บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. ยา

1%w/v ivermectin (Ivomec®)สำหรับฉีดในสุกร	MSD-Ag Vet.,The Netherlands

2. สารเคมี

acetonitrile (AR. grade)	Lab-scan.,Thailand
diethylether (AR. grade)	Lab-scan.,Thailand
dichoromethane (AR. grade)	Lab-scan.,Thailand
methanol (HPLC grade)	Lab-scan.,Thailand
water (HPLC grade)	Lab-scan.,Thailand
pure nitrogen gas	

3. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

high performance liquid chromatography system

เครื่อง HPLC model CLASS –LC 10AD	Shimadzu.,Japan
Hypersil ODS column	Water., USA
(Reversed phase column C18, 5 μm particle,	
15 cm length, 4.6 mm internal diameter)	
Model LC-10AD pump	Shimadzu.,Japan

UV-VIS Detector model (SPD –10A)	Shimadzu.,Japan
auto injector (SIL –10A)	Shimadzu.,Japan
computor intergrator, RF 10A	Shimadzu.,Japan
version 1.1 software LC- program	
column oven (CTO –10A)	Shimadzu.,Japan
guard column Nova-Pak® C18 (lot. No. T 70412)	Water., USA
เครื่อง centrifuge	International Equipment Company.,USA
vortex mixer	Scientific Industries, Inc.NY., USA
nitrogen evaporation system	Organomation Associates.,USA
ultrasonicater, degassor	Great., USA
micropipette (10-100 µL, 100-1000 µL, 1-10 mL)	
pipette tip	
pasteur pipette	
parafilm	
beaker (500 mL, 1000 mL)	
cylinder (10 mL, 100 mL, 1000 mL)	
volumetric flask (5 mL, 10 mL)	

วิธีดำเนินการทดลอง

1.สัตว์ทดลอง

สุนัขพันธุ์ผสมสุขภาพแข็งแรง จากศูนย์ควบคุมโรคพิษสุนัขบ้ากรุงเทพมหานคร ดินแดง อายุ 1-2 ปี เพศผู้ จำนวน 21 ตัว น้ำหนัก 10-20 กก. นำมาเลี้ยงในกรงขนาดกว้าง 1 เมตร ยาว 1 เมตร กรงละ 1 ตัว ที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งมีอุณหภูมิห้องและแสงสว่างตามธรรมชาติ ให้อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดตามน้ำหนักตัวสุนัขวันละ 1 ครั้ง และจัดเตรียมน้ำให้กินได้ตลอดเวลา ทำการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าให้สุนัขทดลองทุกตัว และให้สุนัขทำความคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมใหม่ก่อนเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนดำเนินการทดลอง

ก่อนการทดลอง ทำการตรวจสุขภาพทั่วไปของสุนัข การทรงตัว และชั่งน้ำหนัก ทำการตรวจหาค่าโลหิตวิทยา (complete blood count) ค่า SGOT (alanine transaminase) และ SGPT (aspartate transaminase) เพื่อให้มีความมั่นใจว่าสุนัขมีสุขภาพแข็งแรงและมีค่าโลหิตวิทยาต่างๆ อยู่ในช่วงปกติ

2. วิธีการทดลอง

2.1 การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ภายหลังการกินไอเวอร์เมคติน แบ่งสุนัขเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 2.1.1 สุนัขจำนวน 1 ตัวเพื่อเป็นการศึกษาวิจัยนำร่อง (pilot study) โดยให้ไอเวอร์เมคติน ขนาด 600 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ให้กินโดยผสมน้ำหวาน วันละครั้งทำการเจาะเลือดก่อนทดลองและ 1, 2, 3, 4, 5, 8, 12 ชั่วโมง หลังได้รับยา ให้สุนัขกินยาและเจาะเลือดเช่นนี้ทุกวันจนครบ 14 วัน และนำไปวิเคราะห์ระดับยาในเลือด

กลุ่มที่ 2.1.2 สุนัขจำนวน 7 ตัว โดยให้สุนัขกินไอเวอร์เมคติน ขนาด 600 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ให้กินโดยผสมน้ำหวานครั้งเดียว ทำการเจาะเลือดก่อนทำการทดลองและที่ 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120,144, 168 ชั่วโมงหลังทดลองและนำไปวิเคราะห์ระดับยาในเลือด

2.2 การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์หลังฉีดไอเวอร์เมคตินเข้าใต้ผิวหนัง แบ่งสุนัขเป็นกลุ่มย่อย 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 2.2.1 ใช้สุนัขจำนวน 2 ตัว เพื่อเป็นการศึกษาวิจัยนำร่อง (pilot study) โดยฉีดไอเวอร์เมคติน ขนาด 800 ไมโครกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัมเข้าใต้ผิวหนังระหว่างหนังหลังคอกับหัวไหล่ของสุนัข ทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละครั้ง รวมจำนวน 4 ครั้ง(นับเป็นวันที่ 0, 7,14 และ 21) ทำการเก็บตัวอย่างเลือดก่อนทดลองและที่ 1, 4, 6, 8, 12, 24, 28, 30, 32, 36, 48, 72, 96, 120, 144 ชั่วโมงหลังการฉีดยาแต่ละครั้ง และนำไปวิเคราะห์ระดับยาในเลือด

กลุ่มที่ 2.2.2. ใช้สุนัขจำนวน 7 ตัว ทำการฉีดยาไอเวอร์เมคตินขนาด 800 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าใต้ผิวหนังบริเวณระหว่างหลังคอกับหัวไหล่ของสุนัข ทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละครั้ง รวมจำนวน 2 ครั้ง (นับเป็นวันที่ 0, และ 7) ทำการเก็บตัวอย่างเลือดก่อนทดลองและที่ 1, 4, 6, 8, 12, 24, 28, 30, 32, 36, 48, 72, 96, 120, 144 ชั่วโมง หลังการฉีดยาและนำไปวิเคราะห์ระดับยาในเลือด

กลุ่มที่ 2.2.3. ใช้สุนัขจำนวน 4 ตัว ทำการฉีดไอเวอร์เมคตินขนาด 800 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ระหว่างหลังคอกับหัวไหล่ของสุนัข 1 ครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดก่อนการทดลองและที่ 1, 4, 6, 8, 12, 24, 28, 30, 32, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312, 336 ชั่วโมง หลังการฉีดยาและนำไปวิเคราะห์ระดับยาในเลือด

3.การเตรียมตัวอย่างเลือด

3.1 เพื่อศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำของขาหน้า (cephalic vein) ตามเวลาที่ระบุไว้ในข้อ 2.1 และ 2.2 ประมาณ 10 มิลลิลิตร เก็บในหลอดแก้วมีฝาปิดแล้วตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องจนกระทั่งเลือดแข็งตัวและแยกชั้นซีรั่ม จากนั้นนำไปปั่นที่ 3000 g นาน 10 นาที ทำการเก็บซีรั่มไว้ที่อุณหภูมิ -18^{o} C จนกระทั่งทำการวิเคราะห์

3.2.เพื่อประเมินความปลอดภัยของ ไอเวอร์เมคติน

ทำการเจาะเลือดก่อนการทดลอง และภายหลังได้รับไอเวอร์เมคตินทุกสัปดาห์และส่งที่หน่วยชันสูตร คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อตรวจหาค่า CBC (Hct, Hb, total erythrocyte count, total และ differential leukocyte count) ,SGPT และ SGOT โดยเก็บ

ตัวอย่างเลือดในขวดทดลองที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัวเพื่อตรวจค่าโลหิตวิทยาและเก็บในขวดที่ปราศจากสารกันเลือดแข็งตัวเพื่อตรวจค่าเคมีในโลหิต

4. การประเมินความปลอดภัยจากอาการของสุนัข

ทำการสังเกตและบันทึกอาการแสดงของสุนัขภายหลังได้รับไอเวอร์เมคติน ได้แก่ อาการเดินเซ ซึม คลื่นไส้อาเจียน การเบื่ออาหารและการหลั่งน้ำลาย ตลอดจนลักษณะผิวหนังสุนัขบริเวณที่ฉีดไอเวอร์เมคติน

5.การทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไอเวอร์เมคตินในซีรั่มโดย HPLC

การวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของไอเวอร์เมคตินในซีรั่มโดย HPLC พัฒนาวิธีการขึ้นใหม่โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

5.1. วิธีการสกัดไอเวอร์เมคตินจากซีรั่ม (ivermectin extraction from serum)

1. ทำการเติม acetonitrile ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วที่มีตัวอย่างซีรั่ม 2 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 1 นาที จากนั้นนำไป ปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ซีรั่มจะแยกเป็น 2 ส่วน คือส่วนใส และส่วนของโปรตีนที่ ถูกตกตะกอนออกมา

2. นำส่วนใสที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 มาสกัดโดยใช้ diethylether และ dichloromethane (อัตราส่วน 85:15) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 1 นาที สารละลายจะแยกเป็น 2 ส่วน ดูดส่วนบน 7 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรระเหยให้แห้งด้วยไนโตรเจนในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 34-45 องศาเซลเซียสจนได้ไอเวอร์เมคตินมีลักษณะเป็นผงสีเหลือง

3. ละลายด้วย methanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 1 นาที จากนั้นใส่ลงใน ultrasonic bath เพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

4. ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

โดยมี HPLC condition ดังนี้

column : Hypersil ODS Column, Reversed phase column C_{18}, 5 μm particle,

15 cm length, 4.6 mm internal diameter

mobile phase : methanol : water (85:15)

flow rate : 1 ml/min.

UV detector : ความยาวคลื่น 245 nm.

injection volume : 20 µL

5.2 การวิเคราะห์ปริมาณไอเวอร์เมคติน

ปริมาณไอเวอร์เมคตินหาจาก standard calibration curve

stock solution เตรียมจาก 1% w/v ivermectin 100 ไมโครลิตรละลายใน methanol 10 มิลลิลิตร

working solution เตรียมจาก stock solution ที่เจือจางด้วย methanol จนได้ความเข้มข้น 1000,800, 400, 200, 100, 50, 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมซีรั่มไอเวอร์เมคตินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการเติม working solution ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในซีรั่ม 2 มิลลิลิตรได้ความเข้มข้น 1,000, 800, 400, 200, 100, 50,20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์โดยฉีดเข้า HPLC และนำมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรม ใช้ช่วงที่กราฟเป็นเส้นตรง (linearity) สร้างเป็นสมการ $Y = a + bx$ ค่า Y คือพื้นที่ใต้กราฟและ x คือไอเวอร์เมคตินที่ความเข้มข้นต่างๆ สมการสามารถใช้คำนวณหาความเข้มข้นของสารที่ไม่ทราบค่าได้

5.3. การทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์ (validation method)

การทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์ ประกอบด้วยการหา linearity, accuracy, precision (intra-interday assay), sensitivity และ stability

เก็บตัวอย่าง ซีรั่มสุนัขที่ไม่ได้รับ ไอเวอร์เมคติน (blank) มาวิเคราะห์

5.3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างสารละลายมาตรฐานกับพื้นที่ใต้กราฟ (calibration curve)

เตรียมซีรั่มไอเวอร์เมคตินที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 400 และ 800 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์และนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรม (calibration curve) สร้างเป็นสมการเส้นตรงและคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอย (R^2) ดังข้อ 5.2

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.3.2 การวิเคราะห์ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (accuracy)

ร้อยละความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์(% recovery) เตรียมไอเวอร์เมคตินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น 100 , 200 และ 400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเตรียมไอเวอร์เมคตินความเข้มข้นละ 3 หลอด คำนวณร้อยละความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์จากปริมาณ ไอเวอร์เมคตินที่ตรวจพบหารด้วยปริมาณไอเวอร์เมคตินที่เตรียม

5.3.3 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision)

ความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (precision intra-day) เตรียมซีรั่มไอเวอร์เมคตินมาตรฐานความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 400, 600 และ800 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรอย่างละ3หลอดนำมาวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (relative standard deviation)

ความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ระหว่างวัน (precision inter-day) เตรียมซีรั่มไอเวอร์เมคตินมาตรฐานความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 400 และ 800 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างละ 1 หลอดนำมาวิเคราะห์ ทำซ้ำต่างวันกันอย่างน้อย 3 วัน คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (relative standard deviation)

5.3.2 การศึกษาค่าความคงตัวของยาไอเวอร์เมคตินในซีรั่มสุนัข (stability)

วิเคราะห์ความคงตัวของยาไอเวอร์เมคตินในซีรั่มสุนัขเมื่อเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -18^{0} C

เตรียมซีรั่มไอเวอร์เมคตินมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 100 ,400 และ 800 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ตู้แช่แข็ง นำออกมาวิเคราะห์ระดับยาวันละ 3 หลอด ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 นำค่าที่ได้มาหาค่าความคงตัวของสารโดยใช้ค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ (r)

6.การคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์

6.1 การคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์โดยใช้ model independent

พื้นที่ใต้กราฟระหว่างความเข้มข้นของยากับเวลา (area under the concentration-time curve from time 0 to infinity, $AUC_{0-\infty}$) คำนวณโดยใช้ trapezoidal rule

เวลาที่ระดับยาสูงสุด (time to peak ,T_{max}) หาได้จากข้อมูลระหว่างความเข้มข้นกับเวลา

ระดับความเข้มข้นที่สูงสุดของยาในร่างกาย (peak concentration ,C_{max}) หาได้จากข้อมูลระหว่างความเข้มข้นของยาในซีรั่มกับเวลา ในสุนัขแต่ละตัว

6.2 การคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์โดยใช้ model dependent

6.2.1 การคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ใน one-compartmental model

อัตราคงที่ของการขจัดยา (elimination rate constant, K_{el}) หาได้จากความชันส่วนปลายของกราฟระหว่างความเข้มข้นของยากับเวลา

$$K_{el} = Ln(C_1-C_0) / t_1-t_0 \quad \text{.....(1)}$$

ค่าครึ่งชีวิตของการขจัดยา (elimination half life, $T_{1/2}$)คำนวณจาก

$$T_{1/2} = 0.693 / K_{el} \quad \text{.....(2)}$$

ปริมาตรปรากฏการกระจายตัว (apparent volume of distribution, Vd)

$$Vd = CL/ K_{el} \quad \text{.....(3)}$$

เคลียร์านซ์ (clearance ,CL)

$$CL = F.D / AUC_{C-\infty} \quad \text{.....(4)}$$

Dose = ปริมาณยาที่บริหาร

อัตราคงที่ของการดูดซึมยา(absorption rate constant, K_a) คำนวณได้จาก residual method

พื้นที่ใต้กราฟระหว่างความเข้มข้นของยากับเวลา (area under the concentration – time curve from time 0 to infinity, $AUC_{0-\infty}$) คำนวณโดยใช้ residual method

6.2.2 การคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ใน two-compartmental model

ปริมาตรปรากฏการกระจายตัว (apparent volume of distribution, Vd)

$$Vd = F.D /(A+B) \quad \text{.....(5)}$$

F = bioavailability

A = จุดตัดแกน Y จาก residual line

B = จุดตัดแกน Y จาก terminal slope

ค่าครึ่งชีวิตของการขจัดยาออก (elimination half life, $T_{1/2}$)

$$T_{1/2} = 0.693 / \beta \quad \text{.....(6)}$$

เคลียร์านซ์ (clearance, CL)

$$CL = F.D/AUC_{0-\infty} \quad \text{.....(7)}$$

อัตราคงที่ของการดูดซึม(absorption rate constant, K_a) คำนวณได้จาก residual method

พื้นที่ใต้กราฟระหว่างความเข้มข้นของยากับเวลา(area under the concentration-time curve from time 0 to infinity, $AUC_{0-\infty}$) คำนวณโดยใช้ residual method

วิธีการคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์แสดงไว้ในภาคผนวก

7.สถิติที่ใช้ทดสอบ

ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ น้ำหนักของสุนัข RBC count, Hct, Hb, total และ differential leukocyte count, SGOTและ SGPT แสดงข้อมูลออกมาในรูป mean $\pm$ SEM และนำมาหาค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้

Student's t test เพื่อเปรียบเทียบค่าตัววัดทางเภสัชจลนศาสตร์ระหว่างการกินและการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง

ANOVA เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างน้ำหนักสุนัข ค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีโลหิต ก่อนและภายหลังได้รับไอเวอร์เมคติน

การทดสอบนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.05) โดยใช้โปรแกรม สำเร็จรูป Microsoft Excel version 7 และ SPSS PC version 7.5.2