

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. ผลิตภัณฑ์ทดสอบ

ยาเม็ดคุมกำเนิดหลังร่วมเพศ levonorgestrel ขนาด 0.75 มิลลิกรัม 2 ตำรับ

- ตำรับต้นแบบ ให้เป็น A
- ตำรับที่ผลิตในประเทศไทย ให้เป็น B

เกณฑ์การเลือกยาที่นำมาศึกษา

ยาเม็ดคุมกำเนิดหลังร่วมเพศ levonorgestrel ขนาด 0.75 มิลลิกรัม จาก 2 บริษัท

คือ

1. ยาต้นตำรับ Lot No. T86264 , mfg. Date 06.1998
2. ยาที่ผลิตในประเทศไทย ที่ผลิตขึ้น lot เดียวกัน

2. สารเคมี

	ผู้ผลิต
2.1 WHO RIA REAGENT PROGRAMME for L-NORGESTREL Batch No. K709610	Merck
- Levonorgestrel antiserum	
- Levonorgestrel standard	
- Levonorgestrel tracer	
- Charcoal	
2.2 Buffer S	
2.3 Scintillation cocktail	
2.4 Diethyl ether	Merck
2.5 Ethyl Alcohol 95%	แผนกเภสัชกรรม โรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์
2.6 Dry ice	Praxair (THAILAND) CO.,LTD.
2.7 Liquid nitrogen	TIG

3. เครื่องมือ

	ผู้ผลิต
2.1 Beta counter ชนิด Beta-scintillation counter	MSE
2.2 Hotplate Mag Stirrer	B&T A SEARLE COMPANY
2.3 COOLSPIN 2 Centrifuge	MSE
2.4 Vortex mixer	B&T A SEARLE COMPANY
2.5 MULTI – TUBE VORTEXER MODEL 2601	Smi scientific manufacturing industries
2.6 ROTAMIXER DELUXE ^R	HOOK & TUCKER LTD.
2.7 Pipette ขนาด 100,200,500 µl	Oxford SAMPLER Micropipetting System
2.8 Repeated pipette	Eppendorf

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาในอาสาสมัคร

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้ารับการศึกษ (Inclusion Criteria)

1. อาสาสมัครเพศหญิง อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ อายุ 21-40 ปี มีน้ำหนักตัวอยู่ในระหว่าง 40-65 กิโลกรัม จำนวน 12 คน
2. มีสุขภาพแข็งแรง โดยการซักประวัติ ตรวจร่างกาย (physical examination) และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งประกอบด้วย CBC (Complete Blood Count), FBS (Fasting Blood Sugar), BUN (Blood Urea Nitrogen), Cr (Creatinine), U/A (Urinalysis), SGOT หรือ AST (Aspartate Aminotransferase), SGPT หรือ ALT (Alanine Aminotransferase), HbsAg (Hepatitis B Surface Antigen), Anti HIV (Anti-Human Immunodeficiency Virus)
3. มีรอบประจำเดือนปกติ และสม่ำเสมอ
4. ไม่สูบบุหรี่ ไม่ดื่มสุรา
5. ไม่มีประวัติแพ้ยาใด ๆ
6. ไม่มีข้อห้ามใช้ฮอร์โมนในการคุมกำเนิด

7. อาสาสมัครจะต้องไม่ได้รับยาใด ๆ ก่อนการทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์ และระหว่างการทดลอง และจะต้องไม่ได้รับฮอร์โมนคุมกำเนิดก่อนการทดลองอย่างน้อย 3 เดือน

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion Criteria)

1. ผลการตรวจร่างกาย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการผิดปกติ
2. หญิงตั้งครรภ์
3. หญิงที่อยู่ในระยะให้นมบุตร

เกณฑ์การยุติการศึกษา (Termination Criteria)

1. อาสาสมัครไม่ประสงค์เข้าร่วมการศึกษาต่อไป และขอยุติการเป็นอาสาสมัครระหว่างการวิจัย

2. เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาที่ใช้ในการศึกษา

อาสาสมัครทุกคนจะได้รับการอธิบายถึงวัตถุประสงค์ ขั้นตอนของการทำวิจัย และผลข้างเคียง ความเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้น จนเป็นที่เข้าใจ ก่อนลงนามยินยอมเข้าร่วมการทดลองเป็นลายลักษณ์อักษร (Inform consent) ซึ่งอาสาสมัครมีสิทธิที่จะถอนตัวออกจากการทดลองนี้เมื่อใดก็ได้ (นอกจากนี้แผนการทดลองได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

ขณะทำการทดลอง ในห้องทดลอง (Metabolic ward) จะมีแพทย์และพยาบาลคอยดูแล และมีเครื่องมือชุดฉุกเฉิน (Emergency kit) เตรียมพร้อม ในกรณีถ้าเกิดมีอาการแพ้ยา

ศึกษาชีวสมมูลของยาเม็ด Levonorgestrel ต้นแบบและยาเม็ดที่ผลิตภายในประเทศ

1. เป็นการทดลองแบบ randomized cross over design โดยอาสาสมัครแต่ละคนจะได้รับยาทั้งหมด 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งมีการเว้นระยะห่างของการให้ยา (wash out period) 2 สัปดาห์ เนื่องจากค่าครึ่งชีวิตของ Levonorgestrel เท่ากับ 9-12 ชั่วโมง ซึ่งระยะห่างของการให้ยาต้องเป็น 7 เท่า (US FDA, 1997) ยาที่ได้รับอาจจะเป็นยาเม็ด levonorgestrel ต้นแบบ หรือยาเม็ด levonorgestrel ที่ผลิตภายในประเทศ

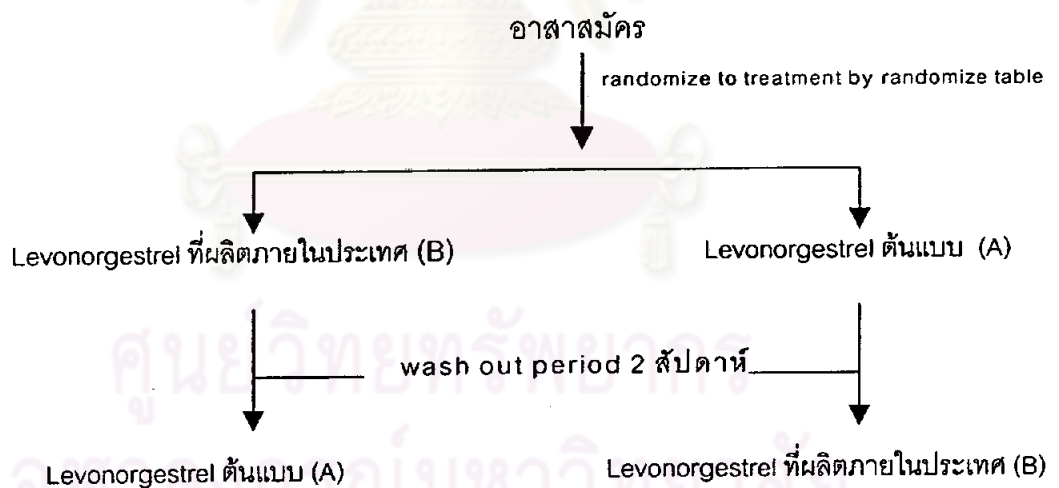
2. ในคืนก่อนการทดลองอาสาสมัครทุกคนจะต้องงดอาหารหลัง 24.00 น. จนถึงเช้าวันรุ่งขึ้น รับประทานยา levonorgestrel 1 เม็ด (0.75 mg) เวลา 7.00 น. พร้อมน้ำประมาณ 200 ml ไม่รับประทานอาหารเช้า ภายหลังจากรับประทานยา 4 ชั่วโมงแล้วจึงให้รับประทานเครื่องดื่มและ

อาหารที่จัดเตรียมให้ ระหว่างการทดลองอาสาสมัครจะต้องไม่รับประทานอาหาร หรือยาอื่น ๆ นอกเหนือจากที่กำหนดให้

3. การเก็บตัวอย่างเลือด และการวิเคราะห์หาระดับยาในเลือด ทำการเก็บตัวอย่างเลือด จากอาสาสมัครทุกคนเวลา 0 (ก่อนรับประทานยา), 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 6, 10 และ 24 ชั่วโมงหลังรับประทานยาตามลำดับ โดยเจาะเลือดครั้งละ 10 ml เก็บในหลอดทดลอง และทำการปั่น แยกเอาซีรัมออกมาทันที และเก็บตัวอย่างซีรัมไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำ มาวิเคราะห์หาระดับยาในเลือดต่อไป

4. ทิ้งระยะพัก (wash out period) เป็นเวลา 2 สัปดาห์จึงเริ่มทำการศึกษาอีกครั้งโดยให้ อาสาสมัครรับประทานยา levonorgestrel อีกครั้งหนึ่งแบบข้ามกลุ่ม (cross over) ซึ่งจะให้อาสาสมัครได้รับยา levonorgestrel ทั้ง 2 ตำรับ และทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2,3

5. การวิเคราะห์หาระดับยาในเลือดจะใช้วิธี RIA ตามวิธีของ Ahsan และคณะ (Ahsan, 1993) โดยนำตัวอย่างซีรัมมาวิเคราะห์หาระดับของ levonorgestrel ในเลือด นำมาคำนวณหา ความเข้มข้นของ Levonorgestrel ในซีรัมที่เวลาต่าง ๆ มาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของ levonorgestrel กับเวลา และคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ต่อไป



รูปที่ 3 การแบ่งกลุ่มอาสาสมัคร

ตารางที่ 4 การให้ยาเม็ดคุมกำเนิดหลังร่วมเพศ levonorgestrel 2 บริษัท (A,B)

อาสาสมัคร คนที่	การทดลองครั้งที่	
	1	2
1	A	B
2	A	B
3	A	B
4	B	A
5	B	A
6	A	B
7	A	B
8	B	A
9	B	A
10	B	A
11	A	B
12	B	A

หมายเหตุ จัดกลุ่มอาสาสมัคร แบบ randomized crossover design โดยใช้การ
เปิดตารางเลขสุ่ม (Randomize table)

การวิเคราะห์หาระดับปริมาณยา Levonorgestrel ในซีรัม

โดยวิธี Radioimmunoassay (RIA) ตามวิธีของ Ahsan R และคณะ (Ahsan R et al, 1993) และ Validate วิธีวิเคราะห์โดยหาความเที่ยงตรงในวันเดียวกันและระหว่างวัน (Intraday and Interday precision) ซึ่งมี % Coefficient of variation ไม่เกิน 15% , ความถูกต้อง (accuracy) ความเป็นเส้นตรง (linearity) และความไว (sensitivity)

การเตรียมสารละลาย

การเตรียม stock solution

นำสารละลาย levonorgestrel ความเข้มข้น 0.75 ไมโครโมล/ลิตร 0.1 มิลลิลิตร (Solution A) เติมสารละลายบัฟเฟอร์จนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงเท่าอุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

การเตรียมสารละลาย Levonorgestrel ในซีรัมเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

นำ Stock solution ที่เตรียมไว้ มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ แบบ two fold dilution ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นดังนี้

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน	ความเข้มข้น (นาโนกรัม/ลิตร)
G	36.5625
F	73.125
E	146.25
D	292.5
C	585
B	1170
A	2340

การเจือจางสารละลาย levonorgestrel tracer

นำสารละลาย levonorgestrel tracer จาก stock solution 100 ไมโครลิตร ทำให้ระเหยด้วย liquid nitrogen เติมสารละลายบัฟเฟอร์ จนได้ปริมาตรครบ 15 มิลลิลิตร

การเตรียม levonorgestrel antibody

นำ levonorgestrel antibody เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ประมาณ 5 – 10 นาที

การเตรียมสารละลายผงถ่าน

ซึ่งผงถ่าน 0.625 กรัม เติมสารละลายบัฟเฟอร์ จนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer และผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer เป็นเวลา 30 – 60 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

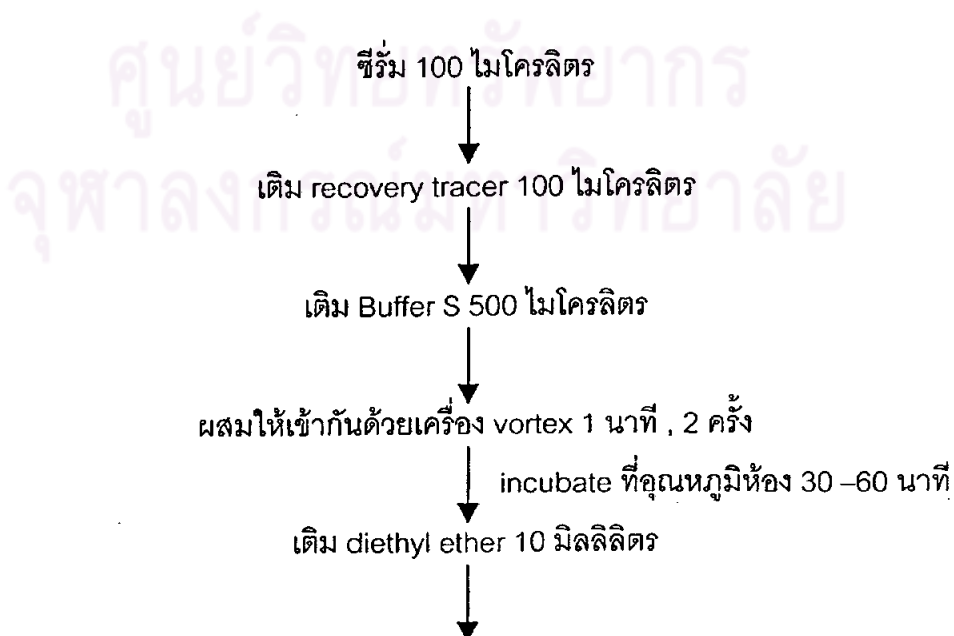
วิธีการทดลอง

ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

1. การสกัด levonorgestrel จากซีรัม
2. การหาระดับยา
3. การแยกส่วน

การสกัด levonorgestrel จากซีรัม

1. เติมซีรัม 100 ไมโครลิตร recovery tracer 100 ไมโครลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ครั้งละ 1 นาที 2 ครั้ง
3. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 – 60 นาที
4. เติม diethyl ether 10 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer 1 นาที 2 ครั้ง
5. นำหลอดทดลองไปแช่ใน dry ice กับ 95% ethyl alcohol นาน 2 – 5 นาที
6. เทสารละลายส่วนบน (supernatant) ออก
7. ทิ้งไว้ในตู้รวมควั่นข้ามคืน (18 – 24 ชั่วโมง)



ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex 1 นาที , 2 ครั้ง

แช่ใน dry ice + 95% ethyl alcohol

2 – 5 นาที

เท supernatant

ทิ้งไว้ในตู้รวมควีน 18 – 24 ชั่วโมง

รูปที่ 4 ขั้นตอนการสกัด Levonorgestrel จากซีรัม

การหาระดับยา

1. นำซีรัมที่สกัดแล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 750 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นาน 1 นาที 2 ครั้ง
2. เติมลงในหลอด 200 ไมโครลิตร
3. เติม levonorgestrel tracer 100 ไมโครลิตร
4. เติม levonorgestrel antibody 100 ไมโครลิตร
5. นำไปเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer
6. incubate ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 18 – 24 ชั่วโมง
7. แต่ละตัวอย่างให้ทำซ้ำ 2 หลอดทดลอง

ตารางที่ 6 ปริมาณของสารที่ใช้ในการวิเคราะห์ (หน่วยเป็นไมโครลิตร)

	Buffer S	Standard or Sample or Blank	Tracer	Antibody
Total	500		100	
NSB	300		100	
BO	200		100	100
Standard or Samples or Blank		200	100	100

หมายเหตุ ทำการทดลองแบบ Duplication

การแยกส่วน

1. เติมผงถ่านความเข้มข้น 0.625% (W/V) 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

ที่อุณหภูมิ 4 °C

2. incubate ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที
3. นำไปปั่นแยก (centrifuge) ที่ 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที
4. เทแยกสารละลายส่วนบนออก
5. เติม scintillator 5 มิลลิลิตร ผสมเข้ากันด้วยเครื่อง vortex
6. incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง
7. นำไป count ด้วยเครื่อง β - scintillation counter

การหาค่าความเข้มข้นของ Levonorgestrel ในตัวอย่างซีรัม

ใช้ค่า % Binding ของ levonorgestrel มาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้น นำไปสร้างกราฟมาตรฐาน โดยนำค่า % Binding ไปแปลงเป็นค่า logit ที่แสดงวิธีทำในภาคผนวกแล้ว plot ระหว่าง logit กับความเข้มข้นของ levonorgestrel ในซีรัม นำข้อมูลที่ได้มาหาสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression) จากนั้นหาความเข้มข้นของ levonorgestrel ในตัวอย่างซีรัมจากสมการถดถอยเชิงเส้นตรง แสดงวิธีทำในภาคผนวก สร้างกราฟมาตรฐานของ levonorgestrel ทุกครั้งที่มีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

การประเมินชีวสมมูลและการวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบชีวสมมูลของยาเม็ดคุมกำเนิดหลังร่วมเพศ levonorgestrel 2 บริษัท โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ต่อไปนี้

ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์

C_{max} (The peak plasma concentration) (นาโนกรัม/มิลลิลิตร) คือ ความเข้มข้นสูงสุดในพลาสมา ได้จากกราฟเส้นโค้งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวยาในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ

t_{max} (The time of peak plasma concentration) (ชั่วโมง) คือเวลาที่ความเข้มข้นในพลาสมาสูงสุด ณ เวลา t_{max} การดูดซึมจะสูงสุด และอัตราเร็วของการดูดซึมยาจะเท่ากับอัตราเร็ว

ของการกำจัดยา ได้จากกราฟเส้นโค้งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวยาในซีรัมที่เวลาต่าง ๆ กัน

$AUC_{0-\infty}$ (Area under the plasma concentration time curve) (นาโนกรัม.ชั่วโมง/มิลลิลิตร) คือ พื้นที่ใต้กราฟความเข้มข้นของยาในพลาสมา กับเวลา จากเวลา 0 ถึง ∞ ค่า AUC จะบอกถึงปริมาณของยาทั้งหมด ซึ่งเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิต

K_e (Elimination rate constant) (ชั่วโมง^{-1}) คือ ค่าคงที่ของอัตราเร็วการกำจัดยา

$t_{1/2}$ (Half life) (ชั่วโมง) คือ ค่าครึ่งชีวิตของการกำจัดยา หาได้จากสูตร $t_{1/2} = 0.693 / K_e$

V_d (Volume of distribution) (ลิตร) คือ ปริมาตรการกระจายตัวของยา

Cl (Clearance) (ลิตร/ชั่วโมง) คือ อัตราการกำจัดยา

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้ คือ C_{max} , t_{max} และ $AUC_{0-\infty}$ เปรียบเทียบความแตกต่างกันระหว่าง 2 บริษัท คือ A และ B เพื่อดูว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ ด้วยการใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง สำหรับการศึกษาระบบ crossover (ANOVA for two way crossover design) และค่า 90% Confidence Interval (ภาคผนวก)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย