

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง



วัสดุ

1. ผลิตภัณฑ์ที่ทดสอบ

ยาเม็ด Metformin ขนาด 500 mg โดยให้ยาเม็ด metformin จากบริษัทต้นแบบที่ผลิตจากต่างประเทศ (Lot. B293050) เป็นยา A และยาเม็ด metformin จากบริษัทที่ผลิตในประเทศ (Lot. 218132) เป็นยา B เกณฑ์การคัดเลือกผลิตภัณฑ์ที่นำมาศึกษาคือ ผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิดจะต้องมี pharmaceutical equivalent ซึ่งประเมินจากปริมาณตัวยาสำคัญในแต่ละเม็ด (percent label amount) และการละลายของตัวยา (dissolution profile) โดยใช้เกณฑ์ตาม USP XXII จากการศึกษาการละลายพบว่ายาทั้ง 2 ตำรับ มีค่าพารามิเตอร์ทั้ง 2 คือ difference factor และ similarity factor อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานกำหนดคือมีค่า difference factor เท่ากับ 4.33 และค่า similarity factor เท่ากับ 63.5 (เกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์ที่มีการละลายเท่าเทียมกันคือค่า difference factor อยู่ในช่วง 0-15 และค่า similarity factor อยู่ในช่วง 50-100) ส่วนปริมาณตัวยาสำคัญ ตามเกณฑ์มาตรฐาน USP XXII และ BP 1993 คือ 98.5-101 % โดยยา A มีปริมาณสารสำคัญ 99.9 % และยา B มีปริมาณสารสำคัญ 99.3 % แสดงว่ายาทั้ง 2 ตำรับมี pharmaceutical equivalent จึงนำยาทั้ง 2 ตำรับมาศึกษาชีวสมมูลภายในร่างกาย (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก)

2. สารเคมี

ชื่อ	ผู้ผลิต
- Methyl alcohol HPLC grade	Mallinckrodt USA
- Acetonitrile	Sigma USA
- Potassium dihydrogen phosphate	Farmitalia Carloerba
- Metformin standard	Sigma USA
- Phenformin standard	Sigma USA
- Trichloroacetic acid	Merck Germany
- Sodium hydroxide	Merck Germany
- Heparin	Leo Denmark

3. เครื่อง HPLC

- Spectra SYSTEM P 1000 pump Thermo separation product USA
- Spectra SYSTEM PS 3000 Thermo separation product USA
- Spectra SYSTEM SN 4000 Thermo separation product USA
- Spectra SYSTEM UV 1000 Thermo separation product USA
- Computer วัด Chromatogram Laser USA
- Printer HP Laserjet 6 L Hewlett packard USA
- Column Microbondapak C18 Waters USA

4. เครื่องมือที่ใช้ในการสกัด

- Vortex 2-Genic Scientific industries USA
- Pipetman P-1000 Gilson Medical Electronic France
- Pipetman P-100 Gilson Medical Electronic France
- Centrifuge 4235 A Biosystem USA
- pH Meter Mettler Toledo USA
- เครื่องชั่งอย่างละเอียด
- เครื่องกรอง พร้อมกระดาษกรอง Mellipore USA
- Bransonic 2200 Branson Cleaning Equipment Company USA
- Syringe 10 ml , 5 ml Terumo Japan
- IV Catheter Terumo Japan
- Tube เคลือบ Heparin
- หัวเข็มเบอร์ 20 Terumo Japan
- ถุงมือ

การศึกษาการเอื้อประโยชน์ในร่างกาย (Bioavailability Studies)

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัคร มีดังนี้

1. อาสาสมัครเพศชาย สุขภาพแข็งแรง จำนวน 12 คน อายุอยู่ในช่วง 18-32 ปี มีน้ำหนักตัวอยู่ในเกณฑ์ $\pm 10\%$ Ideal body weight
2. มีสุขภาพแข็งแรงโดยการซักประวัติ การตรวจร่างกายและการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ CBC, sugar, cholesterol, triglyceride, SGOT, BUN, Cr, HbsAg, Anti HIV มีผลปกติ
3. ไม่มีประวัติแพ้ยาใด ๆ และอาสาสมัครต้องไม่ได้รับยาใดก่อนการทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์ หรือในระหว่างทำการทดลอง
4. ไม่สูบบุหรี่ ไม่ดื่มสุรา
5. อาสาสมัครผู้รับการทดลองยินยอมเข้าร่วมการทดลองด้วยความสมัครใจ และได้รับการอธิบายถึงวัตถุประสงค์ ขั้นตอนของการทำการทดลองและความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นได้ จนเป็นที่เข้าใจแล้วก่อนลงนามยินยอมเข้าร่วมการทดลองเป็นลายลักษณ์อักษร นอกจากนี้แผนการทดลองได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ก่อนการทดลอง

เกณฑ์การไม่คัดเลือกเข้ารับการทดลอง

1. มีประวัติเป็นโรคตับ โรคไต โรคเบาหวาน โรคหอบหืด โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจและหลอดเลือด
2. ผลการตรวจร่างกายและการตรวจทางห้องปฏิบัติการผิดปกติ
3. มีประวัติแพ้ยา สูบบุหรี่ ดื่มสุรา

เกณฑ์การยุติการทดลอง

1. อาสาสมัครไม่ประสงค์เข้าร่วมทำการศึกษาต่อไปและขอยุติการเป็นอาสาสมัครระหว่างการทดลอง
2. เกิดอาการไม่พึงประสงค์ที่เป็นอันตรายจากยาที่ใช้ในการศึกษา

วิธีการศึกษา(study design)

1. รูปแบบการทดลองเป็นแบบ randomized, double-blind and crossover design โดยอาสาสมัครทั้ง 12 คน รับประทาน metformin 2 บริษัท โดยเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากต่างประเทศหนึ่งตำรับและผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในประเทศหนึ่งตำรับ โดยระยะเวลาที่ได้รับยาทั้งสองครั้งห่างกันหนึ่งสัปดาห์

2. อาสาสมัครทุกคนต้องงดอาหารหลัง 24.00 น. ในคืนก่อนการทดลองและจะงดอาหารต่อมาจนถึงวันรุ่งขึ้น โดยจะให้รับประทานยา metformin 500 mg 2 เม็ด เวลา 08.00 น. พร้อมน้ำ 200 ml จากนั้นอีก 4 ชม. จึงให้รับประทานอาหารกลางวันและรับประทานอาหารเย็นอีก 6 ชม. ต่อมา

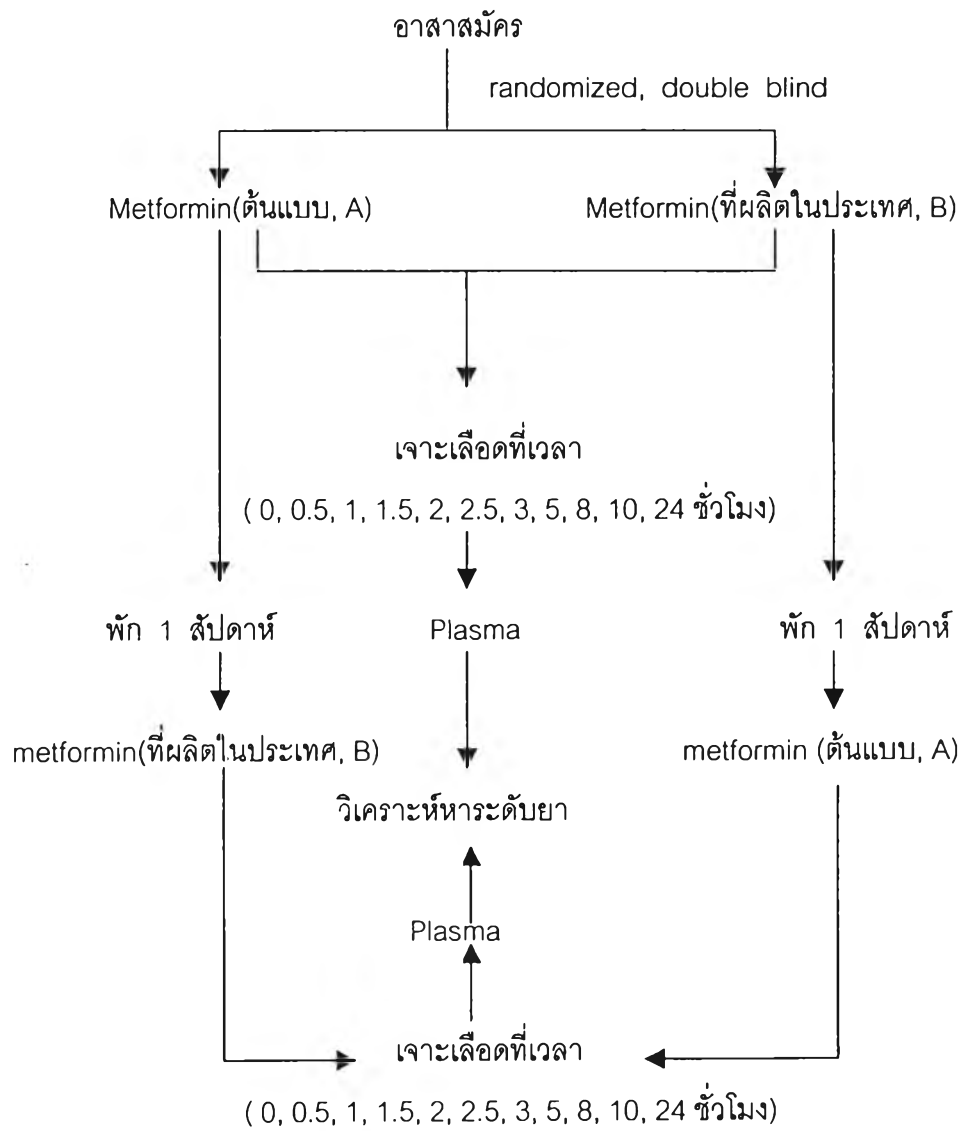
ระหว่างการทดลองอาสาสมัครจะต้องไม่รับประทานอาหารหรือยาอื่น ๆ นอกเหนือจากที่กำหนด รวมถึงเครื่องดื่มที่มีคาเฟอีนและแอลกอฮอล์ทุกชนิด

3. การเก็บตัวอย่างเลือด

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครทุกคนก่อนรับประทานยาและที่ 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 5, 8, 10, 24 ชั่วโมงหลังรับประทานยา โดยเก็บตัวอย่างละ 7 ml จำนวน 11 ครั้ง เก็บในหลอดทดลองที่เคลือบด้วยน้ำยาเฮปาริน และนำมาทำการปั่นแยกพลาสมาที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แยกชั้นพลาสมาไปเก็บที่ อุณหภูมิ -70°C จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์หาระดับยา metformin ในเลือดต่อไป

4. การวิเคราะห์หาระดับยา metformin ในพลาสมา

การวิเคราะห์หาระดับยา metformin จะใช้วิธี high performance liquid chromatography (HPLC) โดยพัฒนามาจากวิธีของ Huupponen R. et al. และ Jean D. L. et al. โดยนำ ตัวอย่างพลาสมาวิเคราะห์หาระดับยา และนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของ metformin ในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ และนำมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของ metformin กับเวลา และคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญทางเภสัชจลนศาสตร์ต่อไป นอกจากนี้ยังทำการประเมินคุณสมบัติทางเคมีวิเคราะห์ ได้แก่ การศึกษาความเที่ยงตรง (precision study) ความแม่นยำ (accuracy) และความไว (sensitivity) (ดังแสดงที่ภาคผนวก ค.)



รูปที่ 7 แผนภูมิแสดงวิธีการศึกษาในอาสาสมัคร

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

ตารางที่ 2 แสดงการให้ยา metformin (A,B) แก่อาสาสมัครจำนวน 12 คน ด้วยวิธี randomization, double-blind และ crossover

4.1 การเตรียม Stock solution

เตรียม metformin ความเข้มข้น 10 mg/ 10 ml ในน้ำ และเตรียม phenformin ความเข้มข้น 10 mg/ 10 ml ในน้ำ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเก็บไว้ใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

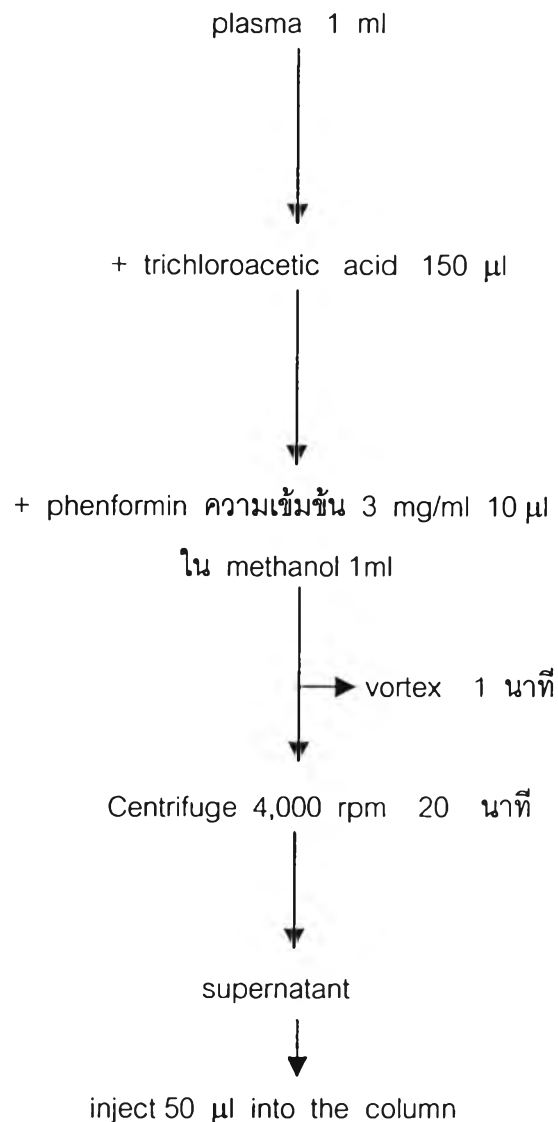
4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Metformin ในพลาสมาเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน นำ metformin ที่ความเข้มข้น 10 mg/10 ml มาเจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้นของ metformin 300 , 150, 75 , 37.5, 18.7 $\mu\text{g/ml}$ หลังจากนั้นใส่ metformin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 10 μl ลงในพลาสมาที่ปราศจากยา 990 μl นำไปเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex จะได้ความเข้มข้นของ metformin ในหลอดทดลองดังนี้ 3, 1.5, 7.5, 3.75, 1.87 $\mu\text{g/ml}$ นำไปผ่านขั้นตอนการสกัด ดังนี้

การสกัด metformin จากพลาสมา

1. นำพลาสมา 1 ml เติม 10% trichloroacetic acid 150 μl
2. เติม internal standard phenformin ความเข้มข้น 3 mg/ml 10 μl ใน methanol 1ml
3. นำไปเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 1 นาที
4. นำไป centrifuge 4,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที
5. นำส่วนที่เป็น supernatant ซีดเข้าเครื่อง HPLC จำนวน 50 μl

4.3 ภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

Injector	: Fixed loop injector 50 μl
Column	: Microbondapak C18 30 cm
Mobile phase	: 0.01 M Potassium dihydrogen phosphate pH 7.5 : acetonitrile 60:40
Flow rate	: 1 ml/นาที
Detector	: UV 236 nm
อุณหภูมิ column	: อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 8 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัด metformin จากพลาสมา

4.4 การหาค่าความเข้มข้นของ metformin ในตัวอย่างพลาสมาโดยใช้อัตราส่วนของพื้นที่ใต้ peak ระหว่าง metformin มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นกับ internal standard (phenformin) ซึ่งได้จาก chromatogram นำไปสร้างกราฟมาตรฐานโดย plot ระหว่าง peak area ratio กับความเข้มข้นของ metformin ในตัวอย่างพลาสมาจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้น โดยทำการศึกษาความเข้มข้นมาตรฐานทุกวันที่ทำการวิเคราะห์หา metformin ในพลาสมาและนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณของยาในตัวอย่างที่วิเคราะห์

5. การประเมิน และเปรียบเทียบชีวสมมูลของยาเม็ด metformin 2 ตำรับ โดยใช้ค่าพารามิเตอร์ต่อไปนี้ C_{max} , T_{max} , $AUC_{0-\infty}$

5.1. หาค่า pharmacokinetic parameters ต่าง ๆ ดังนี้

C_{max} (The peak plasma concentration) คือความเข้มข้นสูงสุดของระดับยาในพลาสมา ($\mu\text{g/ml}$) ได้จากกราฟเส้นโค้งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวยากับพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ

T_{max} (The time of peak plasma concentration) คือเวลาที่ความเข้มข้นในพลาสมาสูงสุด (ชม.) ได้จากกราฟเส้นโค้งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวยากับพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ

$AUC_{0-\infty}$ (The area under the plasma concentration-time curve) คือพื้นที่ใต้เส้นโค้งของกราฟความเข้มข้นของยาในพลาสมา กับเวลาจากเวลา 0 ถึง ∞ ชม. ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{hr}$) ค่า AUC จะบอกถึงปริมาณของยาที่เข้าสู่ระบบไหลเวียนของเลือด ซึ่งหาได้จาก trapezoidal rule หรือใช้โปรแกรม MK model

$t_{1/2}$ (half life) คือเวลาครึ่งชีวิตของการกำจัดยา (ชม.) หาได้จากสูตร

$$t_{1/2} = 0.693/K_{el}$$

K_{el} (Elimination rate constant) (ชม.^{-1}) คือ ค่าคงที่อัตราเร็วการกำจัดยา

K_a (Absorption rate constant) (ชม.^{-1}) คือค่าคงที่อัตราเร็วการดูดซึมยา

CL (Clearance) (ml/min) คือ ปริมาตรของเลือดที่ถูกขจัดยาภายในเวลา 1 หน่วย

หมายเหตุ : การหาค่า K_{el} , K_a , CL ได้จากการวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม MK model

5.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

5.2.1 การนำเสนอข้อมูลแต่ละพารามิเตอร์ใช้ค่า mean \pm standard deviation

5.2.2 การเปรียบเทียบพารามิเตอร์ต่าง ใช้สถิติดังต่อไปนี้

ก. ตัดสินชีวมมูลของผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ดำรับโดยเปรียบเทียบค่า

C_{max} , $AUC_{0-\infty}$ ระหว่างยา A, B เพื่อดูว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ ทดสอบด้วย analysis of variance for two-way cross over และ 90% confidence interval ของผลต่างค่าเฉลี่ย

C_{max} และ $AUC_{0-\infty}$ = 80-125 % สำหรับข้อมูล Log-transformed และ 80-120 % สำหรับข้อมูลปกติ และ T_{max} ทดสอบด้วย % difference อยู่ในช่วง ± 20 % ของยาดั้งแบบ

ข. T_{max} , K_{el} , K_a , $t_{1/2}$, V_d , CL ทดสอบสถิติด้วย unpaired

Student's t- test