บทที่ 2

วิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. สารเคมีและรีเอเจนต์

สารเคมีและรีเอเจนต์ใช้ AR หรือ HPLC grade ได้แก่ อะมอกซิซิลลินไตรไฮเดรต (ASEAN reference standard) ได้รับความอนุเคราะห์จากกระทรวงวิทยาศาสตร์ เซฟาดรอกซิล จาก Sigma Chemical CO, USA โซเดียมอะซิเตรตไตรไฮเดรตของ Fluka-Garantie, Switzerland ยาอะมอกซิซิลลินรูปแคปซูลยี่ห้อ Amoxil-Bencard® จาก Bencard, England Batch. No. 362032F หมดอายุวันที่ 9 กุมภาพันธ์ 2542 ยาโอมีพราโซลรูปแคปซูลยี่ห้อ Losec® จากบริษัท Astra, Sweden Batch. No. VI 6162 และน้ำตาลเด็กโตรกซ์ Phosphate buffer saline(PBS) ของ Merck, Darmstadt, Germany 70% กรดเปอร์คลอริก ของ J.T. Baker, Phillpsburg, USA อะซิโตรไนไตรล์ของ BDH Laberatory, England และเมทานอลของ Mallinckrodt, USA

2. อุปกรณ์

2.1 เครื่อง HPLC (Millipore Corperation Waters Chromatography Division, Massachusetts, USA) ประกอบด้วย Model 510 sovent delivery system, Lamda-Max Model 481 LC-Spectrophotometry detector และWaters 740 data module Fixed loop injector ขนาด 50 มค.ล. (Rheodyne 7125 injection port, Rheodyne California, USA)

2.2 Analytical column ได้แก่ Phenomenex® C18 แบบเหล็กกล้าไร้สนิม ขนาด 300 X 3.9 มม. บรรจุด้วย Bondclone C18 ขนาด 10 ไมครอนของ Phenomenex (California, USA) และ Novapak® C18 ของ Waters® associates (Massachusetts, USA) ขนาด 150 X 3.9 มม. บรรจุด้วย ซิลิก้า C18 ขนาด 4 ไมครอน

2.3 Guard-column เป็นแบบเหล็กกล้าไร้สนิม ความยาว 2 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 5 มิลลิเมตร บรรจุด้วย Bondapak® C18 / coracil (Waters associates, Massachusetts, USA) ขนาดอนุภาค 37-50 ไมครอน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 อุปกรณ์ในการส่องกล้องตรวจในกระเพาะอาหาร(Fuji photo optical Co, Saitama, Japan) ประกอบด้วย เครื่องกำเนิดสัญญาณและควบคุมสัญญาณวิดีโอพร้อมแหล่งกำเนิดแสง Model EPX - 302A จอรับภาพสี Model PVM - 1443 MD เครื่องส่องตรวจในกระเพาะอาหารชนิดวิดีทัศน์ Model EG7 - HR2 และ biopsy forceps

2.5 เครื่องผสม Vortex-2-Genie(Scientific Industries. Inc, New York,USA)

2.6 ปิเปต ได้แก่ Pipetman® ขนาด 100 และ 200 มค.ล.(Gilson, France), Biohit proline pipette ขนาด 10 มค.ล.(Biohit, Finland), Socorex® micropipette ขนาด 5 ม.ล. (Socorex, Switzerland)

2.7 เครื่อง centrifuge ได้แก่ Angle centrifuge(Ivan Sorvall, USA) และ High speed centrifuge(Universal 30 RF, Hettich Zentrifugen, Germany)

2.8 Virsonic homogenizer (Virtis CO., USA)

2.9 เครื่องชั่งสำหรับการวิเคราะห์ Mettler® (Zuerich, Switzerland) และ electronic analytical AA series(Denver Instrument CO, USA)

2.10 อุปกรณ์ในการกรองสารละลาย(Waters associates, Massachusetts, USA)

2.11 เครื่องคนสารละลาย (stirrer, Labinco, Netherland)

2.12 pH meter (Orion® SA 520, Orion, USA)

3. การเตรียมสารละลาย

3.1 สารละลายมาตรฐานเข้มข้นอะมอกซิซิลลินใน PBS ความเข้มข้น 2 ม.ก./ม.ล.

ชั่งอะมอกซิซิลลิน 20 ม.ก. ละลายใน PBS และปรับปริมาตรให้ครบ 10 ม.ล. ใน volumetric flask

สารละลายมาตรฐานอะมอกซิซิลลินใน PBS เพื่อใช้ในการวิเคราะห์เนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร โดยเอาสารละลายเข้มข้นอะมอกซิซิลลินมาเจือจางด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้น 100, 80, 60, 30, 10, 5 และ 1 มค.ก./ม.ล.ตามลำดับ

สารละลายมาตรฐานอะมอกซิซิลลินใน PBS เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ซีรั่ม โดยเอาสารละลายเข้มข้นอะมอกซิซิลลินมาเจือจางด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้น 2000, 1000, 500, 100 และ 50 มค.ก./ม.ล.

3.2 สารละลายมาตรฐานเข้มข้นเซฟาดรอกซิลใน PBS ความเข้มข้น 2 ม.ก./ม.ล.

ชั่งเซฟาดรอกซิล 10 ม.ก. ละลายใน PBS และปรับปริมาตรให้ครบ 5 ม.ล. ใน volumetric flask

สารละลายเซฟาดรอกซิลใน methanol โดยปิเปตสารละลายเข้มข้นเซฟาดรอกซิล 250 มค.ล. ใส่ใน volumetric flask และปรับปริมาตรให้ครบ 25 ม.ล.ด้วย methanol

3.3 สารละลาย 5% perchloric acid

ปิเปต 70% perchloric acid 714 มค.ล. ใส่ใน volumetric flask ที่มีน้ำอยู่ และปรับปริมาตรให้ครบ 10 ม.ล.ด้วยน้ำ

การคัดเลือกผู้ถูกทดลอง (Subjects)

ผู้ป่วย Non Ulcer Dyspepsia(NUD) หมายถึงผู้ป่วยที่มีประวัติปวดจุกเสียดแน่นท้องเป็นๆ หายๆ และผลจากการส่องกล้องตรวจในกระเพาะอาหารไม่พบแผลในกระเพาะอาหาร การศึกษาครั้งนี้คัดเลือกผู้ป่วย NUD จำนวน 12 คน โดยผู้ป่วยเต็มใจให้ความร่วมมือในการศึกษาและหลังจากได้รับคำอธิบายเกี่ยวกับการทดลองผู้ป่วยยินดีเซนต์ใบยินยอมก่อนทำการศึกษา ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น ที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* ได้เนื่องจากมีข้อจำกัดเรื่องเวลา จึงได้ทำการศึกษาในผู้ป่วย non ulcer dyspepsia ซึ่งเป็นผู้ป่วยกลุ่มเดียวที่สามารถเข้าร่วมการศึกษาได้โดยมีข้อบ่งชี้ในการส่องกล้องตรวจในกระเพาะอาหาร และไม่ต้องได้รับการวินิจฉัยหาเชื้อ *H. pylori* หรือการรักษาเพื่อกำจัดเชื้อดังกล่าว

เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกผู้ป่วย มีดังนี้

1.1 มีอายุระหว่าง 20-60 ปี โดยไม่จำกัดเพศ

1.2 มีประวัติปวดจุกเสียดแน่นท้องเป็นๆหายๆ

1.3 จากการส่องกล้องตรวจในกระเพาะอาหารไม่พบแผลในกระเพาะอาหาร

1.4 จากการซักประวัติผู้ป่วยไม่เป็นโรคตับและไต

1.5 ไม่มีประวัติแพ้ยาเพนนิซิลลิน

1.6 ไม่เคยได้รับการผ่าตัดกระเพาะอาหารและลำไส้

1.7 ไม่ใช่หญิงตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร

1.8 ไม่ได้ดื่มสุราเป็นประจำ

1.9 ไม่สามารถหยุดสูบบุหรี่ระหว่างเข้ารับการศึกษาได้

1.10 ไม่มีภาวะเจ็บป่วยร้ายแรงหรือเรื้อรัง

1.11 ไม่ได้รับยาที่ใช้ในการศึกษาอย่างต่อเนื่อง

1.12 ไม่เคยได้รับยาอะมอกซิซิลลิน โพรเบนเนซิด โอมีพราโซล หรือ เซฟาดรอกซิล ภายใน 14 วันก่อนการศึกษา

1.13 ไม่ได้รับยา NSAIDs เป็นประจำ

เมื่อผู้ป่วยมีอาการแพ้ยาหรือต้องการออกจากการศึกษาสามารถยุติการศึกษาก่อนสิ้นสุดการศึกษาได้ตลอดเวลา

วิธีการศึกษาทดลอง

ขั้นตอนที่ 1. การวิเคราะห์อะมอกซิซิลลินในชีวตัวอย่าง

การวิเคราะห์อะมอกซิซิลลินทั้งในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารและในซีรั่มใช้เทคนิค HPLC แบบ isocratic reversed phase ดังนี้

1. การวิเคราะห์อะมอกซิซิลลินในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร

การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารเพื่อการวิเคราะห์ HPLC ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Westblom และ Duriex(1991) และเทคนิค HPLC จาก USPNF(1995) โดยมีลำดับขั้นตอนการทำดังนี้

1.1 ชั่งน้ำหนักเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารโดยปิเปต PBS 1 ม.ล.ใส่ในหลอดทดลองนำไปชั่งน้ำหนัก จากนั้นใส่เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ได้จากการส่องกล้องตรวจในกระเพาะอาหารและตัดชิ้นเนื้อบริเวณ antrum จำนวน 6 ชิ้นในหลอดทดลองนำไปชั่งน้ำหนัก จึงแยกชิ้นเนื้อทั้ง 6 ชิ้นออกมาซับให้แห้ง เพื่อล้างยาที่เคลือบบนผิวชิ้นเนื้อออก ปิเปต PBS 1 ม.ล.ใส่หลอดทดลองใหม่แล้วจึงใส่ชิ้นเนื้อลงไป

1.2 ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างจะทำการสร้างเส้นกราฟมาตรฐานควบคู่ไปพร้อมกัน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานอะมอกซิซิลลินใน PBS ความเข้มข้นต่างๆ ดังที่กล่าวมา ปิเปตใส่หลอดทดลองละ 1 ม.ล.ซึ่งไม่มีเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร สำหรับแบลงค์ปิเปต PBS 1 ม.ล. และทำการวิเคราะห์คู่กับตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารซึ่งอยู่ในหลอดทดลองที่มี PBS 1 ม.ล.

1.3 เติมสารละลายเข้มข้นเซฟาดรอกซิล 10 มค.ล. ลงในแต่ละหลอดทดลองผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex เป็นเวลา 30 วินาที

1.4 นำเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารไป homogenized โดยใช้เครื่อง ultrasonic homogenizer เป็นเวลา 1 นาทีโดยแช่ในน้ำแข็ง อุณหภูมิ 4 °c

1.5 นำไป centrifuge โดยใช้เครื่อง high speed centrifuge ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °c เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.6 ปิเปตส่วนที่ใสฉีดเข้าเครื่อง HPLC ในปริมาตร 50 มค.ล.

สภาวะทาง HPLC

Column HPLC : Bondclone C18 ขนาดอนุภาค 10 ไมครอน ความยาวและเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ 300 X 3.9 ม.ม.

Guard column : ความยาว 2 ซ.ม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 5 ม.ม. บรรจุด้วย Bondapak® C18 / coracil (37-50 มค.ม.)

Mobile phase : 0.02 M โซเดียมอะซิเตต (pH 5.0) : อะซิโตรไนไตรล์ เท่ากับ 5 : 95

Flow rate : 1 ม.ล./นาที

Detector : UV 230 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์หาอะมอกซิซิลลินในซีรั่ม

การหาปริมาณอะมอกซิซิลลินในซีรั่ม ในการศึกษานี้ได้ดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์มาจากวิธีวิเคราะห์ของ Charles และ Chulavatnatol (1993) โดยมีวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ ดังนี้

2.1 การวิเคราะห์ตัวอย่างในซีรั่มจะทำควบคู่กับการวิเคราะห์เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติ โดยปิเปตตัวอย่างซีรั่มจากผู้ป่วย 500 มค.ล. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 ม.ล. เติม PBS 10 มค.ล. ส่วนตัวอย่างซีรั่มเพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน ปิเปตซีรั่มแบลงค์ 500 มค.ล. ใส่หลอดทดลอง เติมสารละลายมาตรฐานอะมอกซิซิลลินใน PBS 10 มค.ล. ในความเข้มข้นต่างๆกัน ผสมเข้าด้วยกันโดยใช้วอร์เทกซ์ 30 วินาที

2.2 เติมสารละลาย 5% กรดเปอร์คลอริก 50 มค.ล. + 650 มค.ล.ของสารละลายเซฟาดรอกซิลในเมทานอล(10 มค.ก./ม.ล.) ผสมเข้าด้วยกันโดยใช้วอร์เทกซ์ 45 วินาที

2.3 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องทดลอง 15 นาที

2.4 นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที

2.5 ปิเปตส่วนที่ใสฉีดเข้าเครื่อง HPLC ในปริมาตร 50 มค.ล.

สภาวะทาง HPLC

Column HPLC : Bondclone® C18 ขนาดอนุภาค 10 ไมครอน ความยาวและเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ 300 X 3.9 ม.ม. ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจากผู้ป่วย 6 คนแรก จากนั้น

ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์แยกพีคลดลง จึงเปลี่ยนมาใช้ Novapak® C18 ขนาดอนุภาค 4 ไมครอน ความยาวและเส้นผ่าศูนย์กลาง 150 X 3.9 ม.ม ในการวิเคราะห์ตัวอย่างผู้ป่วย 6 คนหลัง

Guard column : ความยาว 2 ซ.ม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 5 ม.ม. บรรจุด้วย Bondapak® C18 / coracil (37-50 มค.ม.)

Mobile phase : 0.02 M โซเดียมอะซิเตต (pH 4.0) : อะซิโตรไนไตรล์ เท่ากับ 95 : 5 ใช้กับ Bondclone® C18 และ 0.02 M โซเดียมอะซิเตต (pH 4.0) : อะซิโตรไนไตรล์ เท่ากับ 96 : 4 ใช้กับ Novapak® C18

Flow rate : 1 ม.ล./นาที

Detector : UV 230 นาโนเมตร

3. การยืนยันความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์(Validation method)

3.1 ความคงตัวของอะมอกซิซิลลินที่อุณหภูมิห้อง(Stability of amoxicillin at room temperature)

ความคงตัวของตัวของยาอะมอกซิซิลลินทั้งในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารและในซีรั่ม เมื่อเตรียมตัวอย่างดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิห้องทดลอง ถูกศึกษาโดยเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารและซีรั่ม ให้มีตัวยาอะมอกซิซิลลินใน 3 ระดับความเข้มข้น สำหรับในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารใช้ความเข้มข้น 10, 30 และ 80 มค.ก./ม.ล. ส่วนในซีรั่มใช้ความเข้มข้น 2, 10 และ 20 มค.ก./ม.ล. ทำความเข้มข้นละ 3 หลอด (n=3) วางตัวอย่างที่เตรียมทั้งหมดไว้ในห้องปฏิบัติการนำมาวิเคราะห์ที่เวลา 0 ช.ม., 3 ช.ม. และ 6 ช.ม. หลังเตรียมเสร็จหาเวลาที่ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารและซีรั่มมีความคงตัวได้นานที่สุด

3.2 ความถูกต้องของการวิเคราะห์(Accuracy)

ความถูกต้องของการวิเคราะห์ สามารถแสดงได้ในเทอมของเปอร์เซนต์การคืนกลับ (% analytical recovery)ของยาในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารหรือในซีรั่มที่เตรียมขึ้นโดยผู้อื่นจำนวน 9 ตัวอย่าง และถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณอะมอกซิซิลลินโดยเทียบกับกราฟเทียบมาตรฐาน ซึ่งเตรียมในเวลาเดียวกัน

$$\text{ค่าเปอร์เซนต์การคืนกลับ} = \frac{\text{ความเข้มข้นของยาที่วิเคราะห์ได้ X 100}}{\text{ความเข้มข้นของยาที่ถูกเตรียมขึ้น}} \quad \text{--------- 1}$$

ค่า % analytical recovery ที่คำนวณได้ไม่ควรน้อยกว่า 80 % จึงจะยอมรับได้

3.3 ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์(Precision)

ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์อะมอกซิซิลลิน ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารหรือในซีรั่มแสดงได้โดย การหาค่าความแปรปรวนของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (Intraday precision) (n=3) และการวิเคราะห์ในต่างวันกัน(Interday precision) (n = 5) ค่าความแปรปรวนในเทอมของ % Relative standard deviation (% RSD) ต้องไม่เกิน 15% จึงจะเป็นที่ยอมรับได้

3.4 ความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์ (Specificity)

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์สามารถแสดงได้ด้วยการเปรียบเทียบค่า retention time ของอะมอกซิซิลลินในสารละลายมาตรฐาน ในแบลงค์เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารและแบลงค์ซีรั่มที่เติมยาลงไป และตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารและซีรั่มที่ได้จากผู้ป่วยจริง

วิธีวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะกับตัวยาอะมอกซิซิลลิน จะต้องไม่ถูกรบกวนด้วยสารธรรมชาติในร่างกาย และต้องไม่มีความแตกต่างกันของค่า retention time ของทั้งอะมอกซิซิลลินและเซฟาดรอกซิลในโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ค่าต่างๆ ข้างต้น

3.5 ช่วงความเข้มข้นที่มีความสัมพันธ์กับค่า PAR(Linearity)

ช่วงความเข้มข้นที่มีความสัมพันธ์กับค่าอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของอะมอกซิซิลลินกับเซฟาดรอกซิล โดยเตรียมชุดความเข้มข้นต่างๆของอะมอกซิซิลลินในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารและซีรั่ม เพื่อทำการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน ซึ่งครอบคลุมความเข้มข้นของอะมอกซิซิลลินในตัวอย่างจากผู้ป่วย

ขั้นตอนที่ 2. การศึกษานำร่อง

ทำการศึกษาหาระดับยาอะมอกซิซิลลิน ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยโรคแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้นที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* ซึ่งได้รับการวินิจฉัยจากการส่องกล้องตรวจในกระเพาะอาหารและตัดชิ้นเนื้อในกระเพาะอาหารบริเวณ antrum 1 ชิ้นมาตรวจหาเชื้อโดยวิธี CLO-test ให้ผลบวกจำนวน 3 ราย ผู้ป่วยจึงรับประทานยาโอมีพราโซล 20 ม.ก. วันละ 2 ครั้งร่วมกับอะมอกซิซิลลิน 500 ม.ก.วันละ 4 ครั้งเป็นเวลา 7 วัน หลัง 24.00 น.ของคืนวันที่ 6 ผู้ป่วยงดน้ำงดอาหารเพื่อเตรียมตัวในการส่องกล้องตรวจในกระเพาะอาหาร ในเช้าวันที่ 7 หลังรับประทานยามื้อสุดท้ายผู้ป่วยจะได้รับการส่องกล้องตรวจในกระเพาะอาหารและตัดชิ้นเนื้อในกระเพาะอาหารบริเวณ antrum จำนวน 6 ชิ้นที่เวลา 0.5 ชั่วโมงหลังรับประทานยาในผู้ป่วยรายแรก ที่เวลา 1.0 และ 1.5 ชั่วโมงหลังรับประทานยาในผู้ป่วยรายที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

ในการศึกษาครั้งนี้ให้ยาอะมอกซิซิลลินเพียงครั้งเดียวโดยเพิ่มขนาดเป็น 2 เท่าของขนาดที่ใช้ปกติ เพื่อลดปัญหาการพัฒนาการดื้อยาของเชื้อในอนาคต

ขั้นตอนที่ 3. การศึกษาทดลองในผู้ป่วย

ผู้ป่วยถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มเท่ากันสุ่มเข้าสู่กลุ่มโดยใช้ตัวเลขสุ่ม(random number)เข้าสู่กลุ่ม A และ B (เติมศรี ชำนิจารกิจ, 2531)เรียงตามลำดับผู้ป่วยดังแสดงในตารางที่ 1 โดยผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มจะได้รับยาทั้ง 2 รูปแบบ(I และ II)ระยะห่างระหว่างการทดลอง 1 สัปดาห์ ดังแสดงผังการทดลองได้ดังนี้

กลุ่ม	รูปแบบ		
A	I	พัก 1	II
B	II	สัปดาห์	I

รูปแบบ I เป็นการให้ผู้ป่วยรับประทานยาหลอกโดยใช้น้ำตาลเด็กซ์โตรสในแคปซูลที่มีลักษณะเหมือนยาโอมีพราโซลร่วมกับยาอะมอกซิซิลลิน 1000 ม.ก. ส่วนรูปแบบ II ให้ผู้ป่วยรับประทานยาโอมีพราโซล 20 ม.ก.ร่วมกับยาอะมอกซิซิลลิน 1000 ม.ก. โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้ (ตารางที่ 2)

1. ผู้ป่วยรับประทานยาหลอกในรูปแบบ I ครั้งละ 1 แคปซูล วันละ 2 ครั้งเวลา 7.00 น. และ19.00 น. เป็นเวลา 7 วัน โดยเริ่มรับประทานครั้งแรก เวลา 19.00 น. ส่วนรูปแบบ II ใช้ยาโอมีพราโซล 20 ม.ก.แทนยาหลอก

2. หลัง 24.00 น.ก่อนวันทำการศึกษาจริงผู้ป่วยจะต้องงดน้ำงดอาหาร เพื่อได้รับการส่องกล้องตรวจกระเพาะอาหารในเช้าวันทำการศึกษาจริง

3. เช้าวันที่ 7 ซึ่งเป็นวันที่เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารและซีรั่ม ผู้ป่วยได้รับการใส่ veinous catheter เพื่อเก็บตัวอย่างเลือด ตัวอย่างเลือดถูกเก็บก่อนรับประทานยาครั้งสุดท้าย คือ ยาหลอก 1 แคปซูลร่วมกับอะมอกซิซิลลิน 500 ม.ก. 2 แคปซูลในรูปแบบ I โอมีพราโซล 20 ม.ก. 1 แคปซูลร่วมกับอะมอกซิซิลลิน 500 ม.ก. 2 แคปซูลในรูปแบบ II ตามด้วยน้ำ 300 ม.ล. ที่เวลา 7.00 น. จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดเวลา 0.5, 1, 1.5, 2, 4 และ 6 ชั่วโมงหลังรับประทานยา โดยเก็บตัวอย่างเลือดครั้งละ 5 ม.ล. ตั้งทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำไป centrifuge ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกซีรั่มไปใช้ในการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ภายในวันที่ทำการศึกษา

การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่เวลา 1.5 ชั่วโมงหลังรับประทานยา ผู้ป่วยจะได้รับการส่องกล้องตรวจในกระเพาะอาหารโดยแพทย์สาขาวิชาโรคทางเดินอาหาร และตัดชิ้นเนื้อในกระเพาะอาหารบริเวณ antrum จำนวน 6 ชิ้นลงในหลอดทดลองที่มี PBS 1 ม.ล. เพื่อนำไปวิเคราะห์หาอะมอกซิซิลลินในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารโดยวิธี HPLC ภายในวันที่ทำการศึกษา ภายหลังส่องกล้องตรวจกระเพาะอาหาร ผู้ป่วยสามารถรับประทานอาหารได้ตามปกติ

ตารางที่ 1 แสดงผลการสุ่มเข้าสู่กลุ่มเรียงตามลำดับผู้ป่วย

Subject No.	Experimental Groups[1]	Experimental pattern[2]	
		First visit	Second visit
1	B	II	I
2	A	I	II
3	A	I	II
4	A	I	II
5	A	I	II
6	B	II	I
7	B	II	I
8	A	I	II
9	B	II	I
10	B	II	I
11	A	I	II
12	B	II	I

[1] หมายถึง กลุ่มผู้ป่วยที่ได้จากการสุ่ม : A คือได้รับรูปแบบ I ก่อนรูปแบบ II
B คือได้รับรูปแบบ II ก่อนรูปแบบ I

[2] หมายถึง รูปแบบของการได้รับยา : รูปแบบ I คือยาหลอกกับอะมอกซิซิลลิน 1000 ม.ก.
รูปแบบ II คือโอมีพราโซล 20 ม.ก.กับอะมอกซิซิลลิน 1000 ม.ก.

ตารางที่ 2 แสดงขั้นตอนการศึกษาของรูปแบบ I และ II

วันที่ / เวลา	รูปแบบ I	รูปแบบ II
0 / 19.00 น.	รับประทานยาหลอก 1 แคปซูล	รับประทานโอมีพราโซล 20 ม.ก. 1 แคปซูล
1-6 /7.00 น., 19.00 น.	รับประทานยาหลอก 1 แคปซูล วันละ 2 ครั้ง	รับประทานโอมีพราโซล 20 ม.ก. 1 แคปซูล วันละ 2 ครั้ง
6 / 24.00 น.	งดน้ำงดอาหาร	งดน้ำงดอาหาร
7 / 7.00 น.	-เก็บตัวอย่างเลือดก่อนได้รับยา -รับประทานยาหลอก 1 แคปซูล ร่วมกับอะมอกซิซิลลิน 500 ม.ก. 2 แคปซูล ดื่มน้ำ 300 ม.ล. -เก็บตัวอย่างเลือดเวลา 0.5, 1, 1.5, 2, 4 และ 6 ชั่วโมงหลังรับประทานยา	-เก็บตัวอย่างเลือดก่อนได้รับยา -รับประทานโอมีพราโซล 20 ม.ก. 1 แคปซูลร่วมกับอะมอกซิซิลลิน 500 ม.ก. 2 แคปซูล ดื่มน้ำ 300 ม.ล. -เก็บตัวอย่างเลือดเวลา 0.5, 1, 1.5, 2, 4 และ 6 ชั่วโมงหลังรับประทานยา
/ 8.30 น.	ส่องกล้องตรวจกระเพาะอาหารและตัดชิ้นเนื้อบริเวณ antrum 6 ชิ้น	ส่องกล้องตรวจกระเพาะอาหารและตัดชิ้นเนื้อบริเวณ antrum 6 ชิ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ค่าความเข้มข้นของอะมอกซิซิลลินในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารได้จากผลของการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC คำนวนความเข้มข้นของอะมอกซิซิลลินจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของอะมอกซิซิลลินในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารได้ค่าเป็น มค.ก./ม.ล. นำค่าความเข้มข้นที่ได้หารด้วยน้ำหนักของชิ้นเนื้อทั้ง 6 ชิ้นซึ่งมีหน่วยเป็น ม.ก. ได้ค่าความเข้มข้นของอะมอกซิซิลลินในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่มีหน่วยเป็น มค.ก./ม.ก. จึงนำค่าที่ได้ในกลุ่มที่ได้รับยาหลอกร่วมกับอะมอกซิซิลลิน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาโอมีพราโซลร่วมกับอะมอกซิซิลลิน ทดสอบความแตกต่างทางสถิติที่นัยสำคัญเท่ากับ 0.05 โดยใช้ unpaired T-test

2. ค่าความเข้มข้นของอะมอกซิซิลลินในซีรั่ม ได้จากผลการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC คำนวนค่าความเข้มข้นจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานได้ค่าเป็น มค.ก./ม.ล.

3. ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของอะมอกซิซิลลินในซีรั่ม

จากการนำค่าความเข้มข้นของอะมอกซิซิลลินในซีรั่ม ที่เวลาต่างๆของผู้ป่วยแต่ละคนเมื่อได้รับยาหลอกร่วมและเมื่อได้รับโอมีพราโซลร่วม มาสร้างกราฟกับเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 6 ชั่วโมง โดยให้เวลาเป็นแกนนอนมีหน่วยเป็น ชั่วโมง และความเข้มข้นของอะมอกซิซิลลินเป็นแกนตั้งมีหน่วยเป็น มค.ก./ม.ล. จะได้ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ ดังนี้

3.1 ค่าความเข้มข้นสูงสุดของอะมอกซิซิลลินในซีรั่ม(Cmax) โดยดูจากค่าความเข้มข้นของอะมอกซิซิลลินสูงสุดในกราฟดังกล่าว หาค่าเฉลี่ย(mean)และความแปรปรวน(SD) ของค่า Cmax เมื่อได้รับยาหลอกร่วมกับยาอะมอกซิซิลลิน และเมื่อได้รับยาโอมีพราโซลร่วมกับอะมอกซิซิลลิน เปรียบเทียบกันทั้ง 2 กรณี และทดสอบความแตกต่างทางสถิติที่นัยสำคัญเท่ากับ 0.05 โดยใช้ unpaired T-test

3.2 ค่าเวลาที่พบความเข้มข้นสูงสุดของอะมอกซิซิลลินในซีรั่ม(Tmax) หาค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนของค่า Tmax เมื่อได้รับยาหลอกร่วมกับอะมอกซิซิลลิน และเมื่อได้รับโอมีพราโซลร่วมกับอะมอกซิซิลลินของผู้ป่วยทั้ง 12 คน เปรียบเทียบค่า Tmax ของทั้ง 2 กรณี และทดสอบความแตกต่างทางสถิติที่นัยสำคัญเท่ากับ 0.05 โดยใช้ unpaired T-test

3.3 ค่า AUC_{0-6} ของอะมอกซิซิลลินในซีรั่ม ได้จากการคำนวนพื้นที่ใต้กราฟดังกล่าวโดยใช้ Trapezoidal rule มีหน่วยเป็น มค.ก./ม.ล.xช.ม. หาค่าเฉลี่ยและความแปรปรวนของค่า AUC_{0-6} ของอะมอกซิซิลลินเมื่อได้รับยาหลอกร่วมกับอะมอกซิซิลลิน และเมื่อได้รับโอมีพราโซลร่วมกับอะมอกซิซิลลินของผู้ป่วยทั้ง 12 คน เปรียบเทียบค่า AUC_{0-6} ทั้ง 2 กรณี และทดสอบความแตกต่างทางสถิติที่นัยสำคัญเท่ากับ 0.05 โดยใช้ unpaired T-test