บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

ประชากรเป้าหมาย

ประชากรเป้าหมายคือผู้ป่วยที่รักษาด้วยยาเมท็อกซีโซราเลนร่วมกับรังสีอัลตราไวโอเลตเอ หรือ PUVA therapy

การคำนวณขนาดของประชากร

จากการศึกษาของ Marja J. Herfst & Frederik A & de Wolff และคณะในปี 1983 (19) พบว่าระดับความเข้มข้นของยาสูงสุดในเลือดและ minimal phototoxic dose (MPD) มีความสัมพันธ์กัน มีค่า correlation coefficient (r) = -0.82 ($p<0.005$) จึงใช้ค่าความสัมพันธ์นี้ในการคำนวณขนาดของประชากร

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาหาความสัมพันธ์ของตัวแปร 2 ตัวแปร ในผู้ป่วยกลุ่มเดียว สูตรที่ใช้คำนวณคือ

$$n = [(Z_\alpha + Z_\beta)/C(r)]^2 + 3$$

Z_α = ค่า Z ที่ได้จากตารางการแจกแจงปกติมาตรฐาน เมื่อกำหนด α มาให้
โดยที่ α คือโอกาสที่สรุปผิด ถ้าสรุปว่าตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์กัน

Z_β = ค่า Z ที่ได้จากตารางการแจกแจงปกติมาตรฐาน เมื่อกำหนด β มาให้
โดยที่ β คือโอกาสที่สรุปผิด ถ้าสรุปว่าตัวแปรทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์กัน

r = ขนาดของความสัมพันธ์ระหว่างสองตัวแปรที่คาดว่าจะพบได้

$C(r) = (1/2)\ln[(1+r)/(1-r)]$; แทนค่า $r = 0.82$

$C(r) = (1/2)\ln[(1+0.82)/(1-0.82)]$

$= (1/2)\ln(1.82/0.18)$

$= (1/2)\ln 10.1$

$= 1.15$

กำหนด $\alpha = 0.05$, $\beta = 0.1$

แทนค่า $C(r) = 1.15$ ในสมการ

$$n = [(1.96 + 1.28) / 1.15]^2 + 3$$

$$n = [3.24 / 1.15]^2 + 3$$

$$n = 7.935 + 3$$

$$n = 10.935$$

จำนวนผู้ป่วยที่คำนวณได้ คือ 11 คน

ประชากรที่ศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้ประชากรที่จะศึกษาได้แก่ผู้ป่วยที่เป็นโรคสะเก็ดเงินรุนแรงที่รักษาด้วยยาเมท็อกซีโซราเลนร่วมกับรังสีอัลตราไวโอเลตเอหรือ PUVA ที่ห้องตรวจโรคแผนกผิวหนัง ตึก ภปร. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และเนื่องจากเป็นการศึกษาครั้งแรกในผู้ป่วยคนไทยและจากการศึกษาอื่นๆ พบว่าค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ได้มีความแปรผัน (variation) ค่อนข้างมาก จึงได้กำหนดจำนวนผู้ป่วยที่จะศึกษาเท่ากับ 21 ราย

เกณฑ์ในการคัดเลือกประชากรที่จะนำมาศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ได้กำหนดเกณฑ์ในการคัดเลือกประชากรที่นำมาศึกษาดังนี้

-ผู้ป่วยคนไทยที่เป็นโรคสะเก็ดเงินรุนแรงและรักษาด้วยยาเมท็อกซีโซราเลนร่วมกับรังสีอัลตราไวโอเลตเอ

-ผู้ป่วยไม่มีประวัติเป็นโรคตับ โรคไต โรคเบาหวาน โรคระบบหัวใจและหลอดเลือด

-ผู้ป่วยไม่เป็นโรคของระบบภูมิคุ้มกัน

-ผู้ป่วยไม่เป็นโรคที่ผิวหนังมีความไวต่อแสง เช่น systemic lupus erythematosus, porphyria cutania tarda

-ผู้ป่วยไม่เป็นมะเร็งผิวหนัง

-ผู้ป่วยไม่เป็นด้อกระจก

-ผู้ป่วยไม่ตั้งครรภ์

-ผลการตรวจร่างกายทั่วไปและผลการตรวจตาปกติ

-ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการได้แก่ complete blood count, liver function test, BUN, Cr, Anti-HIV, antinuclear antibody อยู่ในเกณฑ์ปกติ

<u>เกณฑ์ในการตัดออกจากการศึกษา</u>

หลังจากที่ได้รับผู้ป่วยเข้าในการศึกษาวิจัยแล้ว เมื่อเริ่มทำการศึกษาวิจัยก็จะให้ผู้ป่วยรับประทานยา และเจาะเลือดผู้ป่วยตามเวลาที่กำหนด โดยได้กำหนดเกณฑ์ในการตัดผู้ป่วยออกจากการศึกษาวิจัยดังนี้คือ

-ผู้ป่วยไม่สามารถทนต่ออาการข้างเคียงจากยา เช่น อาการคลื่นไส้ อาเจียนได้

-ผู้ป่วยมีอาการแพ้ยา

-ผู้ป่วยจำเป็นต้องได้รับยาอื่นที่อาจมีผลต่อการวัดระดับยาทางห้องปฏิบัติการ เช่น tolbutamide

-ผู้ป่วยไม่สามารถมาตามนัดเพื่อวัดการทดสอบ minimal phototoxic dose (MPD)

จากการศึกษาวิจัยพบว่าไม่มีผู้ป่วยที่ต้องถูกตัดออกจากการศึกษา

โดยสรุปเป็นการศึกษาในผู้ป่วยคนไทยที่เป็นโรคสะเก็ดเงินอย่างรุนแรงที่ห้องตรวจผิวหนังโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ รวมจำนวนผู้ป่วย 21 ราย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการศึกษา

1. อธิบายให้ผู้ป่วยเข้าใจถึงวัตถุประสงค์และประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัยและจะรับผู้ป่วยเข้าเป็นส่วนหนึ่งของการวิจัยในกรณีที่ได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย

2. เจาะเลือดเพื่อตรวจ CBC, liver function test, BUN, Cr, anti-HIV, antinuclear antibody, urine examination , urine pregnancy test และ ophthalmological examination

3. ให้ผู้ป่วยรับประทานยาเมท็อกซีโซราเลน (0.6 mg/kg)โดยรับประทานพร้อมกับอาหารเช้า หลังจากนั้นเจาะเลือดผู้ป่วย 7 ml โดยเจาะเลือดก่อนรับประทานยาเมท็อกซีโซราเลนและหลังจากรับประทานยา 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6 ชั่วโมง และแยกเอาซีรั่มไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวัดระดับของยาโดยใช้ high pressure liquid chromatography (HPLC)

4. หลังจากนั้นทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองของผิวหนังต่อรังสีอัลตราไวโอเลตเอ ที่บริเวณหลังของผู้ป่วย โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตเอทดสอบหลังจากรับประทานยา 1.5, 2, 2.5, 3 ชั่วโมง โดยที่ปริมาณของรังสีที่ทดสอบเท่ากับ 1.5, 2, 3, 5, 7, 9 จูลต์ต่อตารางเซนติเมตร แบ่งพื้นที่ที่ทดสอบเป็นช่องๆ ละ 1 ตารางเซนติเมตร

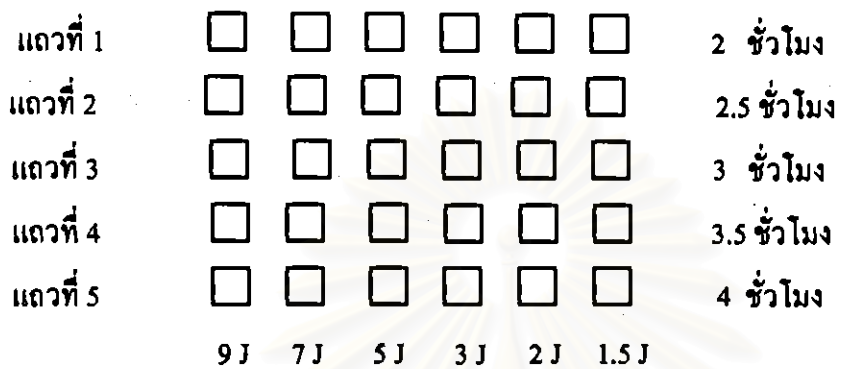
5. อ่านผลการทดสอบรังสีโดยดูจากปฏิกิริยารอยแดงที่ผิวหนังที่เวลา 48-72 ชั่วโมงหลังจากได้รับรังสีอัลตราไวโอเลตเอ (minimal phototoxic dose คือปริมาณของรังสีอัลตราไวโอเลตเอที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดปฏิกิริยารอยแดงที่ผิวหนัง)

ผู้ป่วยกลุ่มแรกที่ศึกษามีจำนวน 15 ราย แต่เนื่องจากค่าที่ได้ไม่สามารถคำนวณค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ได้ดีพอ จึงได้ศึกษาต่อในผู้ป่วยกลุ่มที่ 2 จำนวน 6 ราย และในผู้ป่วยกลุ่มนี้ได้เจาะเลือดและวัด MPD เพิ่มเติมที่เวลาดังนี้ คือเจาะเลือดที่เวลา 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 6, 8, 10, 12 ชั่วโมง และวัด MPD ที่เวลา 2, 2.5, 3, 3.5, 4 ชั่วโมงหลังจากรับประทานยา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีวัด minimal phototoxic dose (MPD)

1. ทดสอบที่บริเวณหลังของผู้ป่วย โดยแบ่งบริเวณที่จะทดสอบเป็นช่องๆ ละ 1 ตารางเซนติเมตร ดังรูป

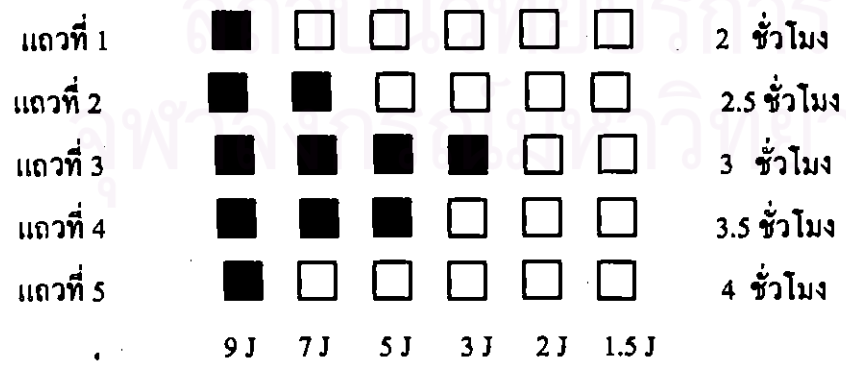


2. ฉายรังสีอัลตราไวโอเลต-เอที่บริเวณหลังของผู้ป่วย ปริมาณรังสีที่ฉายช่องละ 1.5, 2, 3, 5, 7, 9 จูลล์ / ตารางเซนติเมตร ดังนี้

แถวที่ 1 ฉายรังสีหลังจากรับประทานยา 2 ชั่วโมง
แถวที่ 2 ฉายรังสีหลังจากรับประทานยา 2.5 ชั่วโมง
แถวที่ 3 ฉายรังสีหลังจากรับประทานยา 3 ชั่วโมง
แถวที่ 4 ฉายรังสีหลังจากรับประทานยา 3.5 ชั่วโมง
แถวที่ 5 ฉายรังสีหลังจากรับประทานยา 4 ชั่วโมง

3. อ่านผลหลังจากทดสอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยดูจากรอยแดงในช่องที่ใช้รังสีปริมาณน้อยที่สุด ค่า minimal phototoxic dose (MPD) คือปริมาณรังสี (จูลล์) ที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดรอยแดง

<u>ตัวอย่าง</u>



ค่า MPD ที่อ่านได้ คือ ปริมาณรังสีอัลตราไวโอเลต-เอ 3 จูลล์ หลังจากรับประทานยา 3 ชั่วโมง

ขั้นตอนทางห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ระดับยาด้วย HPLC

หลังจากที่ได้เจาะเลือดผู้ป่วยได้เก็บซีรั่มของผู้ป่วยที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการสกัดยาและวัดระดับยาในซีรั่ม ซึ่งจะต้องมีขั้นตอนต่างๆ ในห้องปฏิบัติการในการเตรียมสารมาตรฐาน การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง High pressure liquid chromatography การทดสอบการสกัดสารจากซีรั่ม ซึ่งขั้นตอนในห้องปฏิบัติการต้องปฏิบัติอย่างมีขั้นตอน เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดยาจากซีรั่มของผู้ป่วยและการวัดระดับความเข้มข้นของยา ขั้นตอนต่างๆในห้องปฏิบัติการมีดังนี้

1.เตรียมสารมาตรฐาน 8-methoxypsoralen , 5-methoxypsoralen

1.1 ชั่งสาร 8-MOP, 5-MOP หนัก 8-10 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร

1.2 เติมสารอะเซโตไนไตรให้เต็ม 25 มิลลิลิตร คำนวณความเข้มข้นที่ได้

1.3 ดูดสารจากข้อ 1.2 ซึ่งมี 8-MOP หรือ 5-MOP ในปริมาณ 100 ไมโครกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารอะเซโตไนไตร 25 มิลลิลิตร จะได้สารความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.4 ดูดสารปริมาตร 625 ไมโครลิตร จากข้อ 1.3 ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมอะเซโตไนไตร 25 มิลลิลิตร จะได้สารความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาใช้เป็นสารควบคุม

1.5 นำสารจากข้อ 1.3 ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปเจือจางด้วยสารอะเซโตไนไตรให้ได้ความเข้มข้น 800, 400, 200, 100, 50, 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาใช้เป็นสารมาตรฐาน

2.ทดสอบการวิเคราะห์สารมาตรฐานด้วย HPLC

ทดสอบฉีดสารมาตรฐานเพื่อสร้าง standard curve

3.ทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC

เป็นการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง HPLC ว่าสภาวะใดที่เหมาะสมที่สุดในการวัดความเข้มข้นของสาร โดยที่จะต้องทดสอบ mobile phase, detector, volume เป็นต้น ได้ทดสอบสภาวะของเครื่อง HPLC ดังนี้

2.1 ทดสอบ mobile phase ชนิดต่างๆ

ได้มีการเปรียบเทียบ peak โดยการนำค่า peak height / peak area (HA ratio) และลักษณะ symmetry มาใช้เปรียบเทียบ ผลการศึกษาพบว่าใช้น้ำ : อะเซโตไนไตร 40 : 60 ให้ peak ที่ดีที่สุด (มีความสูงของ peak มาก มีฐานแคบ และ peak แสดงลักษณะ symmetry)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 ทดสอบเปรียบเทียบการใช้ fluorescense detector และ UV detector

2.3 ทดสอบการใช้ UV detector เปรียบเทียบระหว่างความยาวคลื่น 250 และ 300 นาโนเมตร พบว่าถ้าใช้ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร ทำให้คำนวณพื้นที่ผิดพลาดได้มาก นอกจากนี้พบว่าการใช้ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร ให้ค่า H/A ratio สูงกว่า

2.4 เปรียบเทียบการฉีดสารปริมาตร 5, 10, 15, 20 และ 40 ไมโครลิตร

จากการศึกษาพบว่าการฉีดสารปริมาตร 10, 20 ไมโครลิตร มีค่า H/A ratio มากกว่าค่าอื่น

4. ทดสอบการสกัดสารเมท็อกซีโซราเลน

เป็นขั้นตอนการสกัดแยกสารจากซีรั่ม โดยแยกเอาสารที่ต้องการวัดความเข้มข้นไว้ในสารละลาย และนำเอาสารที่สกัดได้นี้ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ได้ทดสอบจนได้ขั้นตอนที่เหมาะสมดังนี้

วิธีทำ

1. การเตรียม sep-pak
   - 1.1 ล้าง sep-pak ด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร
   - 1.2 ล้าง sep-pak ด้วยน้ำ 20 มิลลิลิตร
   - 1.3 ใช้หลอดฉีดยาพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร ต่อกับ sep-pak
2. inject ซีรั่มที่ต้องการสกัดลงใน sep-pak ด้วยหลอดฉีดยาพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร รอ 20 นาที
3. ล้างด้วยน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร รอ 20 นาที แล้วเป่าให้แห้งด้วยอากาศ
4. การสกัดสาร
   - 4.1. สกัดสารส่วนที่ 1 ด้วยสารอะเซโตไนไตร 1 มิลลิลิตร รอ 10 นาที (ไม่ต้องเป่าให้แห้ง)
   - 4.2. สกัดสารส่วนที่ 2 ด้วยสารอะเซโตไนไตร 1 มิลลิลิตร รอ 10 นาที แล้วเป่าให้แห้ง
   - 4.3. นำสารส่วนที่ 1 และ 2 ผสมกันแล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

   การสกัดสารตามวิธีข้างต้นได้ค่า recovery เท่ากับร้อยละ 80-90

5. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

- 5.1. Shimadzu SPD-6AV UV-VIS Spectrophotometric detector
- 5.2. Shimadzu CTO-6A Column oven
- 5.3. Shimadzu SCL-6B System controller
- 5.4. Shimadzu SIL-6B Autoinjector
- 5.5. Shimadzu C-R4A Chromatopac

5.6. Shimadzu LC-6A Liquid chromatograph

ภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้วัดความเข้มข้นของยา

column : Zorbax ODS 250 * 4.6 mm.

mobile phase : น้ำ : อะเซโตไนไตร 40 : 60

flow rate : 1 มิลลิลิตรต่อนาที

UV detector : ความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร

inject volume : 20 ไมโครลิตร

column temperature : 40 องศาเซลเซียส

pressure : 70-135 บาร์

สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.1. 8-MOP ($C_{12}H_8O_4$) บริษัท SIGMA lot 104 H0042 M3501

3.2. 5-MOP ($C_{12}H_8O_4$) บริษัท SIGMA lot 46H0163 M1648

3.3. Methyl alcohol CH_3OH Mallinckrondt AR 3016

3.4. Acetonitrile CH_3CN Mallinckrodt chrom AR ^{R} HPLC 2856

วิธีการทางสถิติ

คำนวณค่าความเข้มข้น (Cmax) เวลาที่ความเข้มข้นสูงสุด (Tmax) ค่าครึ่งชีวิต โดยใช้ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

คำนวณค่าความสัมพันธ์ของระดับของยาในซีรั่มและปฏิกิริยาตอบสนองต่อรังสีอัลตราไวโอเลตเอโดยใช้ Multiple regression

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย