทั้ง 2 ตำรับมาทดสอบทางสถิติพบว่ายาทั้ง 2 ตำรับมีชีวสมมูลต่อกันโดยเมื่อนำมาทดสอบด้วย unpaired Student's t-test พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) และ % difference ระหว่าง Tmax ของผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ตำรับเท่ากับ 2.11 % โดยเกณฑ์ที่บอกถึงชีวสมมูลของยา คือ  $\pm 20$  % ของผลิตภัณฑ์ต้นแบบ

มีรายงานการศึกษาของ Yuen K. H. et al. ที่ได้ทำการศึกษาในอาสาสมัครชาวมาเลเซีย พบว่าได้ค่าเวลาที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 2-2.5 ชั่วโมง ในขณะที่รายงานของ Dunn J. et al. ได้ค่าเวลาที่ความเข้มข้นของยาสูงสุดของยา metformin คือ 2-3.3 ชั่วโมง ซึ่งใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษา

พื้นที่ใต้เส้นโค้งของกราฟความเข้มข้นของยาในพลาสมาที่เวลา 0 ถึง  $\infty$  ชั่วโมง ( $AUC_{0-\infty}$ ) ของยา metformin ซึ่งจะบอกปริมาณยาที่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย จากตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้เส้นโค้งของกราฟความเข้มข้นของยากับเวลา สำหรับยา A และยา B มีค่า  $13.428 \pm 2.696$  ไมโครกรัม . ชั่วโมง / มิลลิลิตร และ  $14.297 \pm 3.010$  ไมโครกรัม . ชั่วโมง / มิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Caille G. et al. ได้ทำการศึกษาในอาสาสมัครชาวแคนาดา โดยให้ยาครั้งเดียว 500 มิลลิกรัมโดยการรับประทาน พบว่าได้ค่า  $AUC_{0-\infty}$  เท่ากับ 4.745 ไมโครกรัม.ชั่วโมง / มิลลิลิตร แต่เมื่อนำค่าเฉลี่ย  $AUC_{0-\infty}$  ของทั้ง 2 ตำรับมาทดสอบทางสถิติพบว่ายาทั้ง 2 บริษัทมีชีวสมมูลต่อกัน โดยมีค่า 90% confidence interval

อยู่ในช่วง 105.3-107.5 % และเมื่อนำมาทดสอบด้วย ANOVA แบบ two way cross over พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

จากการทดลองนี้จะเห็นว่าค่าความเข้มข้นสูงสุดของยา ( $C_{max}$ ) เวลาที่ความเข้มข้นสูงสุด ( $T_{max}$ ) และพื้นที่ใต้เส้นโค้งของกราฟความเข้มข้นของยาในพลาสมาที่เวลา 0 ถึง  $\infty$  ชั่วโมง ( $AUC_{0-\infty}$ ) ของยา metformin ทั้ง 2 ตำรับที่ทำการศึกษา มีชีวสมมูลกันทางสถิติ โดยการทดสอบ 90 % confidence interval อยู่ในเกณฑ์ที่มีชีวสมมูลคือในช่วง 80-125 % และเมื่อนำ  $T_{max}$  มาทดสอบด้วย unpaired Student's t-test พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) และมีค่า % difference ระหว่าง  $T_{max}$  ของผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ตำรับเท่ากับ 2.11 % โดยมีค่าที่ยอมรับได้คือ  $\pm 20$  % ของผลิตภัณฑ์ต้นแบบ แสดงให้เห็นว่ายาทั้ง 2 ตำรับ มีอัตราเร็วในการดูดซึมยาไม่แตกต่างกัน ปริมาณของยาที่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย และเวลาที่ความเข้มข้นสูงสุดไม่แตกต่างกันแสดงว่ายา metformin ทั้ง 2 ตำรับที่นำมาศึกษาถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายด้วยปริมาณเท่าเทียมกัน เหตุผลอาจเป็นเพราะทั้งตัวยาสำคัญและสารเพิ่มปริมาณ ที่เลือกใช้ในตัวรับยาทั้ง 2 ตำรับ ต่างละลายในของเหลวของร่างกายได้ปริมาณมากเท่ากันตลอดกระบวนการดูดซึมยาจึงดำเนินไปได้อย่างสม่ำเสมอและต่อเนื่อง จึงอาจอนุมานได้ว่ายา metformin ทั้ง 2 ตำรับมีชีวสมมูลกันในร่างกาย และมีประสิทธิภาพในการรักษาเท่าเทียมกัน

ค่าคงที่อัตราการกำจัดยา ( $K_{el}$ ) ของยา metformin ในอาสาสมัคร 12 คน ของยาแต่ละตำรับ แสดงในตารางที่ 9 จะพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.11- 0.32 ซึ่งอัตราการขจัดยาออกจากร่างกายแต่ละคนอาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความแตกต่างของ ความสามารถในการทำงานของไต และปริมาณของเลือดที่ไหลเวียนผ่านไต เนื่องจากยา metformin ที่ถูกดูดซึมจะไม่ถูกเปลี่ยนแปลงภายในร่างกายและถูกขับออกโดยทางไตเท่านั้น อัตราเร็วการกำจัดยาเฉลี่ยของยา A มีค่า  $0.24 \pm 0.07$  ชั่วโมง<sup>-1</sup> และยา B มีค่าเท่ากับ  $0.23 \pm 0.07$  ชั่วโมง<sup>-1</sup> และ เมื่อนำมาทดสอบด้วย unpaired Student's t-test พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

ค่าครึ่งชีวิต ( $t_{1/2}$ ) ของยา metformin ในอาสาสมัคร 12 คน ของแต่ละตำรับได้แสดงในตารางที่ 10 พบว่าค่าเฉลี่ยครึ่งชีวิตของยา A และยา B มีค่าเท่ากับ  $4.02 \pm 1.27$  ชั่วโมง และ  $3.70 \pm 1.30$  ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อนำมาทดสอบด้วย unpaired Student's t-test พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) ค่าครึ่งชีวิตที่ได้สอดคล้องกับกับอัตราการกำจัดออกก็คือยา A กำจัดยาออกได้เร็วกว่าจึงมีค่าครึ่งชีวิตที่สั้นกว่า ยา B

ปริมาตรการกระจายตัว ( $V_d$ ) ของยา metformin ในอาสาสมัคร 12 คน ของแต่ละตำรับได้แสดงในตารางที่ 10 พบว่าปริมาตรการกระจายตัวของยา A และยา B มีค่าเท่ากับ

7.02± 2.22 ลิตร/กิโลกรัม และ 6.53 ± 1.54 ลิตร/ กิโลกรัม ตามลำดับ และเมื่อ เมื่อนำมาทดสอบด้วย unpaired Student's t-test พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) และจากค่าปริมาตรการกระจายของยา metformin พบว่ายาทั้ง 2 ตำรับ กระจายตัวได้ดี

ปริมาตรเลือดที่ขจัดยาออกใน 1 หน่วยเวลา (CL) ของยา metformin ในอาสาสมัคร 12 คน ของแต่ละตำรับได้แสดงในตารางที่ 12 พบว่าปริมาตรเลือดที่ขจัดยาออกใน 1 หน่วยเวลา ยา A และยา B มีค่าเท่ากับ  $97.94 \pm 19.60$  มิลลิลิตร/นาที และ  $6.53 \pm 1.54$  มิลลิลิตร/ นาที ตามลำดับ และเมื่อนำมาทดสอบด้วย unpaired Student's t-test พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ )