บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

สารที่ใช้ในการทดลอง

1. ยาฉีดเพ็นนิซิลลินจี โซเดียม (Penicillin G sodium) ขนาด 1 ล้านยูนิต/ขวด ของบริษัท Merck Sharp & Dohme

2. สารมาตรฐานเพ็นนิซิลลินจีโซเดียม (Working Standard) : Control number 23260 potency 1665.32 ยูนิต/มิลลิกรัม ของบริษัท Dumex

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Bacto Antibiotic Medium I (Difco Laboratory) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

Bacto - Beef Extract	1.5	กรัม
Bacto - Yeast Extract	3	กรัม
Bacto - Casitone	4	กรัม
Bacto - Peptone	6	กรัม
Bacto - Dextrose	1	กรัม
Bacto - Agar	15	กรัม

4. Sodium Chloride Laboratory Reagents (BDH Chemicals)

5. Monobasic Potassium Phosphate (KH_2PO_4) Analytical Reagent (Mallinchrodt)

6. Dibasic Potassium Phosphate (K_2HPO_4) Laboratory Chemicals (M & B)

7. เชื้อ Sarcina lutea ATCC 9341

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. Safeguard Centrifuge (Clay Adams Co.)
2. Spectronic 710 (Bausch & Lomb)
3. Incubator (Thelco)
4. Hot air oven (Heraeus electronic)
5. Autoclave (Hirayama Manufacturing Corporation)
6. Sartorius Analytical Balance
7. Antibiotic Zone Reader (Fisher Scientific Co.)
8. Vaccuum Suction Pump (Arthur H Thomas Co.)
9. เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมการวิจัย เป็นผู้ใหญ่ที่เข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 23 ราย ไม่จำกัดอายุ เพศ และน้ำหนักตัว และมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

ก. เป็นผู้ป่วยด้วยโรควัณโรคปอด ปอดอักเสบหรือมะเร็งของปอดซึ่งมีน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดและแพทย์ได้ทำการผ่าตัดใส่ท่อเข้าไประหว่างชั้นของเยื่อหุ้มปอดเพื่อดูดน้ำนี้ออกทิ้งและคาท่อไว้

ข. ไม่มีประวัติการแพ้ยาในกลุ่มเพ็นนิซิลลินหรือเซฟฟาโลสปอริน

ค. ไม่เป็นโรคที่เกี่ยวกับตับและไต

ง. ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะใด ๆ ก่อนเริ่มการทดลองประมาณ 1 สัปดาห์

จ. ไม่ได้รับยาใด ๆ ในขณะทำการทดลองนอกจากยาที่ใช้ในการศึกษาซึ่งให้ในขนาดที่กำหนดเท่านั้น

2. วิธีการให้ยาและเวลาที่เจาะเก็บตัวอย่าง แบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละไม่ต่ำกว่า 10 ราย

- กลุ่มที่ 1 (จำนวนผู้ป่วย 11 ราย) ให้ยา เพ็นนิซิลลินจีโซเดียมขนาด 1 ล้านยูนิต ฉีดเข้าหลอดเลือดดำครั้งเดียว
- กลุ่มที่ 2 (จำนวนผู้ป่วย 12 ราย) ให้ยา เพ็นนิซิลลินจีโซเดียมขนาด 2 ล้านยูนิต ฉีดเข้าหลอดเลือดดำครั้งเดียว

แล้วเก็บตัวอย่างจากเลือดและน้ำในข่องเยื่อหุ้มปอดพร้อมกันที่เวลาต่าง ๆ ดังนี้

- ก่อนให้ยาทันที
- หลังให้ยา 15 นาที 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง 3 ชั่วโมง 4 ชั่วโมง 6 ชั่วโมง 8 ชั่วโมง 10 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง

3. วิธีการเก็บตัวอย่าง

3.1 ตัวอย่างจากเลือด เจาะเส้นเลือดดำที่แขนครั้งละ 2-3 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อให้เลือดแดงจับตัวเป็นลิ่ม นำมาปั่นแยกเซรุ่มที่ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที นาน 15 นาที เก็บเซรุ่ม (ส่วนใส) ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ปริมาณ

3.2 ตัวอย่างจากน้ำในข่องเยื่อหุ้มปอด เก็บตัวอย่างจากท่อที่คาไว้สำหรับดูดน้ำจากข่องเยื่อหุ้มปอดที่เวลาเดียวกันกับการเก็บตัวอย่างจากเลือดครั้งละ 2-3 มิลลิลิตร นำมาปั่นที่ความเร็ว 1,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เพื่อแยกส่วนใสไว้ เก็บไว้ที่ -20 °C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ปริมาณยา

4. การวิเคราะห์ปริมาณยาในตัวอย่าง วิเคราะห์ความเข้มข้นของยา penicillin G ในเซรุ่มและในน้ำข่องเยื่อหุ้มปอดด้วยวิธีการทางจุลชีววิทยาโดย Agar-well diffusion method โดยใช้เชื้อ Sarcina lutea ATCC 9341 เป็น test organism อาศัยหลักการวัด inhibition zone ที่เกิดจากยาในตัวอย่างเปรียบเทียบ inhibition zone ของสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้วคำนวณกลับเป็นค่าความเข้มข้นของยาในตัวอย่างได้

4.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ทำเจือจาง สารละลายที่ใช้ทำเจือจางคือ

Phosphate buffer pH 6 ซึ่งเตรียมได้โดยชั่ง monobasic potassium phosphate 8 กรัม และ dibasic potassium phosphate 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตรใน Volumetric flask นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน autoclave อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

4.2 การเตรียมสารละลาย Normal Saline Solution ชั่ง Sodium Chloride 9 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตรใน Volumetric flask นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน autoclave อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

4.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ละลาย Bacto Antibiotic Medium I 30.5 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร นำไปต้มพร้อมกับคนตลอดเวลาจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด แล้วนึ่งฆ่าเชื้อใน autoclave อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที ภายหลังการนึ่งทำลายเชื้อแล้ว pH ของอาหารจะอยู่ในช่วง 6.6 ± 0.1

4.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน เพ็นนิซิลลินจีโซเดียม ชั่งสารมาตรฐาน เพ็นนิซิลลินจีโซเดียม (Dumex) ซึ่งมี potency 1665.32 ยูนิต/มิลลิกรัม มา 12.01 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 20 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1000 ยูนิต/มิลลิลิตรนำสารละลายมาตรฐานข้างต้นมา 0.1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลาย phosphate buffer pH 6 9.9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 10 ยูนิต/มิลลิลิตร เรียกว่า Stock Solution

ก. นำ Stock solution 0.3 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลาย phosphate buffer pH 6 9.7 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.3 ยูนิต/มิลลิลิตร

ข. นำ Stock solution มา 0.4 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลาย phosphate buffer pH 6 9.6 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.4 ยูนิต/มิลลิลิตร

ค. นำ Stock solution มา 0.5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลาย phosphate buffer pH 6 9.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.5 ยูนิต/มิลลิลิตร

ง. นำ Stock solution มา 0.62 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลาย phosphate buffer pH 6 9.38 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.62 ยูนิต/มิลลิลิตร

จ. นำ Stock solution มา 0.72 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลาย phosphate buffer pH 6 9.28 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.72 ยูนิต/มิลลิลิตร

4.5 การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์ Subculture เชื้อ Sarcina lutea ATCC 9341 บน Slant agar (Bacto Antibiotic Medium I) แล้วบ่มเชื้อ (incubate) ที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 18-24 ชั่วโมงก่อนใช้ เวลาจะใช้นำมาเตรียมเป็น suspension ในสารละลาย normal saline solution ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว แล้ววัดความขุ่นด้วยเครื่อง Spectronic 710 ที่ 580 nm ให้ได้ความขุ่น 5% Transmittance

4.6 การเตรียม plate หลอมอาหารเลี้ยงเชื้อ (ซึ่งได้นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) แล้วตั้งไว้ให้ได้อุณหภูมิ 40 - 45 °C จึงผสม suspension ของเชื้อ Sarcina lutea ลงไปในอาหารในความเข้มข้น 1.5-2% แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อลงใน Sterile petri dish (ขนาด 15 x 100 มิลลิเมตร) plate ละ 10 มิลลิลิตร ปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อใน petri dish เย็นลงและแข็งตัวในอุณหภูมิห้อง

4.7 การเตรียมตัวอย่าง ตัวอย่างของเซรุ่มและน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยที่เวลาต่าง ๆ หลังให้ยานำมาทำเจือจาง (dilution) ให้เหมาะสมเพื่อให้มีความเข้มข้นของยาในตัวอย่างอยู่ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน (0.3 - 0.72 ยูนิต/มิลลิลิตร) ที่สามารถวิเคราะห์ได้ โดยใช้ phosphate buffer pH 6 เป็นตัวทำเจือจาง แต่ละตัวอย่างจะทำเจือจางเป็น 3 ความเข้มข้น แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณยาโดยทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) ในแต่ละความเข้มข้น

4.8 วิธีการวิเคราะห์ (USP XXI NFXVI ; Edberg 1980)

เจาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในจานเลี้ยงเชื้อด้วย cork borer no.2 จำนวน 6 หลุมระยะห่างเท่า ๆ กัน ดูด agar ในหลุมออกด้วยเครื่อง suction สารละลายแต่ละความเข้มข้นที่ต้องการจะวิเคราะห์ไม่ว่าจะเป็นสารละลายของสารมาตรฐานหรือสาร

ละลายตัวอย่างจะถูกหยอดลงในหลุม จานละ 3 หลุม สลับกับสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเป็นกึ่งกลางของสารละลายที่นำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน (median concentration ของ Standard curve) โดยทำซ้ำสารละลายละ 3 จาน (triplicate) ปริมาณของสารละลายที่หยอดลงในแต่ละหลุมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร เมื่อหยอดสารละลายแล้วจะตั้งจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อยครึ่งชั่วโมง แล้วจึงนำไปบ่มที่ 32-35 °C นาน 16-18 ชั่วโมง การอ่านผลจะวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (ส่วนใสรอบ ๆ หลุมที่หยอดตัวอย่าง) ด้วย zone reader

การสร้าง กราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐาน ได้มาจาก regression line ($y = ae^{bx}$) ระหว่างค่า inhibition zone (x = มิลลิเมตร) กับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (y = ยูนิต/มิลลิลิตร)

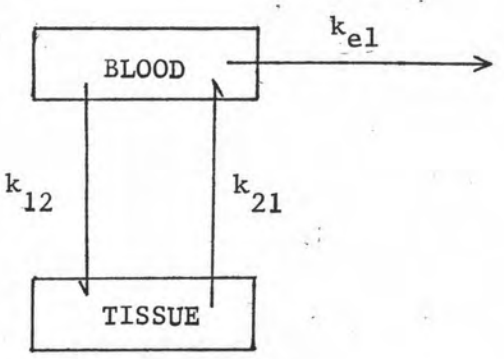
4.9 การวิเคราะห์ผลทางเภสัชจลนศาสตร์ (Notari 1980, Gibaldi และ Perrier 1975, Dittert และ Bourne 1979, Rowland และ Tozer 1980)

จากค่าความเข้มข้นของยาเพ็นนิซิลลินวีในตัวอย่างที่พบนำมาวิเคราะห์ทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetic Analysis) โดยแยกวิเคราะห์หาเภสัชจลนศาสตร์ของยาเพ็นนิซิลลินวีในเซรุ่ม และในน้ำย่องเยื่อหุ้มปอด

ในเซรุ่ม

จากความเข้มข้นของยาเพ็นนิซิลลินวีที่ปรากฏในเซรุ่มที่เวลาต่าง ๆ หลังให้ยา นำมาสร้าง compartment models สำหรับยานี้ในเซรุ่ม การพิจารณาความเหมาะสมของ model ที่สร้างขึ้น (test the goodness of fit) สามารถดูได้จากค่า Coefficient of variation (C.V.) ซึ่งบ่งถึงความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นที่คำนวณได้กับความเข้มข้นของยาที่พบจริง ๆ model ใดที่ให้ค่า C.V. ต่ำกว่าแสดงว่า model นั้นใช้อธิบายข้อมูลได้ดีกว่า (เพราะสามารถทำนายระดับยาที่เวลาต่าง ๆ ได้ใกล้เคียงกับค่าที่พบจริง ๆ มากกว่า) ตัวอย่างการคำนวณหาค่า C.V. ดูได้จากภาคผนวก ค.

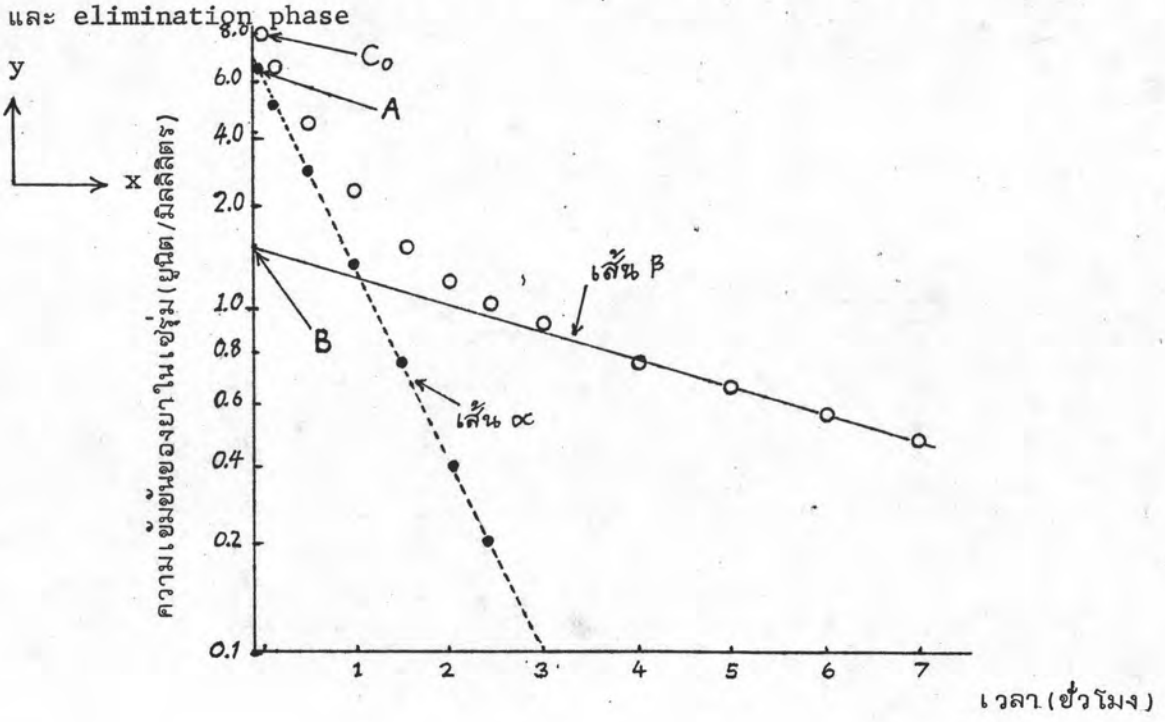
จากผลการทดลองปรากฏว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับยา เพ็นนิซิลลินจีในเซรุ่ม ทั้งสองขนาดการใช้ เป็น first order rate process ซึ่งอธิบายได้ดีด้วย two-compartment open model



ค่าความเข้มข้นของยาในเซรุ่มที่เวลาใด ๆ สามารถคำนวณได้จากสมการ biexponential

$$C_t = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \qquad \text{(1)}$$

ค่า A, B, α, β หาได้จากการทำ regression line ที่ได้จากการ plot กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของยาในเซรุ่ม (ln C = ยูนิต/มิลลิลิตร) กับเวลา (t = ชั่วโมง)บนกระดาษ semilog ซึ่งกราฟที่ได้เป็น biphasic curve สามารถสังเกตเห็น distribution phase และ elimination phase



เส้น β ได้จากการลากเส้นตรงจากจุดข้อมูล (experimental points) ในช่วงปลาย ๆ (elimination phase) ไปตัดแกน y B ได้จากค่า intercept βได้จากค่า slope เส้น α ได้จากผลต่างของจุดข้อมูลในช่วงต้น ๆ (distribution phase) กับเส้น β A ได้มาจากค่า intercept ของเส้นนี้ และ α ได้มาจากค่า slope

ค่าครึ่งชีพ (Biological half life, $t_{\frac{1}{2}}$) คือระยะเวลาที่ยาจะถูกขจัดออกจากร่างกายไปครึ่งหนึ่งของปริมาณที่มีอยู่ ยาที่มีการขจัดออกจากร่างกายแบบ first-order process จะมีค่าครึ่งชีพคงที่โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นแรกเริ่มหรือขนาดยา สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0.693}{\beta} \qquad \text{(2)}$$

ค่าพื้นที่ภายใต้เส้นโค้งระดับยาในเลือด - เวลา (Area under the serum concentration-time curve, AUC_s) สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$AUC_s = \frac{A}{\alpha} + \frac{B}{\beta} \qquad \text{(3)}$$

ค่า Volume of Distribution (Vd) ในกรณีนี้ใช้คำนวณจากค่า AUC_s เนื่องจากเป็นการให้ยาแบบ rapid intravenous injection ค่า Vd ที่คำนวณได้จากสูตรนี้จะเรียกว่า Vd, area หรือ Vd, β

$$Vd = \frac{Do}{(AUC)(\beta)} \qquad \text{(4)}$$

ค่า Clearance (CL)คือค่าคงที่ของอัตราเร็ว ของการขจัดยาออกจากร่างกาย สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$CL = \beta.Vd \qquad \text{(5)}$$

ค่า k_{12} และ k_{21} เป็นค่าคงที่ของอัตราเร็วของการเคลื่อนย้ายของยาระหว่าง Compartment ที่ 1 และ 2 (เลือดและ Tissue ค่า k_{el} เป็นค่าคงที่ของอัตราเร็วของการขจัดยาออกจากเลือด ค่าα, β, A, และ B ที่หามาได้จาก biphasic curve ข้างต้น เป็นค่าปรากฏที่ประกอบขึ้นจากค่า microconstant ต่าง ๆ เหล่านี้ประมวลกันเข้า

i17095670

ดังนั้นค่า microconstant ทั้ง 3 ตัวจึงสามารถคำนวณได้โดยอาศัยสมการดังต่อไปนี้คือ

$$k_{21} = A'\beta + B'\alpha \qquad (A' = \frac{A}{A+B}, \; B' = \frac{B}{A+B}) \quad \text{——— (6)}$$

$$k_{el} = \frac{\alpha\beta}{k_{21}} \quad \text{——— (7)}$$

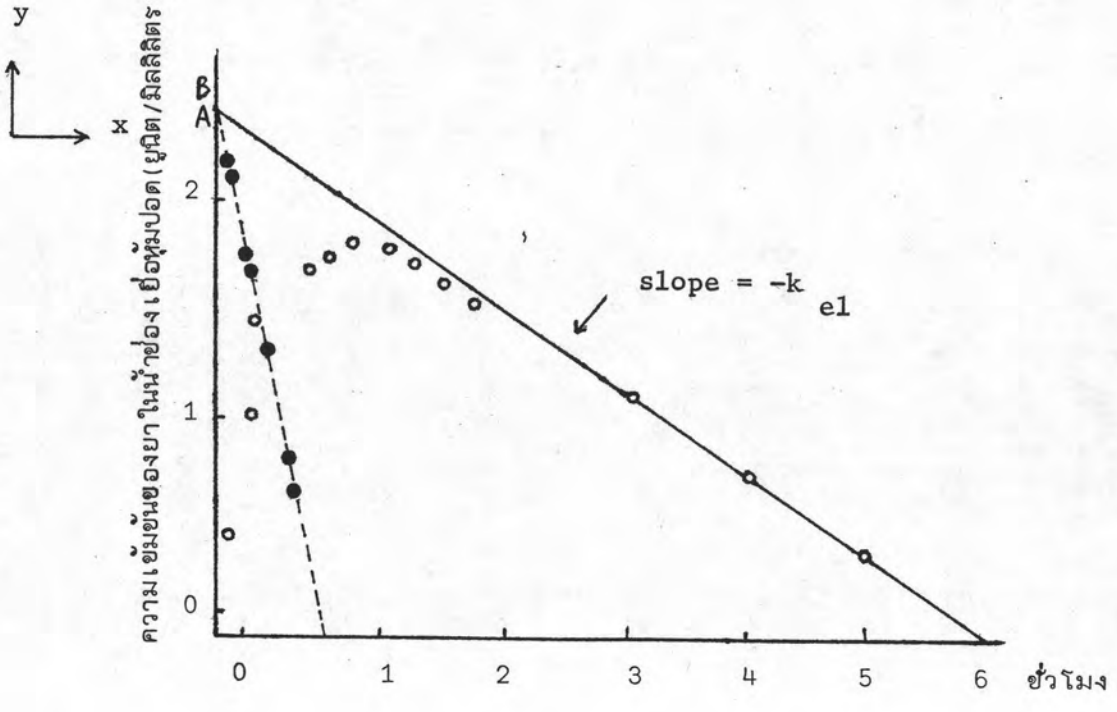
$$k_{12} = \alpha + \beta - k_{el} - k_{21} \quad \text{——— (8)}$$

<u>ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอด</u>

จากผลการทดลองปรากฏว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับยาในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดเป็น first order rate process ซึ่งอธิบายได้ดีด้วย One-compartment open model ค่าความเข้มข้นของยาในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดที่เวลาใด ๆ สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$C_t = Be^{-k_{el}.t} - Ae^{-k_a.t} \quad \text{——— (9)}$$

ค่า A, B, k_a, k_{el} หาได้จากการทำ regression line ที่ได้จากการ plot กราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของยาในเซรุ่ม (ln C = ยูนิต/มิลลิลิตร) กับเวลา (t = ชั่วโมง) บนกระดาษ semilog ดังแสดงในรูปข้างล่างนี้



ในช่วงต้นขณะที่ระดับยาค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเรียกว่า absorption phase และช่วงปลายที่ระดับยาค่อย ๆ ลดลงเรียกว่า elimination phase จากค่าความเข้มข้นของยาในช่วง elimination phase เมื่อลากเส้นตรงไปตัดแกน y ค่า intercept ที่ได้คือค่า B และ k_{el} ได้จากค่า slope เส้น k_a ได้จากผลต่างของความเข้มข้นของเส้น k_{el} กับค่าความเข้มข้นของจุดข้อมูลในช่วง absorption (การดูดซึมของยาจากเลือดเข้าสู่น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด) ที่วัดได้ ค่า A หาได้จากค่า intercept ของเส้นนี้ และค่า k_a ได้จากค่า slope

ค่าครึ่งชีพ (half life) ของยาเพนิซิลลินจีในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0.693}{k_{el}} \qquad (10)$$

พื้นที่ภายใต้เส้นโค้งระดับยาในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอด - เวลา (Area under the pleural fluid concentration - time curve, AUC_p) สามารถคำนวณได้โดยใช้ trapezoidal rule แล้วรวมกับพื้นที่จากจุดสุดท้ายที่ทำการเก็บตัวอย่างไปถึง infinity ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$AUC_{tx\rightarrow\infty} = \frac{Cx}{k_{el}} \qquad (11)$$

ค่า Cx คือค่าความเข้มข้นในช่องเยื่อหุ้มปอดที่เวลาสุดท้าย (t_x) ที่เก็บตัวอย่าง

เวลาที่ความเข้มข้นของยาในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดถึงจุดสูงสุด (time to peak, t_p) และความเข้มข้นสูงสุดของยาที่สามารถพบได้ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอด (peak concentration, C_p) สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$t_p = \frac{2.303}{k_a - k_{el}} \cdot \log \frac{ka}{k_{el}} \qquad (12)$$

$$C_p = Be^{-k_{el} \cdot t_p} - Ae^{-k_a \cdot t_p} \qquad (13)$$