



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาอะเดโนโรเนตในพลาสม่าและปัสสาวะจากผู้ป่วย โดยวิธีแยกสารประสิทธิภาพสูง

**Development of an analytical method for determination of alendronate sodium
in plasma and urine from patients by high-performance liquid chromatography**

โดย

ดร.กมลทิพย์ วิวัฒนวงศ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นฤบดี พุดสมบัติ
อ.ชลิตพล ณ นคร

การนี้ได้รับสนับสนุนการจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประเภทพัฒนานักวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2553
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

บทคัดย่อ

อะเลน โครเนตเป็นยาในกลุ่มบิสฟอสโฟเนต ที่ใช้ป้องกันและรักษาโรคกระดูกพรุนในหญิงวัยหมดประจำเดือน และโรคกระดูกพรุนที่เกิดจากการใช้ยากลุ่มคอร์ติโคสเตียรอยด์ หลังจากยาถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดแล้ว ยากลุ่มนี้จะกระจายตัวไปยังเนื้อเยื่อที่ปราศจากแคลเซียม และเนื้อเยื่อที่มีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ โดยไม่ถูกเปลี่ยนแปลงที่ดับและไม่มีการขับออกทางน้ำดี เช่นเดียวกับยาในกลุ่มบิสฟอสโฟเนตชนิดอื่น ๆ แต่มีการขัดขวางออกทางได้เป็นหลัก การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาอะเลน โครเนตที่มีรายงานส่วนใหญ่เป็นการศึกษาเพื่อหาปริมาณยาจากพลาสma และปั๊สสาวะในอาสาสมัครสุภาพดีโดยเทคนิค HPLC ที่ตรวจด้วย fluorescence แต่ยังไม่มีการศึกษาในประเทศไทยโดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคไทดีเรื้อรัง การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาจากพลาสma และปั๊สสาวะ เพื่อศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาอะเลน โครเนตในอาสาสมัครสุภาพดีและในผู้ป่วยโรคไทดีเรื้อรัง โดยการเก็บตัวอย่างเลือดและปั๊สสาวะที่เวลาค้าง ๆ เป็นเวลา 10 ชั่วโมงหลังรับประทานยา และวิเคราะห์หาปริมาณยาโดยเทคนิค HPLC ที่ตรวจด้วย fluorescence ตัวอย่างปั๊สสาวะที่ได้จะผ่านกระบวนการสกัดโดยการตกรตะกอนด้วยแคลเซียมในสภาวะค้าง ส่วนตัวอย่างพลาสma ที่ได้จะตกรตะกอนโดยตีนตัวยสารละลายกรด trichloroacetic ก่อนการตกรตะกอนด้วยแคลเซียม จากนั้นทำตัวอย่างให้สะอาดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยตัวดูดซับของเชิง โดยใช้ diethylamine (DEA) และผ่านการทำอนุพันธ์ด้วย 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) ก่อนวิเคราะห์หาปริมาณด้วย HPLC โดยใช้ column ชนิด C-18 และ mobile phase ประกอบด้วยสารละลายผสมของ acetonitrile-methanol-citrate/pyrophosphate buffers และคือ 1% เพิ่มสัดส่วนของตัวทำละลายอินทรี (สารละลายผสมของ acetonitrile และ methanol สัดส่วน 1:1) จาก 32% เป็น 40% v/v ที่อัตราการไหล 1.5 ml/min ตรวจด้วย fluorescence ที่ความยาวคลื่น 260 nm (excitation) และ 310 nm (emission) ที่อุณหภูมิ 35 °C อะเลน โครเนตสามารถแยกออกจากพามิโครเนตที่ใช้เป็น internal standard ได้ที่เวลา 9.40 และ 11.4 นาที ตามลำดับ ใช้วิธีในการวิเคราะห์รวม 40 นาที ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ มีค่าขีดจำกัดของการวัด เท่ากับ 5.13 ng/ml เมื่อใช้พลาสma 3 ml และมีค่า 5.27 ng/ml เมื่อใช้ปั๊สสาวะ 1 ml ค่าต่ำสุดที่ตรวจได้ในพลาสma มีค่า 20.84 ng/ml และในปั๊สสาวะ มีค่า 16.67 ng/ml การทดสอบความเป็นเส้นตรงของเส้นกราฟมาตรฐาน ได้ผลเป็นเส้นตรง ที่ความเข้มข้น 0-100 ng/ml ในพลาสma และ 0-200 ng/ml ในปั๊สสาวะ การทดสอบความถูกต้องในพลาสma ได้ผลเท่ากับ 99.55%, 94.63% และ 98.48% ที่ความเข้มข้น 15, 40 และ 80 ng/ml ตามลำดับ ส่วนการทดสอบความถูกต้องในปั๊สสาวะ ได้ผลเท่ากับ 82.47%, 119.88% และ 105.10% ที่ความเข้มข้น 5, 15 และ 40 ng/ml ตามลำดับ ความแม่นยำของ การทดสอบ (%RSD) ในพลาสma อยู่ในช่วง 6.38-18.6% (within run) และ 9.93-13.2% (between run) ความแม่นยำของ การทดสอบในปั๊สสาวะ อยู่ในช่วง 1.54-14.3% (within run) และ 2.58-19.7% (between run) เมื่อเก็บตัวอย่างพลาสma ไว้ในอุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 45 วันเพื่อทดสอบความคงค้าง พนบฯ ปริมาณยาคงเหลือในพลาสma มีค่าเท่ากับ 97.0% และ 97.7% ที่ความเข้มข้น 50 และ 150 ng/ml ตามลำดับ

ผลการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ในผู้ป่วยโรคไทดีเรื้อรัง จำนวน 8 คน ที่เข้าร่วมการศึกษามีอายุระหว่าง 43-81 ปี มีค่าการทำงานของไตระหว่าง 39.02-59.84 ml/min/1.73 m² ค่าเฉลี่ย (ช่วง) ของค่าพารามิเตอร์ทางเภสัช จลนศาสตร์ที่ในดังนี้ ระดับยาสูงสุดในพลาสma 59.9 (42.7-77.1) ng/ml พื้นที่ได้กราฟระดับยาในพลาสma 335.5

(203.9-810.9) ng.h/ml ค่าครึ่งชีวิตของยาในพลาสม่าเท่ากับ 7.65 (2.22-17.5) h และค่าการกำจัดยา (plasma clearane) เท่ากับ 249.4 (177.6-321.2) L/h ส่วนอัตราการขับยาออกสูงสุดทางปัสสาวะและปริมาณยาที่ขับออกทางปัสสาวะทั้งหมด มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 46.49 $\mu\text{g}/\text{h}$ และ 209.6 μg ตามลำดับ ค่าพารามิเตอร์ทางเกสซ์ชลนศาสตร์จากระดับยาในพลาสม่าและปัสสาวะของอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 7 คน มีค่าใกล้เคียงกันกับการศึกษาที่มีมาก่อนหน้า ผลการศึกษาแสดงว่า ค่าพื้นที่ได้รับการลดลงของยาในพลาสม่าที่มีค่าเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคไตรเรื้อรังเมื่อเทียบกับอาสาสมัครสุขภาพดี อาจสัมพันธ์กับการทำงานของไทด์ลอด ซึ่งสอดคล้องกับค่าคงที่ในการกำจัดยาและค่าการกำจัดยาที่ลดลง และค่าครึ่งชีวิตของยาในพลาสม่าที่สูงขึ้นในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ข้อมูลการกำจัดยาทางปัสสาวะแสดงแนวโน้มเดียวกันที่แสดงว่าอัตราการขับออกสูงสุดและปริมาณยาที่ขับออกทางปัสสาวะมีค่าน้อยลง อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ ไม่ได้อธิบายผลค้านปริมาตรการกระจายยา ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่มีความสำคัญในการอธิบายผลการเปลี่ยนแปลงค่าพารามิเตอร์ทางเกสซ์ชลนศาสตร์ในผู้ป่วยโรคไตรเรื้อรัง เช่น ค่าการกำจัดยา และค่าครึ่งชีวิตของยา เป็นต้น

ABSTRACT

Alendronate is an antiresorptive agent with proven benefit in the prevention and treatment of postmenopausal and corticosteroid-induced osteoporosis. After oral absorption, it was normally distributed to non-calcified tissue and calcified tissue. Alendronate is neither subjected to hepatic metabolism nor biliary excretion. It was exclusively eliminated via renal excretion. Alendronate therapy in patients with chronic kidney disease (CKD) who sustain a bone fracture is increasingly relevant. Although a number of pharmacokinetic studies in healthy subjects have been recently reported, pharmacokinetic of alendronate in impaired renal function have not been investigated. The purpose of this study is to validate an experimental method to measure alendronate in plasma and urine samples in investigating pharmacokinetic of alendronate in CKD patients using plasma and urine data. Blood and urine samples were collected for 10 hours after administration. High-performance liquid chromatographic (HPLC) technique with fluorescence detection was employed for the determination of alendronate in plasma and urine. The sample preparation technique involved co-precipitation of alendronate in the sample with calcium chloride and potassium phosphate under alkaline condition. Plasma samples were cleaned up by precipitation of plasma protein using TCA prior to calcium coprecipitation step. Subsequent cleanup process was performed by solid-phase extraction (SPE) using diethylamine (DEA) cartridge. The analyte was finally derivatized with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) and subjected to HPLC analysis. Separation was performed on a C₁₈ column and mobile phase consists of acetonitrile-methanol-citrate/pyrophosphate buffers. Percentage of the organic solvent in the mobile phase was increased from 32% to 40% v/v at a constant flow rate 1.5 ml/min. Fluorescence detection was operated at 260 nm (excitation) and 310 nm (emission). At 35°C, alendronate was well separated from pamidronate (IS) with retention time of 9.40 and 11.4 min, respectively. Total analysis time was 40 minutes per sample. The method was validated accordingly: LOD = 5.13 ng/ml using 3 ml plasma; LOD = 5.27 ng/ml urine using 1 ml urine; LLOQ = 20.84 ng/ml in plasma and 16.67 ng/ml urine. The calibration curves were linear over the concentration range of 0.0-100 ng/ml and 0.0-200 ng/ml with r² > 0.99 for plasma and urine, respectively. Accuracy in plasma were 99.55%, 94.63% and 98.48% at 15, 40 and 80 ng/ml, respectively. Accuracy in urine were 82.47%, 119.88% and 105.10% at 5, 15 ng/ml and 40 ng/ml, respectively. Precisions in plasma ranged from 6.38-18.6% (within-run) and 9.93-13.2% (between-run). Precisions in urine ranged from 1.54-14.3% (within-run) and 2.58-19.7% (between-run), respectively. When stored at -20°C for 45 days, the amount of alendronate in plasma was 97.0% and 97.7% of initial amount at 50 and 150 ng/ml, respectively.

Eight CKD patients at 43-81 years and GFR 51.92 (range 39.02-59.84) ml/min/1.73 m² were included in the study. The mean (range) of the following pharmacokinetic parameters were AUC_{0-∞}, C_{max} and t_{1/2} were 335.5 (203.9 to 810.9) ng.h/ml, 59.9 (42.7 to 77.1) ng/ml, and 7.65 (2.22 to 17.5) h, respectively. Maximum urinary excretion rate and total amount excreted in urine were 46.49 μg/ml and 209.6 μg, respectively. Both plasma

pharmacokinetic data and urinary excretion data from healthy volunteers were consistent with previously reported values. Results in CKD patients showed elevated AUC and elimination half-life but reduced k_e and Cl/F. Well corresponding to plasma data, urinary excretion profile showing low total amount excreted and low maximum excretion rate in CKD patients was observed. Whether distribution pattern was altered remained inconclusive. Volume of distribution can assist in delineating the altered pharmacokinetic parameters (i.e. clearance and elimination half life) in CKD patients.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้จัดขอขอบคุณ พันเอก นพ.อำนวย ชัยประเสริฐ อายุรแพทย์โรคไต รวมถึงพยาบาล และเจ้าหน้าที่ของ หน่วยไต โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า กรุงเทพมหานคร ใน การให้ความร่วมมือและให้ความช่วยเหลือในการหา ผู้ป่วยเข้าร่วมโครงการวิจัย ขอขอบคุณ พันเอก นพ.อุปัมม์ ศุภสินธุ์ พยาบาล นักเทคนิคการแพทย์ และ นักวิทยาศาสตร์ ของศูนย์วิจัยการแพทย์ทางคลินิก โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ใน การเอื้อเพื่อสถานที่และการ ให้ ความช่วยเหลือในการเจาะเลือดผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัย และให้กำลังใจในการทำงานวิจัยเสมอ

ขอขอบคุณ รศ.พญ.รัตนा ถีดาวัฒนา พยาบาลและเจ้าหน้าที่ ภาควิชาต่อมไร้ท่อและเมตาบoliسم โรงพยาบาลส่งขลานครินทร์ ใน การให้ความช่วยเหลือในการหาผู้ป่วยเข้าร่วมโครงการวิจัยเพิ่มเติม ขอขอบคุณคุณธีติ มา ชูโฉน ในการให้ความช่วยเหลือในการเตรียมตัวอย่าง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านของ ศูนย์บริการปฏิบัติการทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับการให้ใช้สถานที่ เครื่องมือวิเคราะห์ ให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาในการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำเสียงสีน้ำเงิน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
ABSTRACT	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
สารบัญตาราง	(7)
สารบัญรูปภาพ	(8)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(10)
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัสดุประสงค์	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	
2.1 เภสัชวิทยา (Pharmacology)	3
2.2 เภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics)	5
2.3 การศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยา alendronate ในพลาสม่าและปัสสาวะ	8
บทที่ 3 ประเมินวิธีวิจัย	
3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์โดย HPLC และตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนซ์	14
3.2 การเตรียมสารละลายน้ำตราชูน	15
3.3 การเตรียมตัวอย่างพลาสม่าและปัสสาวะ	15
3.4 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา	17
3.5 การตรวจสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)	18
3.6 การประยุกต์วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น	21
3.7 ตัวอย่างจากอาสาสมัคร	21
3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล	22
บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผลการศึกษา	
4.1 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	24
4.2 การประยุกต์วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ในผู้ป่วย ที่กำลังใช้ยา alendronate	30
4.3 อภิปรายผลการศึกษา	36
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา	40
บรรณานุกรม	41

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2-1 วิธีวิเคราะห์ปริมาณยา alendronate ในชีวของเหลวโดย HPLC-fluorescence detection	12
ตารางที่ 2-2 ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชลนศาสตร์ (mean \pm SD) ของยา alendronate แบบรับประทานที่ได้จากการศึกษา 2 การศึกษา	12
ตารางที่ 2-3 ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชลนศาสตร์ (mean \pm SD) ของยา alendronate ในรูปแบบรับประทานที่ได้จากการศึกษา 2 การศึกษา	13
ตารางที่ 3-1 ความเข้มข้นและปริมาตรสารละลายน้ำครรภาน alendronate ที่ใช้ในการศึกษา linearity ในพลาสม่า	19
ตารางที่ 3-2 ความเข้มข้นและปริมาตรสารละลายน้ำครรภาน alendronate ที่ใช้ในการศึกษา linearity ในปัสสาวะ	19
ตารางที่ 4-1 ขีดจำกัดในการตรวจจับและขีดจำกัดในการหาปริมาณยา alendronate ในพลาสม่า และปัสสาวะ	28
ตารางที่ 4-2 Accuracy และ Precision (within run and between run) ของ alendronate จากการทดสอบในพลาสม่า	28
ตารางที่ 4-3 Accuracy และ Precision (within run and between run) ของ alendronate จากการทดสอบในปัสสาวะ	29
ตารางที่ 4-4 Recovery ของ alendronate และ pamidronate จากการทดสอบในพลาสม่าและ ปัสสาวะ	29
ตารางที่ 4-5 ผลการทดสอบความคงตัว (stability) ของยา alendronate ในพลาสม่า	29
ตารางที่ 4-6 ลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยโรคไตรีอรังที่เข้าร่วมการศึกษา	31
ตารางที่ 4-7 ลักษณะทั่วไปของอาสาสมัครสุขภาพดีที่เข้าร่วมการศึกษา	31
ตารางที่ 4-8 พารามิเตอร์ทางเภสัชลนศาสตร์จากผู้ป่วยโรคไตรีอรังและอาสาสมัครสุขภาพดี และผลวิเคราะห์ทางสถิติ	32
ตารางที่ 4-9 พารามิเตอร์ทางเภสัชลนศาสตร์ในปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคไตรีอรังและอาสาสมัครสุขภาพดี และผลวิเคราะห์ทางสถิติ	33
ตารางที่ 4-10 พารามิเตอร์ทางเภสัชลนศาสตร์ในพลาสม่าของอาสาสมัครสุขภาพดีหลังรับประทานยา alendronate sodium ขนาด 70 mg (Fosamax [®]) เปรียบเทียบกับการศึกษาที่มีรายงาน	35
ตารางที่ 4-11 พารามิเตอร์ทางเภสัชลนศาสตร์ในปัสสาวะของอาสาสมัครสุขภาพดีหลังรับประทานยา alendronate sodium ขนาด 70 mg (Fosamax [®]) เปรียบเทียบกับการศึกษาที่มีรายงาน	39

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 2-1 โครงสร้างของ pyrophosphate (A) กับ โครงสร้างของยาคุณ bisphosphonates (B)	3
รูปที่ 2-2 โครงสร้างของยาคุณ BPs ที่แบ่งได้เป็น BPs ที่ปราศจากไนโตรเจนในโครงสร้าง (non-nitrogen containing bisphosphonate, non-nBPs) และ BPs ที่มีไนโตรเจนในโครงสร้าง (nitrogen containing bisphosphonate, nBPs)	4
รูปที่ 2-3 กราฟแสดงระดับยา alendronate ในพลาสมากับเวลาที่ได้จากการวิจัยที่เดือน กายหลังจากบริหารยา alendronate ขนาด 10 mg แบบ IV infusion ($n = 6$)	6
รูปที่ 2-4 ปริมาณยาที่ขับออกในปัสสาวะในหน่วยวันดัชนีประจำเดือน กายหลังจากการบริหารยา alendronate ขนาด 10 mg แบบ IV infusion เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ($n = 6$)	7
รูปที่ 2-5 กราฟแสดงระดับยา alendronate ในพลาสมากับเวลาที่ได้จากการวิจัยที่เดือน กายหลังจากการรับประทานยา alendronate sodium 70 mg ($n = 4$)	7
รูปที่ 2-6 อัตราการขัดออกทางไถ (excretion rate) ของยา alendronate กับเวลาในอาสามัคร สุขภาพดีที่ได้รับยา alendronate sodium tablet (Fosamax [®]) 70 mg ($n = 7$)	8
รูปที่ 2-7 โครงสร้างทางเคมีของ alendronate (4-amino-1-hydroxybutylidene-1,1-bisphosphonate)	9
รูปที่ 2-8 ขั้นตอนการเตรียมชิวตัวอย่าง (biological sample) โดยวิธี calcium precipitation ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร bisphosphonates	10
รูปที่ 4-1 กราฟมาตรฐานของสัญญาณระหว่าง alendronate เปรียบเทียบกับ pamidronate ในพลาสม่า ที่ได้จากการทดสอบ ณ ช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 3 ครั้ง	24
รูปที่ 4-2 กราฟมาตรฐานของสัญญาณระหว่าง alendronate เปรียบเทียบกับ pamidronate ในปัสสาวะ ที่ได้จากการทดสอบ ณ ช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 3 ครั้ง	25
รูปที่ 4-3 Chromatogram ของพลาสม่าที่ได้จาก (A) ผู้ป่วยก่อนได้รับยา (pre-dose) ที่เดิน pamidronate (IS) ความเข้มข้น 200 µg/ml (ทำ background subtraction) และ (B) พลาสม่าที่ได้จากผู้ป่วย ที่เวลา 1 ชั่วโมงหลังรับประทานยา (ทำ background subtraction)	26
รูปที่ 4-4 Chromatogram ของปัสสาวะที่ได้จาก (A) Blank human urine ที่เดิน pamidronate (IS) ความเข้มข้น 200 µg/ml (ไม่ได้ทำ background subtraction) และ (B) ปัสสาวะที่ได้จากผู้ป่วย ที่เวลา 0-2 ชั่วโมง หลังรับประทานยา (ทำ background subtraction)	27
รูปที่ 4-5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระดับยาเฉลี่ยในพลาสมากับเวลาของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง หลังรับประทานยา alendronate sodium 70 mg ($N = 8$)	32
รูปที่ 4-6 แผนภูมิแสดงอัตราการกำจัดยาทางปัสสาวะ (Mean urinary excretion rate) กับเวลา (mid time) ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง กายหลังรับประทานยา alendronate sodium 70 mg ($N=8$)	33
รูปที่ 4-7 กราฟแสดงปริมาณที่ถูกขับออกทางปัสสาวะ (Mean cumulative amount excrete in urine) กับเวลา (mid time) ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่รับประทานยา alendronate sodium 70 mg ($N=8$)	33
รูปที่ 4-8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระดับยาในพลาสมากับเวลาเฉลี่ยของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังและ จากรากอาสามัครสุขภาพดีหลังรับประทานยา alendronate sodium 70 mg จำนวน 1 เม็ด	34

สารบัญรูปภาพ

หน้า

- | | |
|--|----|
| รูปที่ 4-9 กราฟแสดงอัตราการกำจัดยาทางปัสสาวะ (Mean urinary excretion rate) กับเวลา (Mid time) ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง เปรียบเทียบกับอาสาสมัครสุขภาพดี หลังรับประทานยา alendronate sodium 70 mg จำนวน 1 เม็ด | 35 |
| รูปที่ 4-10 กราฟแสดง Mean cumulative amount excrete in urine กับเวลา (mid time) ของผู้ป่วย โรคไตเรื้อรังเปรียบเทียบกับอาสาสมัครสุขภาพดี หลังรับประทานยา alendronate sodium 70 mg | 36 |
| รูปที่ 4-11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า GFR กับ $AUC_{0-\infty}$ จะเห็นว่าเมื่อค่า GFR เพิ่มสูงขึ้น ค่า $AUC_{0-\infty}$ ของยา alendronate ในพลาสม่าจะลดลง | 36 |

សញ្ញាណកម្មណ៍ការឃើយនៃការបង្កើតរបស់ខ្លួន

μg	=	microgram	LLOQ	=	lower limit of quantification
μl	=	microliter	LOD	=	limit of detection
μm	=	micrometer	M	=	molar
μM	=	micromolar	m^2	=	square meter
ARF	=	acute renal failure	mg	=	milligram
ATP	=	adenosine triphosphate	min	=	minute
AUC	=	area under the concentration curve	ml	=	milliliter
BMD	=	bone mass density	mM	=	millimolar
BPs	=	bisphosphonates	nBPs	=	nitrogen containing bisphosphonates
BUN	=	blood urea nitrogen	ng	=	nanogram
CBC	=	complete blood count	nm	=	nanometer
CKD	=	chronic kidney disease	non-nBPs	=	non-nitrogen containing bisphosphonates
Cl	=	clearance	Pi	=	phosphate
cm	=	centimeter	POP	=	postmenopausal osteoporosis
C_{\max}	=	maximum concentration	PTH	=	parathyroid hormone
CrCl	=	creatinine clearance	QCH	=	quality control high concentration
DEA	=	diethylamine	QCL	=	quality control low concentration
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetate	QCM	=	quality control medium
ESRD	=	end-stage renal disease			
FMOC-Cl	=	9-fluorenylmethyl chloroformate chloride			
			R_{\max}	=	Maximum excretion rate
GFR	=	glomerular filtration rate	rpm	=	round per minute
h	=	hour	SD	=	standard deviation
Hct	=	hematocrit	SPE	=	solid phase extraction
HDL-C	=	high density lipoprotein cholesterol	$t_{1/2}$	=	half-life
HPLC	=	high performance liquid chromatography	TCA	=	trichloroacetic acid
			T_{\max}	=	time to maximum concentration
IU	=	international unit	t_R	=	retention time
IV	=	intravenous	v/v	=	volume by volume
k_e	=	elimination rate constant	V_d	=	volume of distribution
kg	=	kilogram	WHO	=	World Health Organization
LDL-C	=	low density lipoprotein cholesterol			

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

Alendronate (4-amino-1-hydroxybutylidine-1,1-bisphosphonate) จัดเป็น bisphosphonate ที่มีไนโตรเจนในโครงสร้าง (nitrogen-containing bisphosphonate) มีฤทธิ์ต้านการกัดเซาะกระดูก (anti-resorptive agents) โดยขับยึดการทำงานของ osteoclasts ส่งผลขับยึดกระบวนการกัดเซาะกระดูก (bone resorption) นอกจากนี้ ยังมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ osteoblasts ทำให้มีการซ่อมแซมกระดูกบริเวณที่มีการกัดเซาะ ทำให้เกิดการซ่อมแซมกระดูกอย่างมีประสิทธิภาพ^{1,2,3} ข้อบ่งใช้ของ alendronate คือ ใช้ในการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุนในสตรีวัยหมดประจำเดือน ในบุรุษที่มีภาวะ Paget's disease of bone ซึ่งเป็นโรคทางพัฒนาธุကรร์ที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับกระบวนการสร้างและการสลายกระดูก ส่งผลให้เกิดภาวะกระดูกเปราะแตกหักได้ง่าย นอกจากนี้ ยังรวมถึงภาวะ glucocorticoid-induced osteoporosis ในผู้ป่วยที่จำเป็นต้องมีการใช้ยาลุ่ม glucocorticosteroids ต่อเนื่องเพื่อรักษาภาวะโรคต่างๆ ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน จะส่งผลให้เกิดภาวะกระดูกพรุนได้ง่ายเช่นกัน^{4,5}

จากการสำรวจโดย The National Health and Nutritional Examination Survey (NHANES III) พบว่า 13-17% ประชากรในประเทศไทยมีโรคกระดูกพรุน (osteoporosis) และ 70% ของประชากรเพศหญิงที่มีอายุมากกว่า 80 ปี มีโรคกระดูกพรุนในสตรีวัยหมดประจำเดือน (post-menopausal osteoporosis)⁶ การสำรวจในประเทศไทยพบว่าอุบัติการณ์ของโรคกระดูกพรุนพบได้สูงขึ้น ตามอายุขัยเฉลี่ยของประชากรไทยที่เพิ่มขึ้น จึงทำให้แนวโน้มการใช้ยา alendronate เพิ่มสูงขึ้น⁷

อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกล็ดชั้นคงศาสตร์ของยาในคนไทยยังมีค่อนข้างจำกัด ซึ่งอาจเนื่องมาจากข้อจำกัดในการตรวจระดับยาในร่างกาย โดยที่ระดับยา alendronate ในเลือดหลังรับประทานยาในขนาดปกติมีค่าเฉลี่ยกว่า 100 ng/ml⁸⁻⁹ การวิเคราะห์ระดับยาในเลือดจึงต้องที่มีความไวของวิเคราะห์ที่สูง นอกจากนี้ โครงสร้างที่ปราศจากหมู่ chromophore ของ alendronate ทำให้ไม่สามารถใช้วิธี HPLC และตรวจวัดโดย ultraviolet detector ใน การวิเคราะห์ปริมาณได้ แม้ว่าได้มีการพัฒนา Liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS/MS) ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความไวสูง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ alendronate ในพลาสม่าและปัสสาวะ¹⁰ แต่ LC/MS/MS นั้นต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ที่สูงและมีใช้ในบางสถานที่เท่านั้น โอกาสที่จะทำการวิเคราะห์โดย LC/MS/MS มาใช้ในทางปฏิบัติจึงมีน้อย

วิธีวิเคราะห์โดย HPLC ที่ตรวจวัดโดยฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence detection) นับเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความไวสูง ค่าใช้จ่ายไม่สูง และใช้เครื่องมือที่สามารถหาได้เพียงพอ มีการศึกษาต่างๆ ได้รายงานการวัดระดับยา alendronate ในพลาสม่าโดย HPLC ที่ตรวจวัดโดยฟลูออเรสเซนซ์¹¹⁻¹⁴ อย่างไรก็ตาม การที่ alendronate ถูกขับออกทางปัสสาวะในรูปไม่เปลี่ยนแปลงเป็นหลัก¹⁵⁻¹⁶ โดยที่ปริมาณที่ขับออกในปัสสาวะมีเพียงพอที่จะวิเคราะห์โดยวิธี HPLC และตรวจวัดโดยฟลูออเรสเซนซ์ ดังนั้น แม้ว่าระดับยาในพลาสม่าจะมีค่าค่อนข้างน้อย หลังการบริหารยาโดยการรับประทาน ยังสามารถตรวจได้โดยวิธี HPLC ได้เป็นเวลามากกว่า 24 ชั่วโมง จากปริมาณยาในปัสสาวะ¹⁷⁻²⁰

วิธีวิเคราะห์ alendronate ในสารชีวภาพที่มีรายงานแล้ว เป็นการรายงานการวิเคราะห์ปริมาณยาและแสดงการประยุกต์ใช้การวิเคราะห์ปริมาณยา alendronate ในพลาสma และปัสสาวะของอาสาสมัครสุขภาพดี^{11,18} หรือนำมาใช้ในการศึกษาชีวสมมูลของยาซึ่งอาศัยการหาปริมาณยาในเลือดหรือพลาสma เป็นหลัก^{13,14} ซึ่งเป็นการศึกษาจากผู้ที่มีสุขภาพปกติอีกเช่นกัน อย่างไรก็ตาม alendronate สามารถใช้เพื่อรักษาและป้องกันภาวะกระดูกพรุนในผู้ป่วยหลายกลุ่ม อาทิ เช่น สตรีหมดประจำเดือน และบุรุษที่มีภาวะ Paget's disease เป็นต้น ซึ่งในกลุ่มผู้ป่วยเหล่านี้อาจมีสีริวิทยาที่แตกต่างกัน โดยเป็นผลมาจากการปัจจัยต่าง ๆ อาทิเช่น อายุ ภาวะโรคที่เป็นร่วม นอกจากนี้ภาวะกระดูกแตกหักและโรคกระดูกพรุนเป็นปัญหาที่สำคัญในผู้ป่วยไตเรื้อรัง (Chronic kidney disease, CKD)⁷ และผู้ป่วย end stage renal disease (ESRD) ที่ได้รับการบำบัดทดแทนไต (hemodialysis) ปัจจัยเดียวกันที่ส่งผลให้เกิดกระดูกหักได้มากกว่าประชากรปกติ ได้แก่ ภาวะทุพโภชนาการ ภาวะพร่องแคลเซียมและวิตามินดี การใช้ยากลุ่ม corticosteroids ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน รวมถึงภาวะ hypogonadism^{1,7,8,9} มีรายงานถึงการที่ค่า BMD คงที่เป็นเวลา 6 เดือนในผู้ป่วยโรคไต เมื่อใช้ alendronate ในขนาดครึ่งหนึ่งของขนาดรักษาปกติ²¹ ในขณะที่ยังมีหลักฐานไม่เพียงพอที่จะสนับสนุนการใช้ oral bisphosphonate ในผู้ป่วย ESRD²²

การวิเคราะห์ปริมาณ alendronate ในพลาสma จากผู้ป่วยโดยเฉพาะโรคไต จึงนับว่ามีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยา แม้ว่าจะมีผู้รายงานการวิเคราะห์ปริมาณ alendronate ในพลาสma และปัสสาวะโดย HPLC-fluorescence detection แล้วก็ตาม¹¹⁻¹⁹ ยังไม่มีรายงานถึงวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสma หรือปัสสาวะในผู้ป่วยโรคไต พนวยของเดียหรือ uremic toxin ในเลือดอาทิเช่น advanced glycation end products (AGEs), beta-2 microglobulin, leptin อาจมีปริมาณสูงขึ้นในผู้ป่วย CKD²³ ดังนั้น การศึกษานี้จึงต้องการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ alendronate ในพลาสma และปัสสาวะที่น่าเชื่อถือ และสามารถนำไปใช้ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาในผู้ป่วยที่มีการขาดยาบ่อยร่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง ได้

1.2 วัตถุประสงค์ (Objectives)

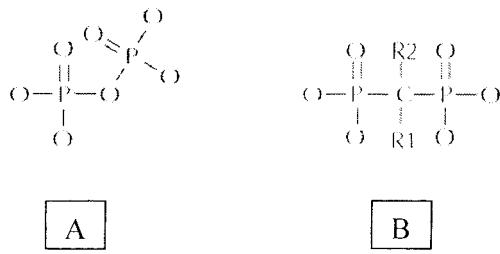
- 1.2.1 เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ alendronate ในพลาสma และปัสสาวะโดยเทคนิค HPLC ที่ตรวจวัดโดยฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความไว มีความถูกต้อง และแม่นยำ
- 1.2.2 เพื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้ไปวิเคราะห์ปริมาณ alendronate ในพลาสma และปัสสาวะจากผู้ป่วยที่กำลังใช้ยา alendronate

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 เภสัชวิทยา (Pharmacology)

ยาในกลุ่ม Bisphosphonates (BPs) มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับหมู่ pyrophosphate ที่มีด้วยกัน hydroxyapatite ในกระดูก (รูปที่ 2-1) การออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม BPs สัมพันธ์กับโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับหมู่ pyrophosphate ก่อให้เกิดการจับกับกระดูกมากขึ้น^{1,24} การที่ยาจับกับ hydroxyapatite crystals และเพิ่มความแข็งแรงของการจับกับกระดูกมากขึ้น^{1,24} การที่ยาจับกับ hydroxyapatite crystals และเพิ่มระยะเวลาในการจัดการกระดูก ทำให้ยาจับกับ osteoclasts ในระหว่างกระบวนการ bone resorption และทำให้กระบวนการการทำงานระดับ tissue ของ osteoclasts เปลี่ยนแปลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการกัด เชาะกระดูกของ osteoclasts อีกทั้งยังให้ผลทางอ้อมในการกระตุ้นการทำงานของ osteoblasts ในการซ่อมแซมกระดูกบริเวณที่มีการกัดเชาะ ส่งผลให้การซ่อมแซมกระดูกสามารถดำเนินต่อไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ^{1,24,25} กระบวนการ bone turnover จึงลดลง และ bone mineral density (BMD) เพิ่มขึ้น พบว่า BPs ลดความเสี่ยงในการเกิด vertebral fracture ได้ประมาณ 41-62%²⁶

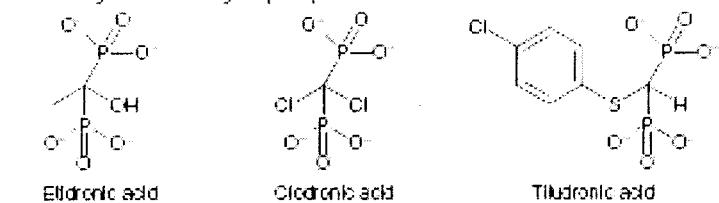


รูปที่ 2-1 โครงสร้างของ pyrophosphate (A) กับ โครงสร้างของยาในกลุ่ม bisphosphonates (B)

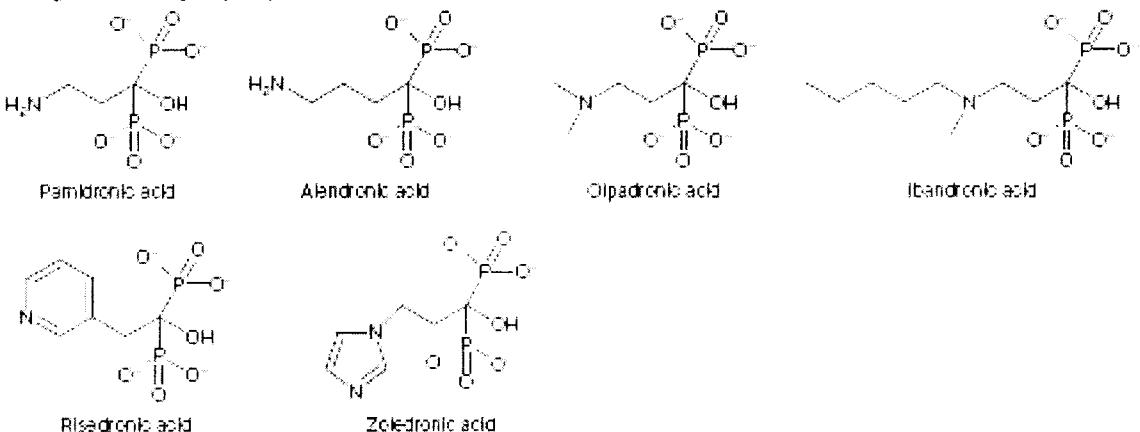
Bisphosphonates จัดเป็นสารต้านการกัด เชาะกระดูก (anti-resorptive agents) โดยที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศไทย (US-FDA) แนะนำให้ใช้ alendronate, risedronate, ibandronate และ zoledronate เป็น first-line therapy ในการรักษาและป้องกัน โรคกระดูกพรุนในสตรีวัยหมดประจำเดือน (post-menopausal women) และในบุรุษ และใช้ alendronate และ risedronate รักษาภาวะ glucocorticoid-induced osteoporosis^{3,8}

Bisphosphonates สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มตามโครงสร้างทางเคมี (รูปที่ 2-2) ได้แก่ กลุ่มนี้ปราศจากไนโตรเจนในโครงสร้าง (non-nitrogen containing bisphosphonates, non-nBPs) เป็น BPs รุ่นแรกที่มีการนำมาใช้ในการรักษาโรคกระดูกพรุน ได้แก่ clodronate, etidronate และ tiludronate และกลุ่มนี้มีไนโตรเจนในโครงสร้าง (nitrogen containing bisphosphonates, nBPs) ได้แก่ pamidronate, risedronate, incadronate, minodronate, olpadronate, ibandronate, alendronate และ zoledronate

Non-nitrogen-containing bisphosphonates



Nitrogen-containing bisphosphonates



รูปที่ 2-2 โครงสร้างของยากระตุ้น BPs ที่แบ่งได้เป็น BPs ที่ปราศจากไนโตรเจนในโครงสร้าง (non-nitrogen containing bisphosphonate, non-nBPs) และ BPs ที่มีไนโตรเจนในโครงสร้าง (nitrogen containing bisphosphonate, nBPs)¹⁹

สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของ alendronate ซึ่งเป็น nBPs นั้น ภายหลังที่ยากระจายตัวไปในเนื้อกระดูก (bone matrix) และใน osteoclasts เดลีว์ alendronate จะยับยั้งเอนไซม์ farnesyl diphosphate synthase (FPP synthase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญใน mevalonate biosynthetic pathway ในกระบวนการสังเคราะห์ cholesterol, sterols และ isoprenoid lipids^{15,24,25,27} และ ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์สาร farnesyl diphosphate (FPP) และ geranylgeranyl diphosphate (GGPP) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการ prenylation ของ signaling protein ที่สำคัญต่อการทำงานของ osteoclasts เช่น Ras, Rab, Rho, และ Rac^{1,24,25} โดยการยับยั้งเอนไซม์ FFP synthase นี้ จะขึ้นกับความเข้มข้นของยาในเดือด (dose dependent) กด่าว่าคือ หากมีความเข้มข้นของยาในเดือดค่อนข้างต่ำ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานของ osteoclasts ทำให้การสลายกระดูกและการสลายคอลลาเจนถูกยับยั้ง และเมื่อความเข้มข้นของยาในเดือดเพิ่มสูงขึ้น จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสร้างและการเจริญเติบโตของ osteoclasts และเมื่อความเข้มข้นของยาเพิ่มสูงมากขึ้นจนถึง 100 μM จะทำกระดูกให้เกิด osteoclast apoptosis ดังนั้น ยากระตุ้น bisphosphonates จึงจัดว่าเป็นยาที่สามารถยับยั้งกระบวนการ bone resorption ในระดับ tissue ได้เป็นอย่างดี¹

ขนาดยา alendronate ในการป้องกันโรคกระดูกพรุน คือ 5 mg ต่อวัน หรือ 35 mg ต่อสัปดาห์ และในการรักษาโรคกระดูกพรุนจะใช้ในขนาด 10 mg ต่อวันหรือ 70 mg ต่อสัปดาห์^{4,6} การให้ยา alendronate เพียงสัปดาห์ละครั้ง จะช่วยให้ผู้ป่วยมีความสะดวกในการใช้ยาและลดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา เช่น oesophagitis, heart

burn, gastric ulcer²⁸ อีบ่ำ ໄຣກ්ຕານ ກາຮໃຊ້ alendronate ໃນກາຮຮັກຢາໂຣຄກະຄູກພຽນນີ້ ຈະໄທ້ຜລດີໃນກາຮຮັກເມື່ອ ໄກ່ຮ່ວມກັບແຄລເຊີຍແລະວິຕາມິນດີ ໂດຍຜູ້ປ່າຍຈຳເປັນຕົ້ງໄດ້ຮັບແຄລເຊີຍເສຣິນໃນປຣິມານໄມ່ຕໍ່ກວ່າ 1,500 mg ຕ່ອວັນ⁶ ແລະກວ່າໄດ້ຮັບວິຕາມິນດີເສຣິນໃນປຣິມານໄມ່ຕໍ່ກວ່າ 800 IU ຕ່ອວັນ⁶

2.2 ແກສ້ຈລນຄາສຕ່ຽງ (Pharmacokinetics)

ຈາກໂຄຮສ້າງຂອງຢາທີ່ແສດງຄວາມມີຂໍ້ວາມກາ ສາມາດຄະລາຍນໍ້າໄດ້ຕີ ລະລາຍໃນໄໝມັນໄດ້ນ້ອຍ ຈຶ່ງຄຸດຫື່ນຳຜ່ານເຂົ້າບຸກາທີ່ເດີນອາຫານໄດ້ນ້ອຍ oral bioavailability ຂອງຢາໃນກຸລຸນນີ້ຄ່ອນຂ້າງຕໍ່ມາກແລະມີຄວາມແປປປຽນຄ່ອນຂ້າງສູງເມື່ອຍາຄູກຄຸດຫື່ນຳເຂົ້າສູ່ກະແສເລື່ອດແລ້ວ ຈະກະຈາຍຕົ້ວໄປສະນູຍັງກະຄູກຈິ່ງເປັນບົຣີເວັນທີ່ອອກຖົ໌ ແລະເກັບສະສົມເປັນເວລານານີ້ກັບ bone turnover rate ຂອງກະຄູກ ສ່ວນທີ່ເຫັນຈະຄູກກຳຈັດອອກທາງໄຟຍ່າງຮວດເຮົວ^{1,8,9,15}

2.2.1 ກາຮຄຸດຫື່ນຳ (absorption)

ເມື່ອໄທ້ໂດຍກາຮຮັບປະກາດ ຮະດັບຢາສູງສຸດໃນກະແສເລື່ອຈະເກີດຈິ່ງຫລັງຮັບປະກາດຢາໄປແລ້ວປຣິມານ 1 ຂ້ວໂມງ^{9,15} oral bioavailability ຂອງ alendronate ມີຄ່າປຣິມານ 0.76%^{9,15} ມີຮາຍງານວ່າກາຮຄຸດຫື່ນຳຜ່ານເໜີລັດເຍື່ອນຳມື່ນ ເພື່ອຍ່າງສູນນູຽຣຸນ (completely ionized) ອຳຍ່າງໄຣກ්ຕານ ກາຮທີ່ໂຄຮສ້າງທີ່ແສດງປະຈຸບນ ທີ່ physiological pH ຈາກທີ່ໃຫ້ເຄີດສຳເນົາກັບ pore channel ເກີດຈິ່ງໄດ້ຍ່າກ ນອກຈາກນີ້ ກາຮຄຸດຫື່ນຳຍ້າງຈາກຄດລົງໄດ້ຈາກກາຮເກີດສາຮປະກອນເຊີງຫື່ນຳກັບ metal ions ຮີ່ອ cation ດັ່ງ ຈຸ ໃນກຸລຸນເຫັນ Ca²⁺, Al³⁺, Mg²⁺ ໂດຍມີຮາຍງານວ່າອາຫານມີຜລໃຫ້ກາຮຄຸດຫື່ນຳຍ້າກຄຸນນີ້ຄດລົງຄື່ງ 4-5 ເທົ່ານີ້ເທື່ອເຖິງກັບກາຮຮັບປະກາດຢາຂະໜະທີ່ອ້າວ່າງ

ແມ່ວ້າໄມ້ມີຮາຍງານກາຮເກີດປົກລົງຢາຮ່ວງຢາຂີ ຈຸ ກຸລຸນນີ້ ແຕ່ທາກຈຳເປັນຕົ້ນທີ່ອ້າວ່າງປະກາດຢາຂີ ຄວບຮັບປະກາດຫລັງຈາກຮັບປະກາດຢາຄຸນ BPs ໄປແລ້ວຍ່າງນ້ອຍ 30 ນາທີ ເພື່ອໄທ້ກະບວນກາຮຄຸດຫື່ນຳເກີດຈິ່ງໄດ້ຍ່າງສູນນູຽຣຸນ^{1,8,9,15} ນອກຈາກນີ້ ກາຮເພີ່ມ pH ໃນກະພາວອາຫານມີຜລດ້ວຍກາຮຄຸດຫື່ນຳຂອງຢາ ໂດຍຫາກຄ່າ pH ໃນກະພາວອາຫານມີຄ່າສູງກວ່າ 6 ຈະທີ່ໃຫ້ກາຮຄຸດຫື່ນຳເພີ່ມຈິ່ງປຣິມານ 2 ເທົ່າ

2.2.2 ກາຮກະຈາຍຕົ້ວຂອງຢາ (distribution)

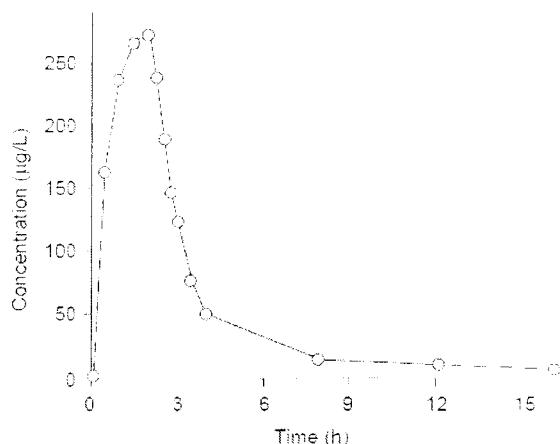
BPs ທີ່ອູ່ໃນເລືອດຈັບກັບ plasma albumin ເປັນຫລັກ ໂດຍ plasma protein binding ຂອງຢາ alendronate ປຣິມານ 70%⁹ ກາຮຈັບກັບ plasma albumin ຈິ່ງກັບ pH ແລະປຣິມານແຄລເຊີຍດ້ວຍ ຄື້ອງ pH ເພີ່ມຈິ່ງຮີ່ອມີປຣິມານ ແຄລເຊີຍເພີ່ມມາກິ່ງ ກາຮຈັບກັບ plasma albumin ກີ່ຈະເພີ່ມຈິ່ງດ້ວຍ^{9,15} ກາຍຫລັງກາຮຄຸດຫື່ນຳຜ່ານເຂົ້າບຸກາທີ່ເດີນອາຫານໄປແລ້ວຢາຈະກະຈາຍຕົ້ວອ່າງຮວດເຮົວໄປຢັງ calcified tissue ໄດ້ເກີດ ກະຄູກ ແລະ non-calcified tissue ໄດ້ເກີດ ໄດ້ເກີດ ຖັນ ມ້ານ ແລະປອດ ໂດຍປຣິມານຢາທີ່ກະຈາຍໄປຢັງ non-calcified tissue ຈະຄດລອຍ່າງຮວດເຮົວຈິ່ງສັນພັນທີ່ກັບກາຮຄດລົງຂອງຮະດັບຢາໃນເລືອດ ໂດຍປຣິມານ 63% ຂອງຢາທີ່ຕ່ວງພບໄດ້ທີ່ non-calcified tissue ໃນຫ່ວງ 5 ນາທີແຮກຂອງກາຮກະຈາຍຕົ້ວ ຈະຄດແລ້ວ 5% ກາຍໃນ 1 ຂ້ວໂມງ ສ່ວນຮະດັບຢາທີ່ກະຄູກຈະຄ່ອຍ ຈຸ ເພີ່ມຈິ່ງຫລັງກາຮຄຸດຫື່ນຳ ແລະຈະເພີ່ມສູງສຸດເມື່ອເວລາຜ່ານໄປ 1 ຂ້ວໂມງ ສັນ- ນິຍຽນວ່າຮະດັບຢາທີ່ຄ່ອຍ ຈຸ ເພີ່ມຈິ່ງບົຣີເວັນກະຄູກນີ້ ມາຈາກກາຮກະຈາຍຕົ້ວຂອງຢາຈາກ non-calcified tissue¹⁵

ຢາຈະໄປຢັງຜົວໜ້າຂອງກະຄູກຈິ່ງເປັນບົຣີເວັນທີ່ອອກຖົ໌ ແລ້ວຈຶ່ງກະຈາຍໄປຢັງນິເການກະຄູກສ່ວນດຶກ (deep bone) ຈິ່ງເປັນບົຣີເວັນທີ່ຢາໄມ່ອອກຖົ໌ (biological inert) ແຕ່ຈະເປັນທີ່ເກັບສະສົມຂອງຢາ ແລະຈະມີກາຮປັດປຸລ່ອຍຢາ

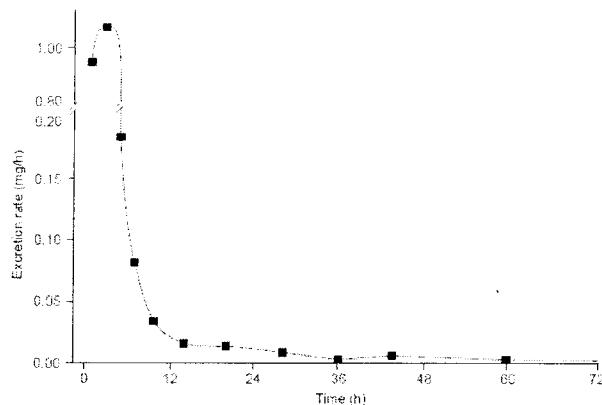
ออกมาขับริเวณที่ออกฤทธิ์ โดยการกัดเคาะของ osteoclasts ในกระบวนการ bone remodeling ส่วนที่ถูกเก็บสะสมใน deep bone จะถูกกำจัดออกเมื่อเวลาผ่านไป 8-18 เดือน หรืออาจใช้เวลามากกว่า 10 ปี^{1,9,15} ค่าครึ่งชีวิตของยา alendronate ที่กระดูกมีค่าประมาณ 10.5 ปี⁹

2.2.3 การขัดยา (elimination)

แม้ว่าหน่วย pyrophosphate มีโครงสร้างเป็น P-O-P ซึ่งมีความไหวต่อการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis แต่ยาในกลุ่ม BPs ซึ่งมีโครงสร้างเป็น P-C-P สามารถทนต่อปฏิกิริยา hydrolysis ได้ดังนั้น ยากลุ่มนี้จึงไม่ถูกแปรสภาพโดย เอ็นไซม์ในตับ ไม่ถูกกำจัดออกทางน้ำดี ยาที่ออกฤทธิ์อยู่ในรูปที่ไม่เปลี่ยนแปลง และถูกขับออกจากร่างกายทางไต เป็นหลัก โดยกระบวนการ glomerular filtration และ proximal tubular secretion โดยประมาณ 40% ของยา alendronate จะถูกขับออกทางไตภายใน 8-12 ชั่วโมงหลังบริหารยา ส่วนที่เหลือจะค่อยๆ ถูกปลดปล่อยออกมานอกกระดูกอย่างช้าๆ และขับออกทางไถ^{9,15} ค่า plasma clearance และ renal clearance ของยา alendronate มี ค่าประมาณ 2.96 ml/min/kg และ 1.05 ml/min/kg ตามลำดับ¹⁵ ค่าครึ่งชีวิตของยาลุ่ม BPs ในพลาสma (plasma half-life) หลังการให้ยาในรูปแบบ IV infusion อยู่ที่ประมาณ 1-2 ชั่วโมง⁹ รูปที่ 2-3 แสดงระดับยาในพลาสma ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ (รูปที่ 2-4) คือแสดงถึงอัตราการขับยาทางปัสสาวะที่สูงภายใต้ 8-12 ชั่วโมงหลังบริหารยา

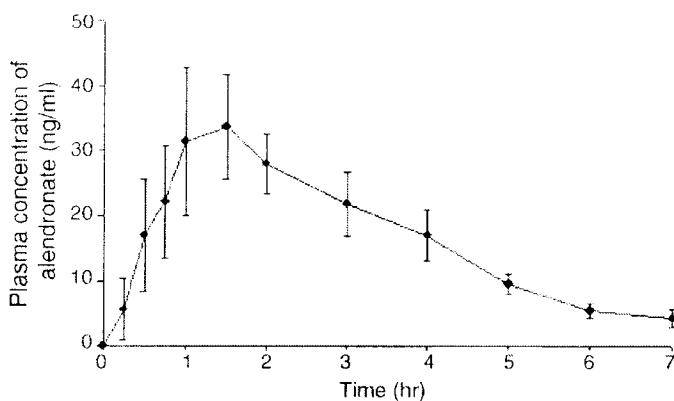


รูปที่ 2-3 กราฟแสดงระดับยา alendronate ในพลาสมากับเวลาที่ได้จากหญิงวัยหมดประจำเดือน ภายหลังจาก บริหารยา alendronate ขนาด 10 mg แบบ IV infusion ($n = 6$)⁹

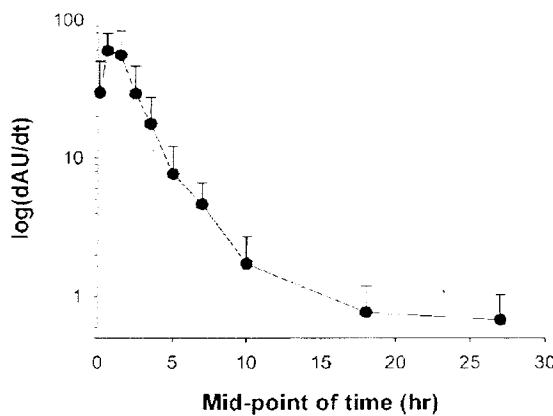


รูปที่ 2-4 ปริมาณยาที่ขับออกในปัสสาวะในหญิงวัยหมดประจำเดือน ภายหลังจากบริหารยา alendronate ขนาด 10 mg แบบ IV infusion เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ($n = 6$)⁹

เมื่อบริหารยาโดยการรับประทาน พนว่า ระดับยาสูงสุดในเลือดจะพบได้ภายใน 1 ชั่วโมง และมีค่าประมาณ 40 ng/ml ¹¹ ในอาสาสมัครสุขภาพดีที่รับประทานยา alendronate 70 mg (รูปที่ 2-5) ระดับยาในเลือดมักจะติดตามได้ภายใน 7-12 ชั่วโมง ระดับยาหลังจาก 12 ชั่วโมงจะมีค่าต่ำมาก ในขณะที่การกำจัดยาทางปัสสาวะนั้นแสดงถึงอัตราการขัดยาทางโถที่มีค่าสูงสุด ภายใน 4 ชั่วโมงหลังรับประทานยา (รูปที่ 2-6) หลังจากนั้น อัตราการขัดยาทางปัสสาวะจะลดลงอย่างรวดเร็ว โดยการขับออกทางปัสสาวะนั้นยังคงติดตามได้ภายใน 24 ชั่วโมง หลังรับประทานยา¹⁸



รูปที่ 2-5 กราฟแสดงระดับยา alendronate ในพลาสมากับเวลาที่ได้จากอาสาสมัครสุขภาพดี หลังจากรับประทานยา alendronate sodium 70 mg ($n = 4$)¹¹



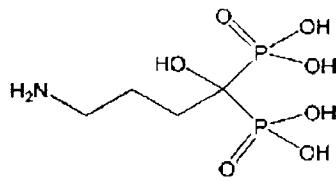
รูปที่ 2-6 อัตราการขจัดออกทางไ泰 (excretion rate) ของยา alendronate กับเวลาในอาสาสมัครสุขภาพดีที่ได้รับยา alendronate sodium tablet (Fosamax[®]) 70 mg ($n = 7$)¹⁸

2.3 การศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยา alendronate ในพลาสมาและปัสสาวะ

เนื่องจากระดับยาในเลือดหลังการให้ยาในรูปแบบรับประทานในขนาดที่ใช้ในการรักษาปกติ จะมีค่า $< 100 \text{ ng/ml}$ ซึ่งต่ำกว่าความไวของวิธีวิเคราะห์ที่มีการใช้อุปกรณ์ไว ดังนั้น การศึกษานี้ จำเป็นต้องพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยา alendronate ในพลาสma และปัสสาวะ เพื่อวัดคุณประสิทธิภาพหลัก 3 ประการ คือ

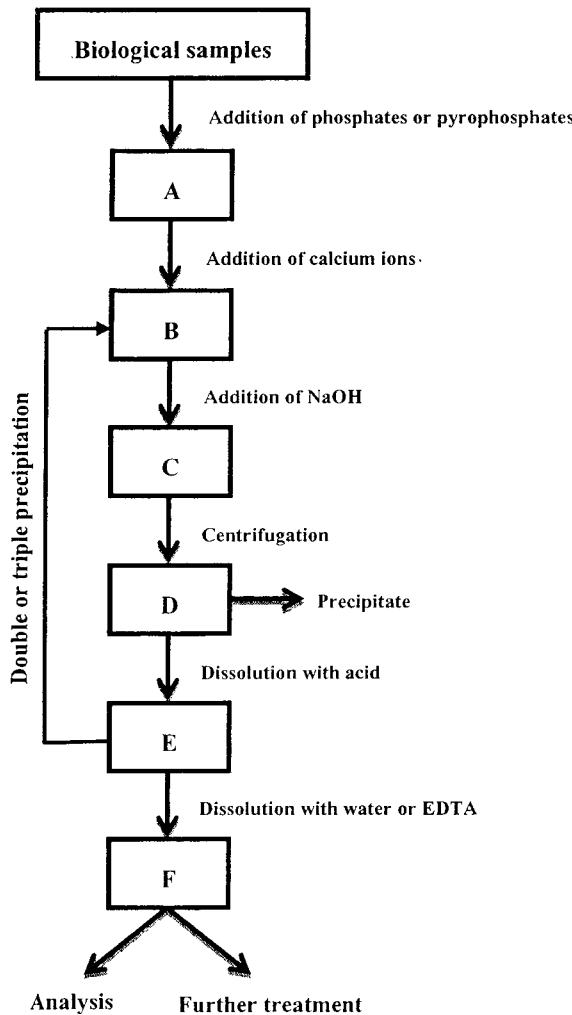
- 1) เพื่อกำจัด endogenous compounds ที่จะรบกวนกระบวนการวิเคราะห์ออกจากตัวอย่าง เช่น โปรตีน ไขมัน หรือเกลือต่าง ๆ เป็นต้น
- 2) เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ทำให้มีความไวในการวิเคราะห์มากขึ้น
- 3) เพื่อปรับเปลี่ยนคุณสมบัติของสารที่ต้องการทำการวิเคราะห์ให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมกับวิธีวิเคราะห์ เช่น ทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารที่ต้องการวิเคราะห์ด้วยกระบวนการการทำอนุพันธ์ (derivatization) หรือ กระบวนการสร้างสารประกอบเชิงซ้อน (complexation) เป็นต้น

ปัจจุบันวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) เป็นวิธีที่นิยมแพร่หลายในการวิเคราะห์ยา หล่ายชนิดทั้งในเกรชภัณฑ์และใน biological matrix alendronate มีโครงสร้างที่ปราศจากหมู่ฟังก์ชันที่สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้ (รูปที่ 2-7) ซึ่งไม่สามารถตรวจวัดโดย UV detection หรือ fluorescence detection โดยตรง วิธีวิเคราะห์ที่ปริมาณยากลุ่ม bisphosphonates โดย HPLC จึงมักต้องทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารให้เป็นอนุพันธ์ (derivative) ที่จะฟลูออเรสเซนซ์ได้ โดยอาจทำการ derivatization ก่อนวิเคราะห์ โดย HPLC (pre-column derivatization)^{11-14, 17-19} หรือ หลังจากสารผ่านการแยกโดย HPLC (post column derivatization)²⁸⁻²⁹ แล้ว นอกจากนี้ ยังสามารถตรวจวัดสารกลุ่ม bisphosphonate โดยวิธีอื่น อาทิ เช่น LC/MS/MS³⁰, electrochemical detector²⁰, refractive index detector³¹, ion chromatography with conductivity detection³²



รูปที่ 2-7 โครงสร้างทางเคมีของ alendronate (4-amino-1-hydroxybutylidene-1,1-bisphosphonate)

นอกจากเทคนิคการวิเคราะห์แยกสารโดย HPLC แล้ว ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง (sample pretreatment) นับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่ง จากคุณสมบัติที่ละลายน้ำได้ ละลายในไขมันน้อย และมีความเป็นกรดสูง อีกทั้งระดับยาในเลือด ก่อนขึ้นตัว ทำให้การสกัดตัวยาจากพลาสma หรือชีรัมด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ หรือ การตกตะกอนพลาสma โปรตีน นักไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ จากคุณสมบัติของสารกลุ่ม bisphosphonate ที่จะจับกับ calcium hydroxylapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ ของเนื้อกระดูกเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน³³⁻³⁴ ดังนั้น alendronate ในตัวอย่าง จะถูกทำให้ตกตะกอนกับแคลเซียม (calcium coprecipitation) ในสภาวะที่เป็นค่าง บางการศึกษาได้ทำการตกตะกอนซ้ำ 2-3 ครั้ง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตกตะกอน³⁵⁻³⁶ ตกตะกอนที่ได้มักจะต้องผ่าน solid phase extraction (SPE) เพื่อกำจัดเกลืออื่นๆ ที่อาจตกตะกอนร่วม^{11,17-18,35-39} สารบรรจุภายนใน solid phase extraction cartridge ที่ได้นำมาใช้ในขั้นตอนเตรียมตัวอย่าง จะเป็น ion exchange resin โดยสารที่ตัวแลกเปลี่ยนประจุลบอย่างอ่อน (weak anion exchange) เช่น diethyl amino (DEA) เป็นที่นิยมใช้มาก การอะซิเดที่ต้องการวิเคราะห์ในขั้นตอน SPE นั้น จะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ เช่น citrate หรือ citrate/phosphate buffer^{9-12,15-17} แล้วจึงเข้าสู่กระบวนการวิเคราะห์แยกสารโดย HPLC ต่อไป สารที่ใช้เป็น derivatizing agent ของสารกลุ่ม bisphosphonate ที่ได้นำมาใช้ในการศึกษาต่างๆ ได้แก่ 2,3-naphthalene dicarboxylaldehyde (NDA)³², fluorescamine³⁵⁻³⁶, 1-naphthylisothiocyanate³⁷⁻³⁹, หรือ 9-fluoronylmethylchloroformate (FMOC)^{11-14, 17-18} โดย FMOC จะถูกนำมาใช้มากกว่าสารอื่น ๆ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพลาสma หรือปัสสาวะก่อนการวิเคราะห์โดย calcium coprecipitation สามารถสรุปอย่างคร่าวๆ ในรูปที่ 2-8



รูปที่ 2-8 ขั้นตอนการเตรียมชิวตัวอย่าง (biological sample) โดยวิธี calcium precipitation ในการวิเคราะห์ ปริมาณสาร bisphophonates³³

การเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ของยา alendronate ตามที่มีรายงานนั้นประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ³³⁻³⁴ ได้แก่

1) การตกตะกอน โปรตีน (protein precipitation)

เป็นขั้นตอนแรกในการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารในชีรันหรือพลาสma เนื่องจาก โปรตีนในพลาสma (ส่วนใหญ่ ได้แก่ อัลบูมิน) จัดเป็น endogenous compounds อย่างหนึ่งที่รบกวนกระบวนการ วิเคราะห์ วิธีที่ทำได้ง่ายและรวดเร็วที่สุด คือ การทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ สารที่จะทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพและ ตกตะกอนโปรตีนได้อย่างสมบูรณ์ ควรที่จะสกัดสารสำคัญที่ต้องการออกมาน้ำได้มากที่สุดด้วย ในการวิเคราะห์ alendronate ในพลาสma trichloroacetic acid (TCA) เป็นสารที่ใช้ตกตะกอนโปรตีนมากที่สุด

2) การตกตะกอนด้วยแคลเซียม (precipitation as calcium salts)

อาศัยหลักการที่ BPs มีโครงสร้างคล้าย pyrophosphate และสามารถเกิดสารประกอบเชิงช้อนกับ Ca^{2+} ใน สภาวะด่าง การตกตะกอนกับแคลเซียมจึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการแยกสาร BPs ที่ต้องการวิเคราะห์ออกจาก

biological matrix ในพลาสม่าหรือปัสสาวะ การตกลงกันด้วยแคลเซียมอาจทำซ้ำ 2-3 ครั้ง เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ แคลเซียมส่วนที่เหลือสามารถกำจัดได้ด้วย EDTA

3) การแยกสารด้วยวิธี solid phase extraction

การแยกสารด้วยวิธี solid phase extraction เป็นวิธีการกำจัดสิ่งปนเปื้อนออกจากตัวอย่าง และยังเป็นการทำให้สารที่ต้องการวิเคราะห์มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น นิยมใช้ diethyl amino group (DEA) ซึ่งเป็น weak ion-exchange resins สำหรับ alendronate จะแสดงประจุลบและจับกับประจุบวกของ ion exchanger การจะดึงจาก ion exchanger ในขั้นสุดท้ายนี้ จะใช้ citrate buffer ซึ่งอาจจะมีความคงตัวที่สุดในบีฟเฟอร์ชนิดนี้

4) การทำอนุพันธ์ (derivatization)

กระบวนการทำอนุพันธ์ เป็นกระบวนการสุดท้ายในขั้นตอนการเตรียมสารก่อนทำการวิเคราะห์ เพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารให้มีความเหมาะสมต่อเครื่องมือวิเคราะห์ เช่น การเติมหมู่ฟิฟ์ชั่นที่ fluorescence ได้เป็นต้น สารก่อนอนุพันธ์ (derivatizing reagent) ต้องทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้รวดเร็วเพื่อกีดเป็นอนุพันธ์ที่ต้องการ อนุพันธ์ที่ได้ควรจะคงตัว สารก่อนอนุพันธ์ที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ alendronate คือ 9-fluorenyl methyloxycarbonyl chloride (FMOC-Cl) เนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยากับ alendronate ได้รวดเร็วและอนุพันธ์ที่ได้มีความคงตัวที่อ่อนห้อมหื่อง⁴¹

การพัฒนาวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณ alendronate ในปัสสาวะด้วยเทคนิค HPLC-fluorescence detection นั้น ได้มีการศึกษาโดยผู้วิจัยหลายกลุ่ม^{17-18,40} การศึกษาเหล่านี้ มักจะเตรียมตัวอย่างโดยการตกลงกันร่วม (co-precipitation) กับ calcium จากนั้นทำการสกัดแยกโดย solid-phase extraction (SPE) ที่ใช้ diethyl amine (DEA) cartridge เพื่อให้ตัวอย่างสะอาดมากขึ้น เมื่อจะวิเคราะห์โดย HPLC system ต้องทำอนุพันธ์ของ alendronate ให้สามารถ fluoresce ได้ โดยทำปฏิกิริยากับ FMOC

สภาวะของ HPLC นั้น จะใช้ C₁₈-column เป็น analytical column และ mobile phase ที่มี pyrophosphate เป็นองค์ประกอบ การจะสารด้วย mobile phase มักเป็นแบบ gradient elution ที่ปรับอัตราส่วนของ buffer และ methanol และ acetonitrile เพื่อให้ analyte ถูกชะออกมานานเวลาที่เหมาะสม และสามารถแยกจาก peak รบกวนอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน การตรวจวัดโดย fluorescence detection จะตั้งความยาวคลื่น 260 nm (excitation) และ 310 nm (emission) และ internal standard ที่มักจะใช้ คือ pamidronate การเตรียมตัวอย่างพลาสมาที่มียา alendronate นั้น จะอาศัยหลักการและวิธีการเดียวกันกับการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะทุกประการ ยกเว้น ก่อนจะแยก alendronate โดยการตกลงกันร่วมกับ calcium จะมีการกำจัดโปรตีนในพลาสม่าออกก่อนโดยการตกลงกันโปรตีนด้วยกรด

วิเคราะห์ปริมาณยาในปัสสาวะที่มีรายงานเหล่านี้ ได้มีการทดสอบความน่าเชื่อถือ (validation) รวมทั้งนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษา bioavailability หรือ bioequivalence หลักการศึกษา ซึ่งข้อมูลต่างๆ นั้นได้รวมรวมไว้ในตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 วิธีวิเคราะห์ปริมาณยา alendronate ในชีวมวลโดย HPLC-fluorescence detection

Biological fluid	Derivatizing agents	Mobile phase	excitation, emission wavelength	LOD (ng/ml)	Dose/ Route of administration	Reference
Plasma	FMOC	Acetonitrile/methanol-pyrophosphate buffer 32:68 v/v (gradient elusion)	260, 310	1.0	70 mg/ oral	11
		Acetonitrile/methanol-pyrophosphate buffer 32:68 v/v (gradient elusion)	260, 310	2.0	70 mg/ oral	13
	FMOC	Acetonitrile-methanol-pyrophosphate buffer mixture 20:15:65 v/v (gradient elusion)	260, 310	3.51	90 mg/ oral	17
Urine	FMOC	Acetonitrile/methanol-pyrophosphate buffer 28:72 v/v (gradient elusion)	260, 310	25	70 mg/ oral	18
		Dibasic phosphate buffer, sodium citrate buffer, and acetonitrile	440, 520	4.96	40 mg/ oral	40

ข้อมูลระดับยาในปัสสาวะจากการวิเคราะห์ปริมาณ alendronate ในปัสสาวะในอาสาสมัครสุขภาพดี โดยวิธี HPLC-fluorescence โดย Kang และคณะ¹⁸ และ Lainesse และคณะ⁴⁰ นั้น พบว่า พารามิเตอร์ต่างๆมีค่าใกล้เคียงกัน เช่น cumulative amount of alendronate excreted (Ae_{0-t}) และ maximum excretion rate (R_{max}) ตารางที่ 2-2 ได้สรุปพารามิเตอร์ทางเภสัชokinศาสตร์ที่ได้จากการดับบยาในปัสสาวะจากการศึกษาทั้ง 2 การศึกษา

ตารางที่ 2-2 ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชokinศาสตร์ (mean \pm SD) ของยา alendronate แบบรับประทานที่ได้จากการศึกษา 2 การศึกษา

Parameter (unit)	Kang และคณะ ¹⁸	Lainesse และคณะ ⁴⁰
Dose (mg)	70	40
Ae_{0-t} (μ g)	198.4 ± 81.2^a	96.23 ± 60.8^b
R_{max} (μ g/h)	65.67 ± 20.8	35.36 ± 22.9
T_{max} (h)	0.93 ± 0.59	0.58 ± 0.86

a : Amount excreted over 30 h

b : Amount excreted over 36 h (Reference formulation)

สำหรับวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ alendronate ในพลาสม่าด้วยเทคนิค HPLC-fluorescence detection นั้น มีการศึกษาที่รายงานไว้ ได้แก่ Yun และ Kwon¹¹ และ Rhim และคณะ¹⁴ โดยมีขั้นตอนการเตรียมที่คล้ายคลึงกัน ขั้นตอนแรกเป็นการตอกตะกอนโปรตีนในพลาสม่าด้วย TCA 6% แล้วจึงนำมาตอกตะกอนกับแคลเซียม (calcium co-precipitation) จากนั้นผ่านกระบวนการแยกสารด้วย DEA solid-phase extraction (SPE) cartridge มี pamidronate เป็น internal standard และใช้ FMOC เป็น derivatizing ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ alendronate ที่ได้จากการศึกษาทั้ง 2 การศึกษา ได้ถูกรวบรวมไว้ในตารางที่ 2-3 ซึ่งได้จากการเก็บตัวอย่างพลาสมาเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ภายหลังจากอาสาสมัครสุขภาพดีรับประทานยาขนาด 70 mg

ตารางที่ 2-3 ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ (mean \pm SD) ของยา alendronate ในรูปแบบรับประทานที่ได้จากการศึกษา 2 การศึกษา

Parameter (unit)	Yun and Kwon ¹¹	Yun, et al ¹³
Dose (mg)	70	70
Number of participants	4	24
AUC _{0-7h} (ng/ml/h)	118.6 \pm 27.6	102.44 \pm 70
AUC _{inf} (ng/ml/h)	129.4 \pm 25.7	110.24 \pm 72.40
C _{max} (ng/ml)	40.94 \pm 19.6	38.47 \pm 24.39
T _{max} (h)	1.00 \pm 0.41	0.99 \pm 0.51
t _{1/2} (h)	1.67 \pm 0.50	1.87 \pm 0.62

นอกจากนี้ Rhim และคณะ¹⁴ ได้ประยุกต์วิธีวิเคราะห์เพื่อศึกษาชีวสมมูลของยา alendronate sodium ขนาด 70 mg จากระดับยาในพลาสม่า ทำการเก็บตัวอย่างพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ เป็นเวลา 7 ชั่วโมงหลังรับประทานยา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ alendronate sodium ทั้ง 2 ชนิด

ดังที่กล่าวข้างต้น alendronate ไม่ถูกแปรสภาพโดยเอนไซม์ในตับและไม่ถูกกำจัดออกทางน้ำดี และถูกกำจัดออกในรูปไม่เปลี่ยนแปลงทางトイเป็นหลัก จึงไม่จำเป็นต้องปรับขนาดยาในผู้ที่มีการทำงานของตับบกพร่อง ยังไม่มีการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยา alendronate ในผู้ที่มีการทำงานของไตบกพร่อง หากความผิดปกติเกิดที่ glomerular filtration ของไต อาจทำให้ยาสะสมอยู่ในกระดูกได้นานขึ้น อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจนเกี่ยวกับการใช้ยาและปรับขนาดยาในผู้ป่วยโรคไต รวมถึงผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตบกพร่องรุนแรง (glomerular filtration < 30 ml/min/1.73 m²) การติดตามระดับยาในพลาสม่าและปัสสาวะของผู้ป่วย จะมีประโยชน์ต่อการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยา alendronate ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์โดย HPLC และตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนซ์

สภาวะที่ใช้สำหรับ HPLC จะอาศัยหลักการและดั้งเดิมจากการศึกษาต่างๆ ที่วิเคราะห์ปริมาณยา alendronate โดย HPLC และตรวจวัดด้วยฟลูออเรสเซนซ์ และใช้ FMOC เป็น derivatizing agent ที่มีรายงานก่อนหน้านี้^{11,17-18} วิธีดังกล่าวใช้ C-18 analytical column และใช้ mobile phase ประกอบด้วย citrate buffer และ pyrophosphate ผสมกับ methanol/acetonitrile โดยที่ citrate ion และ pyrophosphate ใน mobile phase นั้นจะช่วยลดการดูดซึบของ alendronate บน stationary phase และใช้ gradient elution เพื่อเร่งให้ derivatized product อื่นๆ หรือ underderivatized product ที่ค้างอยู่ถูกชะออกมานากยใน 25 นาที¹¹

ในการศึกษานี้ได้ใช้สาร FMOC ใน การ derivatization ดังที่ได้มีใช้ในหลาย ๆ การศึกษา^{11,13-14,17-18} เนื่องจาก FMOC สามารถเกิดปฏิกิริยากับ amine ได้รวดเร็วภายในตัวสารที่สภาวะปกติ อนุพันธ์ FMOC ที่เกิดขึ้นมีความคงตัวกระบวนการ derivatization ที่ใช้ FMOC ในงานวิจัยนี้จะกระทำภายในตัวสารที่ได้รับไว้ในการศึกษาของ Yun และคณะ¹¹ ได้แก่ pH ของสารละลายที่จะทำการปฏิกิริยา (reaction mixture) = 11.5 ปริมาตรของ acetonitrile ใน reaction mixture ที่เพียงพอที่อนุพันธ์ของยา กับ FMOC ที่เกิดสามารถละลายได้สมบูรณ์ (อนุพันธ์ของ FMOC มีละลายน้ำได้น้อย) เพื่อป้องกันการแยกชั้นของอนุพันธ์ของยา กับ FMOC รวมทั้งการปรับ pH ของสารละลายภายหลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วให้เป็นกลางด้วย citric acid ก่อนฉีดวิเคราะห์ด้วย HPLC การตรวจวัดโดยฟลูออเรสเซนซ์นั้น จะใช้ความยาวคลื่น excitation และ emission ที่ 260 และ 310 nm ตามลำดับ

ในการศึกษานี้จะได้มีการปรับอัตราส่วนของบัฟเฟอร์ และ organic solvents รวมทั้งเวลา gradient elution เพื่อให้เวลาเหมาะสมในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่าง โดยสภาวะที่ใช้ในการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นของยา alendronate ในเลือด โดยใช้เทคนิค HPLC-fluorescence เป็นดังนี้

Column : VertiSep™ GES C-18 ความยาว 15 cm เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.46 cm ขนาดอนุภาค 5 μm

Mobile phase: ประกอบด้วย สารละลายน้ำฟเฟอร์ (A) และ ตัวทำละลาย Methanol และ Acetonitrile (B)
การจะสารแบบ gradient ดังนี้

Time (min)	% A: B
0-17	68 : 32
17-24	40 : 60
24-40	68 : 32

A : บัฟเฟอร์ของ 25 mM citric acid และ 25 mM sodium pyrophosphate ปรับ pH = 4.3

B : ตัวทำละลาย Methanol และ Acetonitrile ในอัตราส่วน 1:1(v/v)

Flow rate 1.5 ml/min

Column Temperature 35 °C

Detection Fluorescence detection ความยาวคลื่น 260 nm (excitation) และ 310 nm (emission)

เมื่อใช้สภาวะวิเคราะห์ข้างต้น พบว่าจะปรากฏสัญญาณพีคของ alendronate และ pamidronate ที่ประมาณ 11.4 นาที และ 9.4 นาที ตามลำดับ และใช้วิเคราะห์ต่อตัวอย่าง (run time) ประมาณ 40 นาที

3.2 การเตรียมสารละลายน้ำตรฐาน

3.2.1 เตรียมสารละลายน้ำตรฐาน alendronate ให้มีความเข้มข้น 1 และ 10 µg/ml โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

3.2.2 เตรียมสารละลายน้ำตรฐาน pamidronate ซึ่งใช้เป็น internal standard ให้มีความเข้มข้น 24 µg/ml โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

3.3 การเตรียมตัวอย่างพลาสmaและปัสสาวะ

วิธีวิเคราะห์ในการศึกษานี้ได้ตัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ยา alendronate ในพลาสmaของ Yun และ Kwon¹¹ การเตรียมตัวอย่างพลาสmaและปัสสาวะนั้น จะอาศัยหลักการ coprecipitation กับแคลเซียม เช่นเดียวกับวิธีที่ได้รายงานแล้ว^{11,17-18} แต่มีการปรับเปลี่ยนแปลงในด้านประดิ่นต่าง ๆ ได้แก่ ความเข้มข้นและปริมาณสารที่เติม ในแต่ละขั้นตอน ในขั้นตอนแรก จะเป็นการกำจัดโปรตีนในพลาสมารอตอกตะกอนโดยการตกรอกน้ำ โปรตีนด้วย trichloroacetic acid และล้างน้ำสารละลายใส่ที่ปราศจากโปรตีนมาเติมแคลเซียมและ NaOH เพื่อให้เกิดการ coprecipitation ของ alendronate ส่วนตัวอย่างปัสสาวะสามารถน้ำมานำมา coprecipitation ได้โดยตรง นำตากอนที่ได้ละลายในกรด เช่น กรดอะซิติก (acetic acid) และสกัดโดยใช้ DEA-SPE cartridge นำสารละลายที่ถูกชะออกจาก cartridge มาทำปฏิกิริยากับ FMOC และล้างเข้าสู่ขั้นตอนการวิเคราะห์โดย HPLC

3.3.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพลาสma

- ปีเปตตัวอย่างพลาสma ปริมาตร 3 ml ใส่ลงใน polypropylene centrifuge tube ขนาดความจุ 15 ml
- เติมสารละลาย pamidronate ปริมาตร 25 µl เพื่อใช้เป็น internal standard และ夷าให้เข้ากัน
- ตกรอกตะกอน โปรตีน ด้วยสารละลาย 6% trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 3 ml เ夷าให้เข้ากันเป็นเวลา 45 วินาที
- หมุน夷่วงที่ความเร็ว 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 10 นาที
- แยกส่วนสารละลายใส่ออกจากตะกอน โปรตีน แล้วทำการตกรอกตะกอนด้วยแคลเซียม ด้วยการเติมสารละลาย 0.1 M KH₂PO₄ ปริมาตร 200 µl และสารละลาย 0.1 M CaCl₂ ปริมาตร 200 µl เ夷าให้เข้ากัน เป็นเวลา 10 วินาที
- เติมสารละลาย 4 M NaOH ปริมาตร 400 µl เพื่อปรับสภาพให้เป็นด่าง และวนนำไปหมุน夷่วงที่ความเร็ว 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 10 นาที
- แยกส่วนสารละลายใส่ทิ้ง และนำตากอนมาเติมในสารละลาย 0.2 M acetic acid ปริมาตร 500 µl夷า จนตะกอนกระชาดตัวจนหมด

- เติมน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 3 ml เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที
- ตอกตะกอนด้วยแคลเซียมครั้งที่ 2 ด้วยการเติมสารละลายน 4 M NaOH ปริมาตร 400 μl แล้วนำไปหมุนเร่งที่ความเร็ว 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 10 นาที
- แยกส่วนสารละลายใส่ทึบ แล้วนำตะกอนที่ได้ละลายในสารละลายน 0.2 M acetate buffer pH 6 ปริมาตร 1 ml และสารละลายน 0.2 M acetic acid ปริมาตร 40 μl เขย่าจนตะกอนกระจายตัวจนหมด
- เติมน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 2 ml เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที
- เติมสารละลายน 0.2 M EDTA ปริมาตร 250 μl เพื่อกำจัดตะกอนแคลเซียมและฟอสเฟตส่วนเกิน เขย่าเป็นเวลา 45 วินาที จนได้สารละลายนใส
- นำสารละลายนใส่ที่ได้กำจัดสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ มาเข้าสู่กระบวนการ solid phase extraction (SPE) โดยใช้ cartridge ชนิด diethylamine (DEA) ทำการ prewash ด้วยน้ำปริมาตร 1 ml และฉาวยาออกด้วยสารละลายน 0.2M sodium citrate ปริมาตร 1 ml

3.3.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ

- นำไปตัวอย่างปัสสาวะ ปริมาตร 1 ml ใส่ลงใน polypropylene centrifuge tube ขนาดความจุ 15 ml เจือจางด้วยน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 4 ml แล้วเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 10 วินาที
- เติมสารละลายน pamidronate ปริมาตร 25 μl เพื่อใช้เป็น internal standard แล้วเขย่าให้เข้ากัน
- ตอกตะกอนด้วยแคลเซียมครั้งที่ 1 ด้วยการเติมสารละลายน 0.1 M KH₂PO₄ ปริมาตร 200 μl และสารละลายน 0.1 M CaCl₂ ปริมาตร 200 μl เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 10 วินาที
- เติมสารละลายน 4 M NaOH ปริมาตร 400 μl เพื่อปรับสภาพให้เป็นด่าง แล้วนำไปหมุนเร่งที่ความเร็ว 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 10 นาที
- แยกส่วนสารละลายนใส่ทึบ แล้วนำตะกอนมาเติมในสารละลายน 0.2 M acetic acid ปริมาตร 500 μl เขย่าจนตะกอนกระจายตัวจนหมด
- เติมน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 3 ml เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที
- ตอกตะกอนด้วยแคลเซียมครั้งที่ 2 ด้วยการเติมสารละลายน 4 M NaOH ปริมาตร 400 μl แล้วนำไปหมุนเร่งที่ความเร็ว 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 10 นาที
- แยกส่วนสารละลายนใส่ทึบ แล้วนำตะกอนที่ได้ละลายในสารละลายน 0.2 M acetate buffer pH 6 ปริมาตร 1 ml และสารละลายน 0.2 M acetic acid ปริมาตร 40 μl เขย่าจนตะกอนกระจายตัวจนหมด
- เติมน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 2 ml เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที
- เติมสารละลายน 0.2 M EDTA ปริมาตร 250 μl เพื่อกำจัดตะกอนแคลเซียมและฟอสเฟตส่วนเกิน เขย่าเป็นเวลา 45 วินาที จนได้สารละลายนใส
- นำสารละลายนใส่ที่ได้กำจัดสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ ด้วยกระบวนการ solid phase extraction (SPE) โดยใช้ cartridge ชนิด diethylamine (DEA) ทำการ prewash ด้วยน้ำปริมาตร 1 ml และฉาวยาออกด้วยสารละลายน 0.2 M sodium citrate ปริมาตร 1 ml

3.3.3 ขั้นตอนการทำอนุพันธ์ (derivatization)

ยา alendronate ในตัวอย่างพลาสม่าและปัสสาวะ ที่อยู่ในสารละลายที่ชงออกจาก SPE cartridge จะถูกเปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์ที่สามารถตรวจด้วย fluorescence detector ได้ โดยใช้สาร 9-fluorenylmethyl chloroformate chloride (FMOC-Cl) เป็น derivatizing agent โดยมีกระบวนการดังนี้

- ปั๊ปสารละลายที่ได้ชงออกจาก SPE cartridge ปริมาตร 0.54 ml ลงใน reaction vial
- เติมสารละลาย 1 M sodium carbonate buffer pH 11.9 ปริมาตร 200 μ l
- เติมสารละลาย FMOC-Cl ความเข้มข้น 0.25 mg/ml ใน acetonitrile ปริมาตร 200 μ l ปั๊บสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่อง
- เติมสารละลาย glycine ความเข้มข้น 360 μ mol/ml ในน้ำ ปริมาตร 20 μ l เพื่อหยุดปฏิกิริยา เขย่าเป็นเวลา 20 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
- เติมสารละลาย 1 M citric acid ปริมาตร 200 μ l เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที เพื่อปรับสภาพให้เป็นกลาง
- ฉีดสารละลายที่ได้เข้าระบบ HPLC-fluorescence ด้วยปริมาตร 100 μ l โดยไม่ต้องกรองสารละลายก่อนฉีด

3.4 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

วัสดุทางการแพทย์ที่ใช้ในการศึกษา

- 1) ยา alendronate (Fosamax Plus[®]) ขนาด 70 มิลลิกรัม ผลิตโดยบริษัท MERCK SHARP & DOME de Mexico; Mexico จัดจำหน่ายโดยบริษัท MSD (THAILAND) LTD. Thailand
- 2) หลอดเก็บเลือด ชนิด VACUETTE[®] เคลือบด้วย Lithium Heparin ขนาด 6 มิลลิลิตร ผลิตโดยบริษัท Greiner Bio-One GmbH; Austria
- 3) เข็มเจาะเดียว ชนิด VACUETTE[®] Multiple drawing blood collection needles for single use ขนาด 21 G x 1 $\frac{1}{2}$ นิ้ว ผลิตโดยบริษัท Greiner Bio-One GmbH; Austria
- 4) เข็มเจาะเดียว ชนิด NIPRO[®] Hypodermic Needle ขนาด 21 G x 1 นิ้ว ผลิตโดยบริษัท NIPRO CORPORATION; Japan
- 5) Disposable Syringe ขนาด 3, 5 และ 10 มิลลิลิตร ผลิตโดยบริษัท NIPRO CORPORATION; Thailand
- 6) SURFLO[®] IV Catheter ขนาด 20 G x 1 $\frac{1}{4}$ นิ้ว ผลิตโดยบริษัท TERUMO CORPORATION; Japan
- 7) SURFLO[®] Injection Plug ผลิตโดยบริษัท TERUMO CORPORATION; Japan
- 8) Heparin Injection ความเข้มข้น 100 iu/mL ผลิตโดยฝ่ายเภสัชกรรม โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
- 9) สเต็ป
- 10) Sterile Gauze ขนาด 2 x 2 นิ้ว
- 11) แอลกอฮอล์ล้างแพลงค์

วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณยาในพลาสม่าและปัสสาวะ

สารเคมี มีดังนี้

- 1) สารมาตรฐาน alendronate sodium
- 2) ตัวทำละลายและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ Methanol, acetonitrile, citric acid, sodium pyrophosphate, trichloroacetic acid, calcium chloride, potassium hydrogen phosphate, sodium hydroxide, acetic acid, sodium acetate, ethylenediaminetetraacetate (EDTA), sodium citrate, sodium carbonate, FMOC, glycine

อุปกรณ์เคมี มีดังนี้

- 1) หลอดทดลอง เครื่องแก้ว beaker, volumetric flask, pH paper
- 2) Diethylamine (DEA) solidphase extraction (SPE) cartridge

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

- 1) เครื่อง HPLC Shimadzu CTO-10AS VP ประกอบด้วย SIL-10 ADVP autosampler, LC-20 AD Pump, SCL-10 AVP controller และ RF-10AXL Fluorescence detector บริษัท Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
- 2) HPLC Column ชนิด VertiSep™ GES C-18 ความยาว 15 cm เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.46 cm ขนาดอนุภาค 5 μm บริษัท Vertical Chomatography Co, Ltd., Bangkok, Thailand
- 3) เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Hermle Z323K บริษัท Hermle Labortech, Germany
- 4) โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Win Nonlin Version 1.1
- 5) โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Microsoft Excel

สถานที่ทำการศึกษา

ทำการศึกษาโดยการเก็บตัวอย่างพลาสม่าและปัสสาวะของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย และทำการวิเคราะห์ผลตัวอย่าง สถานที่ทำการศึกษา คือ

- 1) ศูนย์วิจัยการแพทย์ทางคลินิก โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า กรุงเทพมหานคร
- 2) ศูนย์บริการปฏิบัติการทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

3.5 การตรวจสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

ทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นแล้วตาม ICH Guideline⁴¹

3.5.1 Linearity

สกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างยาในพลาสม่าและปัสสาวะ โดยวิธีที่พัฒนาขึ้น ที่ความเข้มข้นต่างๆ ครอบคลุมความเข้มข้น alendronate ในพลาสม่า (0, 5, 10, 20, 50, 100 ng/mL) ดังแสดงในตารางที่ 3-1 และในปัสสาวะ (0, 5, 10, 20, 50, 100, 200 ng/mL) ดังแสดงในตารางที่ 3-2 หากความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างอัตราส่วนของ peak area

alendronate กับ pamidronate ซึ่งใช้เป็น internal standard กับความเข้มข้นของ alendronate ต่างๆ โดยคำนวณค่า coefficient of determination (r^2) ซึ่งความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรง ควรมีค่า r^2 มากกว่า 0.99⁴¹

ตารางที่ 3-1 ความเข้มข้นและปริมาตรสารละลายน้ำแข็ง alendronate ที่ใช้ในการศึกษา linearity ในพลาสม่า

ความเข้มข้นของยาใน พลาสม่า (ng/mL)	ปริมาตรพลาสม่า (mL)	ปริมาตรที่เติม (μ L)	ความเข้มข้นสารละลายน้ำแข็ง (μ g/ml)
5	3	15	1
10	3	30	1
20	3	60	1
50	3	15	10
100	3	30	10

ตารางที่ 3-2 ความเข้มข้นและปริมาตรสารละลายน้ำแข็ง alendronate ที่ใช้ในการศึกษา linearity ในปัสสาวะ

ความเข้มข้นของยาใน ปัสสาวะ (ng/mL)	ปริมาตรปัสสาวะ (mL)	ปริมาตรที่เติม (μ L)	ความเข้มข้นสารละลายน้ำแข็ง (μ g/ml)
5	5	25	1
10	5	50	1
20	5	100	1
50	5	25	10
100	5	50	10
200	5	100	10

3.5.2 Specificity>Selectivity

วิเคราะห์ blank plasma อย่างน้อย 6 ตัวอย่าง ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้ต้องตรวจไม่พบ interference ต่อยาที่ใช้ในการศึกษา ในการศึกษานี้จะมีการทดสอบกับ blank plasma ที่ได้จากผู้ที่มีสุขภาพปกติในช่วงแรกเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ และทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

3.5.3 Lower limit of detection (LOD) and Lower limit of quantification (LLOQ)

สกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างยาในพลาสม่าและปัสสาวะ โดยวิธีที่พัฒนาขึ้น เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) จำนวนอย่างน้อย 10 ตัวอย่าง ค่าระดับความเข้มข้นที่ได้ จะต้องมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation; %CV) (precision) ไม่ควรเกิน 15% จากนั้น คำนวณหาค่า predicted LLOQ จาก

ค่า LOD ที่ได้แล้วสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างยาในพลาสมาและปัสสาวะที่ระดับความเข้มข้นที่คำนวณได้ อย่างน้อย 10 ตัวอย่าง เมื่อคำนวณค่าร้อยละของความถูกต้อง (% accuracy) และค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation; %CV) โดยค่า % accuracy ควรอยู่ระหว่าง 80-120 และ %CV ไม่ควรเกิน 20%⁴¹

3.5.4 Accuracy

สกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างยาในพลาสมาและปัสสาวะโดยวิธีที่พัฒนาขึ้น ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ โดยความเข้มข้นในพลาสมา คือ 15, 40 และ 80 ng/mL ส่วนความเข้มข้นในปัสสาวะ คือ 5, 15 และ 40 ng/mL ซึ่งอยู่ในช่วงความเข้มข้นของ standard calibration curve ความเข้มข้นละอองน้อย 5 ตัวอย่าง คำนวณค่า %accuracy โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของยาที่วัดได้กับความเข้มข้นของยาที่เดินลงไป คุณด้วย 100 ค่า %accuracy ที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 85-115% ยกเว้นที่ LLOQ อยู่ระหว่าง 80-120%⁴¹

3.5.5 Precision (Within-run and between run)

สกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างยาในพลาสมาและปัสสาวะโดยวิธีที่พัฒนาขึ้น ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ โดยความเข้มข้นในพลาสมา 15, 40 และ 80 ng/mL ส่วนความเข้มข้นในปัสสาวะ 5, 15 และ 40 ng/mL ซึ่งอยู่ในช่วงความเข้มข้นของ standard calibration curve ความเข้มข้นละอองน้อย 3 ตัวอย่าง ภายในการดำเนินการวิเคราะห์เดียวกัน (within-run precision) และระหว่างรอบการดำเนินการวิเคราะห์ (between-run precision) คำนวณค่า %CV โดยไม่ควรมีค่าเกิน 15% ยกเว้นที่ LLOQ ไม่ควรเกิน 20%⁴¹

3.5.6 Recovery

สกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างยาในพลาสมาและปัสสาวะโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นในช่วงความเข้มข้น calibration curve ความเข้มข้นละอองน้อย 5 ตัวอย่าง และวิเคราะห์ตัวอย่างยาใน pure authentic standard โดยผ่านกระบวนการสกัดที่เหมือนกับการสกัดตัวอย่างยาในพลาสมาและปัสสาวะที่ระดับความเข้มข้นและจำนวนตัวอย่าง เช่นเดียวกับตัวอย่างยาในพลาสมาและปัสสาวะ คำนวณ % recovery ของการสกัดยา และ internal standard โดยเปรียบเทียบ response ของยาและ internal standard ในพลาสมาและปัสสาวะ กับ response ของยาและ internal standard ใน pure authentic standard คุณด้วย 100 ค่า %recovery ที่คำนวณได้ไม่จำเป็นต้องเท่ากับ 100 แต่ควรมีความคงที่ แม่นยำ เมื่อทำซ้ำ (precision) เมื่อคำนวณค่า %CV โดยไม่ควรมีค่าเกิน 15%

3.5.7 Stability (Long-term stability)

ทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างยาในพลาสมาโดยวิธีที่พัฒนาขึ้น ที่ระดับความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 50 ng/mL และ 150 ng/mL ซึ่งอยู่ในช่วงความเข้มข้นของ standard calibration curve ความเข้มข้นละอองน้อย 3 ตัวอย่าง หลังจากเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา (20°C) เป็นระยะเวลาหนึ่งจากวันที่เริ่มเก็บตัวอย่าง จนถึงเวลาที่ทำการวิเคราะห์วันสุดท้าย คำนวณหาค่าเบี่ยงเบน จากการเตรียมตัวอย่างวันแรก จนถึงวันสุดท้ายที่ทำการวิเคราะห์ ค่าที่ได้ควรจะอยู่ในช่วง $\pm 15\%$ ⁴¹

3.6 การประยุกต์วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

นำวิธีวิเคราะห์ที่ได้ไปใช้เพื่อสักด็ตัวอย่าง derivatization รวมทั้งหาปริมาณ alendronate ในตัวอย่างของผู้ป่วยที่กำลังใช้ยา alendronate โดยที่ตัวอย่างจะเก็บจากผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังหรือโรคอื่น ๆ ที่ใช้ยา alendronate เพศชายหรือหญิงอายุมากกว่า 20 ปี ประมาณ 7 คน

3.7 ตัวอย่างจากอาสาสมัคร

เป็นตัวอย่างเลือดที่ได้จากผู้ป่วยโรคกระดูกพรุน หรือ ผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง ที่ระดับการทำงานของไต (GFR) ต่ำกว่า $60 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$ แต่ยังไม่ได้รับการรักษาด้วยการบำบัดทดแทนไต และมีการทำงานของไตคงที่ เป็นเวลาอย่างน้อย 3 เดือน โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติตาม Good Clinical Practice (GCP) ได้แก่ การขอความยินยอมจากผู้ป่วย โดยที่ผู้วิจัยจะให้รายละเอียดเกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัย ประโยชน์ ความเสี่ยง ข้อตกลงค่าตอบแทน และการปฏิบัติตัวก่อนการศึกษาและระหว่างการศึกษา ให้ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยตัดสินใจเข้าใจรวมทั้งการแสดงความสมัครใจในการเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยลงนามในหนังสือแสดงเจตนาขั้นย่อนเข้าร่วมการวิจัย (Inform Consent)

3.7.1 การเก็บตัวอย่างเลือดและตัวอย่างปัสสาวะ

การเก็บตัวอย่างเลือด

- ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยจะได้รับการเก็บตัวอย่างเลือดผ่านทางหลอดพลาสติกที่ไวนิลอลดเลือดคำ และ/หรือ การเจาะเลือดผ่านเข็มโดยตรง เป็นจำนวน 11 ครั้ง ครั้งละ 10 ml หลังรับประทานยา โดยจะเก็บตัวอย่างเลือดที่เวลา 0, 0.25 (15 นาที), 0.5 (30 นาที), 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ รวมตัวอย่างเลือดทั้งหมด 110 ml หลังรับประทานยา
- ตัวอย่างเลือดปริมาตร 10 ml ที่เวลาต่าง ๆ จะถูกเก็บไวนิลอลดเลือดที่มี heparin 100 หน่วยในปริมาตร 20 μl เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด และนำไปทุบเนวี่ยงเพื่อแยกพลาสma ที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 10°C ภายในครึ่งชั่วโมงหลังการเจาะเลือด พลาสma ที่แยกได้จะถ่ายเก็บไวนิลอลดเลือดฝ่าเกลียวขนาดความจุ 15 ml และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ ซึ่งวิธีการดังกล่าวได้รับการตรวจสอบความถูกต้อง (validation) เพื่อให้มั่นใจว่ามีความเหมาะสมและเพียงพอที่จะให้ได้ข้อมูลที่มีความน่าเชื่อถือ

การเก็บตัวอย่างปัสสาวะ

- ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยจะได้รับการเก็บตัวอย่างปัสสาวะ โดยจะถูกเก็บในภาชนะปากกว้างที่เวลา 0, 0-2, 2-4, 4-8 และ 8-10 ชั่วโมงหลังรับประทานยา โดยการเก็บตัวอย่างปัสสาวะ จะเป็นการเก็บสะสมในแต่ละช่วงเวลา ปัสสาวะที่ได้ในแต่ละช่วงเวลา จะนำมาวัด pH และปริมาตรทุกครั้งที่เก็บ
- ตัวอย่างปัสสาวะที่เวลาต่าง ๆ ที่เก็บได้หลังจากวัดปริมาตรและจดบันทึกแล้ว จะถูกแบ่งใส่หลอดฝ่าเกลียวขนาดความจุ 50 ml ประมาณ 30 ml และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ

3.7.2 การเฝ้าระวังความปลอดภัยของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยระหว่างการศึกษา

ระหว่างการเก็บตัวอย่างเลือดในแต่ละครั้งของการรับประทานยา ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยจะได้รับการวัดค่าความดันโลหิต ชีพจร การซักถามอาการ และจะได้รับการคุ้นเคยจากแพทย์ผู้ร่วมวิจัยอย่างใกล้ชิด เพื่อประเมินผลข้างเคียงหรืออาการไม่พึงประสงค์ที่อาจจะเกิดขึ้นจากยาและการเก็บตัวอย่างเลือด

หากผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยเกิดเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ (adverse events) หรืออาการไม่พึงประสงค์ (adverse drug reaction) เนื่องจากการเข้าร่วมการวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยจะให้การรักษาพยาบาลจนหายเป็นปกติ และเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลทั้งหมด และหากผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยมีความจำเป็นต้องถอนตัวออกจาก การศึกษา ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยจะไม่เสียสิทธิที่พึงมีในการรักษาพยาบาล และสามารถเข้ารับการรักษาพยาบาลตามสิทธิ์ได้ตามปกติ

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.8.1 การวิเคราะห์ทางเภสัชคลินิกาศาสตร์ (Pharmacokinetic analysis)

ความเข้มข้นของ alendronate ในพลาสม่าที่เวลาต่าง ๆ จะถูกนำมาสร้างเป็นกราฟระหว่างความเข้มข้นของยา กับเวลา (concentration-time curve) และนำมารวนพารามิเตอร์ทางเภสัชคลินิกาศาสตร์โดยใช้หลัก Non-compartmental model ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ WinNonlin Standard Edition Version 1.1 (Scientific Consulting Inc., NC, USA) ดังต่อไปนี้

- พื้นที่ใต้เส้นกราฟระหว่างยาในพลาสมากับเวลา (area under the plasma time curve, AUC_(0-∞)) จะคำนวณโดยใช้ trapezoidal rule และ extrapolate ไป infinity

$$AUC_{(0-\infty)} = AUC_{(0-t)} + AUC_{(t-\infty)}$$

$$AUC_{(0-\infty)} = AUC_{(0-t)} + \frac{C_t}{k_e}$$

เมื่อ $AUC_{(0-t)}$ คือ พื้นที่ใต้เส้นกราฟระหว่างยาในพลาสมากับเวลาตั้งแต่เวลา 0 จนถึงเวลาสุดท้ายที่วัดระดับยา

$AUC_{(t-\infty)}$ คือ พื้นที่ใต้กราฟระหว่างยาในพลาสมากับเวลาตั้งแต่เวลาสุดท้ายที่วัดระดับยา และ extrapolate ไปถึง infinity ซึ่งคำนวณจากสมการ

$$AUC_{(t-\infty)} = \frac{C_t}{k_e} \quad \text{เมื่อ } C_t \text{ คือ ความเข้มข้นของยาในพลาสม่าที่เวลาสุดท้ายที่วัด}$$

ได้ และ k_e คือ ค่าคงที่ในการขัดยาในช่วง terminal phase

- Clearance (Cl/F) ของยา คำนวณจากสูตร

$$Cl/F = \frac{\text{Dose}}{AUC_{(0-\infty)}}$$

- Elimination half-life ($t_{1/2}$) ของยา คำนวณจากสูตร

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e}$$

- 4) ระดับยาสูงสุดในพลาสม่า (C_{max}) และ เวลาที่ทำให้ได้ระดับยาสูงสุดในพลาสม่า (T_{max}) หลังรับประทานยา อ่านจากเส้นกราฟความเพิ่มขึ้นของยาในพลาสม่า-เวลาโดยตรง
- 5) ก่าคงที่ในการกำจัดยา (k_e) คือค่า λ ซึ่งคำนวณได้จากโปรแกรม Win Nonlin Version 1.1
- 6) ค่าปริมาตรการกระจายตัวของยา (volume of distribution, V_d/F) คำนวณจากสูตร

$$\frac{V_d}{F} = \frac{C/F}{k_e}$$

- 7) Excretion rate ของยาที่ขับออกทางปัสสาวะ คำนวณจากสูตร

$$\text{Excretion rate } (\mu\text{g}/\text{h}) = \frac{\text{amount excrete in urine}}{\text{time interval}}$$

- 8) Excretion rate ของยาที่ขับออกทางปัสสาวะสูงสุด (Maximum excretion rate; R_{max}) หมายถึง อัตราการขับยาออกทางปัสสาวะสูงสุดในช่วงเวลาหนึ่ง ๆ (T_{max})
- 9) ปริมาณยาที่ขับออกทางปัสสาวะทั้งหมด (Cumulative amount excrete in urine; U_{0-t_0}) หมายถึง ค่าผลรวม ของปริมาณยาที่ขับออกทางปัสสาวะทั้งหมดในช่วงเวลา 10 ชั่วโมงหลังรับประทานยา

3.8.2 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

การประมวลผลข้อมูลรายงานค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจนศาสตร์ในอาสาสมัครและผู้ป่วย เป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มศึกษาทั้ง 2 กลุ่ม โดยใช้ student t-test ที่ 95% confidence interval

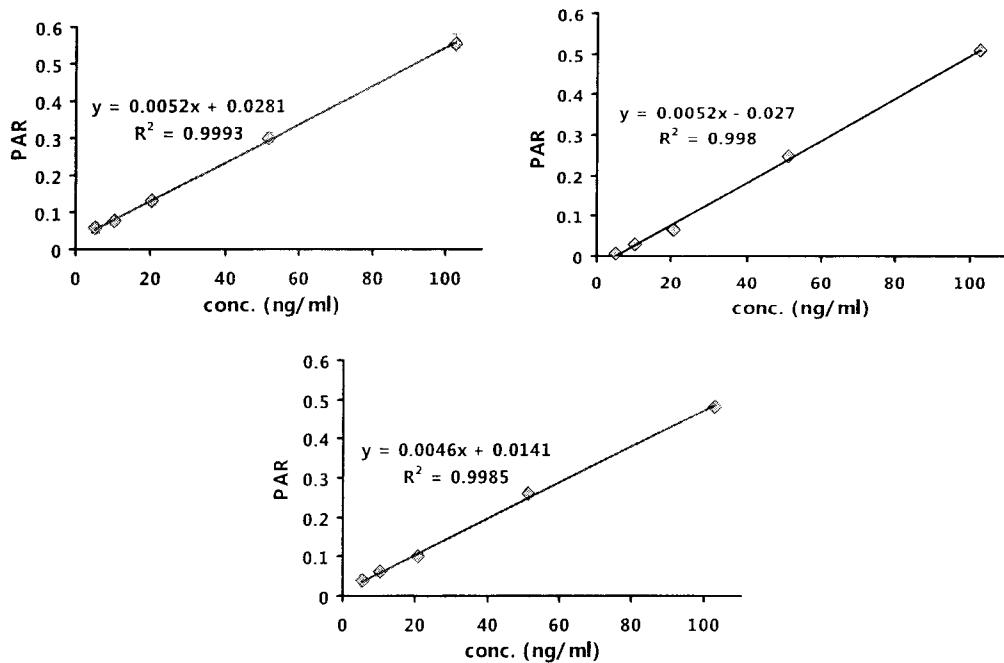
บทที่ 4

ผลการศึกษาและอภิปรายผลการศึกษา

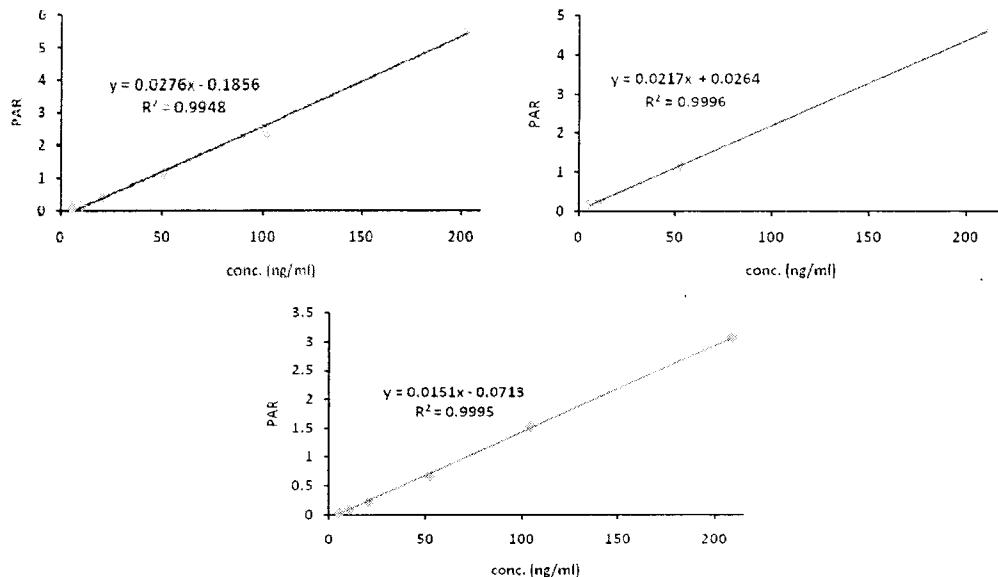
4.1 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

4.1.1 Linearity/calibration curve

กราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนของสัญญาณระหว่าง alendronate กับ pamidronate ที่ความเข้มข้นช่วง 0-100 ng/ml ในพลาスマ และ 0-200 ng/ml ในปัสสาวะ แสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง โดยมีค่า coefficient of determination (r^2) มากกว่า 0.99 (รูปที่ 4-1 และ 4-2) จึงแสดงว่า วิธีการวิเคราะห์มีคุณสมบัติ linearity ที่ดี



รูปที่ 4-1 กราฟมาตรฐานของสัญญาณระหว่าง alendronate เปรียบเทียบกับ pamidronate ในพลาasma ที่ได้จาก การทดสอบ ณ ช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 3 ครั้ง

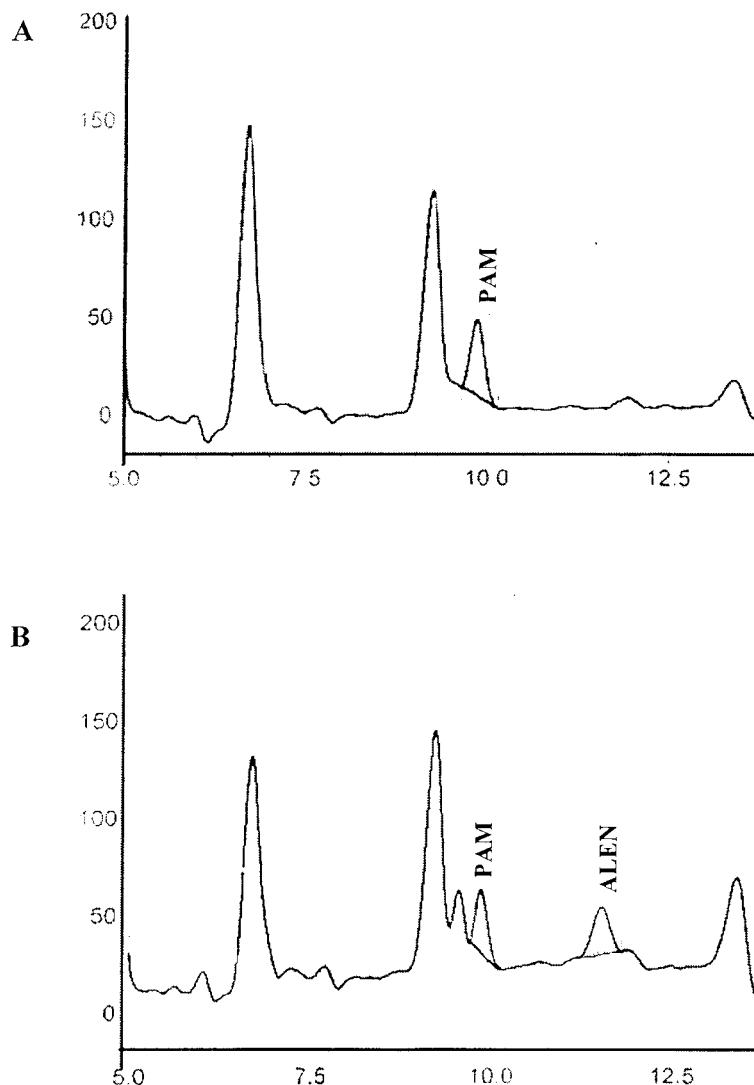


รูปที่ 4-2 กราฟมาตรฐานของสัญญาณระหว่าง alendronate เปรียบเทียบกับ pamidronate ในปัสสาวะ ที่ได้จากการทดสอบ ณ ช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 3 ครั้ง

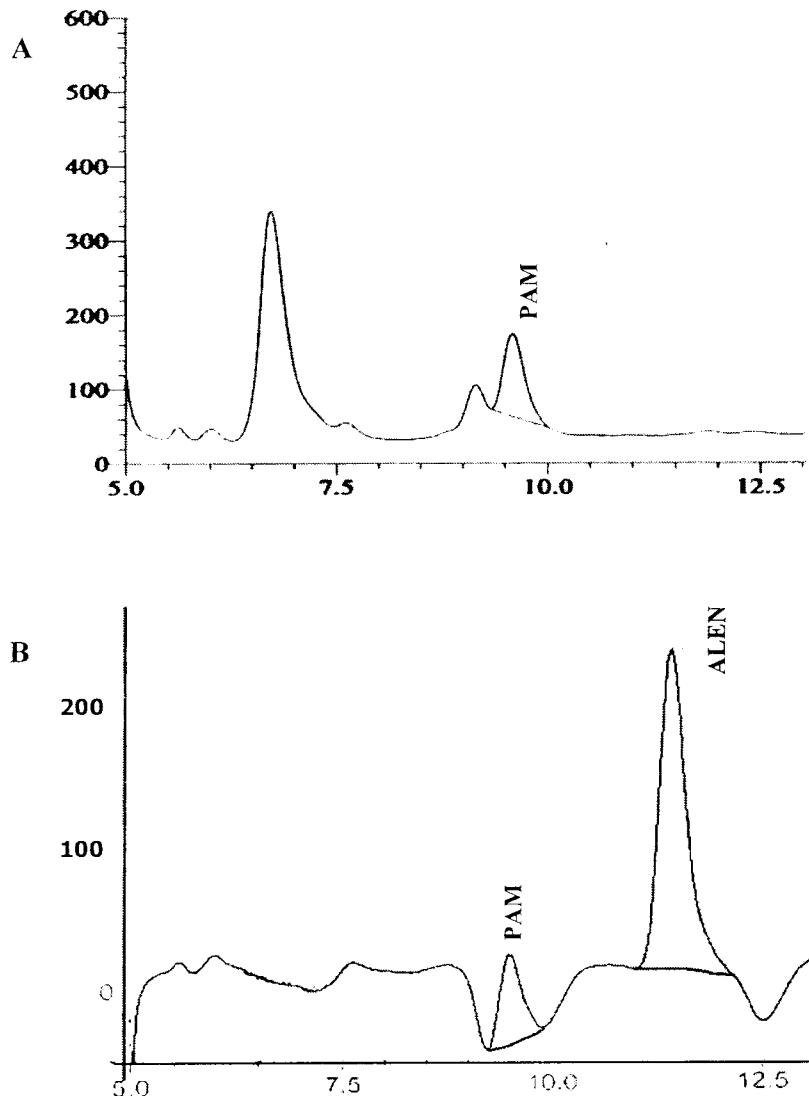
4.1.2 Specificity>Selectivity

เมื่อใช้สภาวะการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น จะพบว่า สัญญาณของ alendronate และ pamidronate (internal standard) จะปรากฏที่เวลาประมาณ 11.4 นาที และ 9.4 นาที ตามลำดับ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่าง (run time) ประมาณ 40 นาที

จากการวิเคราะห์ blank plasma และ blank urine พบว่าไม่มีสัญญาณการรับกรุนที่ค่า retention time (t_R) ของ alendronate (11.4 นาที) ใน plasma และ urine สัญญาณการรับกรุนที่ค่า t_R ของ pamidronate (9.4 นาที) ที่พบใน plasma และ urine นั้น จะถูกตัดออกจากการวัดค่าพื้นที่ได้พีกของ pamidronate โดยวิธี background subtraction ในการวิเคราะห์ผล chromatogram ที่ได้จากการหักลบด้วย background จะปราศจากการรับกรุนที่สัญญาณของ pamidronate (รูปที่ 4-3 และ 4-4)



รูปที่ 4-3 Chromatogram ของพลาสม่าที่ได้จาก (A) ผู้ป่วยก่อนได้รับยา (pre-dose) ที่เติม pamidronate (IS) ความเข้มข้น 200 µg/ml (ทำ background subtraction) และ (B) พลาสม่าที่ได้จากผู้ป่วยที่เวลา 1 ชั่วโมงหลังรับประทานยา (ทำ background subtraction)



รูปที่ 4-4 Chromatogram ของปัสสาวะที่ได้จาก (A) Blank human urine ที่เติม pamidronate (IS) ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ไม่ได้ทำ background subtraction) และ (B) ปัสสาวะที่ได้จากผู้ป่วยที่ เวลา 0-2 ชั่วโมง หลังรับประทานยา (ทำ background subtraction)

4.1.3 Lower limit of detection (LOD) and Lower limit of quantification (LLOQ)

ตารางที่ 4-1 รวมรวม ผลการวิเคราะห์จีดจำกัดในการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และ จีดจำกัดในการหาปริมาณ (Lower limit of quantification, LLOQ) alendronate ในพลาสม่าและปัสสาวะ

ตารางที่ 4-1 จีดจำกัดในการตรวจวัดและจีดจำกัดในการหาปริมาณยา alendronate ในพลาสม่าและปัสสาวะ

	Concentration tested (ng/ml)	Concentration found (ng/ml)	N	Accuracy	
				Mean ± SD	%CV
Plasma					
LOD	5.13	6.66	10	129.8 ± 25.2	19.39
LLOQ *	20.84	18.34	10	87.99 ± 9.50	10.79
Urine					
LOD	5.27	5.19	10	104.7 ± 14.9	14.28
LLOQ**	16.67	18.33	10	110.0 ± 16.0	14.53

* predicted LLOQ คำนวณจาก predicted LLOQ = LOD + (10 x SD) มีค่าเท่ากับ 19.57 ng/ml

** predicted LLOQ คำนวณจาก predicted LLOQ = LOD + (10 x SD) มีค่าเท่ากับ 15.84 ng/ml

4.1.4 Accuracy และ Precision (within run and between run)

ดังแสดงในตารางที่ 4-2 และ 4-3 ค่า accuracy ของการทดสอบในพลาสม่าและในปัสสาวะ มีค่าอยู่ในช่วง 80.0-120.0% และค่า Precision (คำนวณเป็นสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน หรือ coefficient of variation, %CV) ของทั้ง within run และ between run มีค่าน้อยกว่า 20% จึงแสดงว่า วิธีการวิเคราะห์มี Accuracy และ Precision (within run and between run) ที่ดี

ตารางที่ 4-2 Accuracy และ Precision (within run and between run) ของ alendronate จากการทดสอบใน พลาสม่า

Level	Concⁿ (ng/ml)	Within run		Between run	
		% Accuracy	% CV	% Accuracy	% CV
QCL	15.18	99.55	18.63	99.11	13.16
QCM	40.48	94.63	9.86	105.6	10.77
QCH	80.96	98.48	6.38	104.9	9.93

ตารางที่ 4-3 Accuracy และ Precision (within run and between run) ของ alendronate จากการทดสอบในปัสสาวะ

Level	Conc ^a (ng/ml)	Within run		Between run	
		%Accuracy	%CV	%Accuracy	%CV
QCL	5.01	82.47	12.79	113.0	19.68
QCM	15.03	119.9	14.27	91.46	12.79
QCH	40.08	105.1	1.54	106.9	2.58

4.1.5 Recovery

กระบวนการสกัดยา alendronate ที่ได้รายงานในการศึกษานี้ สกัดยาได้ $\geq 80\%$ โดยมีค่า % CV ไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ 4-4 แสดงถึง recovery ของวิธีการสกัดอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 4-4 Recovery ของ alendronate และ pamidronate จากการทดสอบในพลาสม่าและ ปัสสาวะ

Compound	Concentration (ng/ml)	% Recovery \pm SD	%CV
alendronate (plasma)	80.96	80.75 ± 4.80	5.95
alendronate (urine)	40.08	109.1 ± 9.04	8.28
Pamidronate (plasma)	208.33	87.34 ± 4.87	5.58

4.1.6 ความคงตัว (Stability)

ปริมาณ alendronate ในพลาสม่าที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 45 วัน เบริยบเทียบกับปริมาณยาที่ทำการวิเคราะห์ทันทีหรือปริมาณเริ่มต้น พบร้า ปริมาณยังคงเหลือประมาณ 97% และ 98% ของปริมาณเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 50 และ 200 ng/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-5 ซึ่งให้เห็นว่า alendronate มีความคงตัวดีในพลาสม่าที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลาอย่างน้อย 45 วัน

ตารางที่ 4-5 ผลการทดสอบความคงตัว (stability) ของยา alendronate ในพลาสม่า

Concentration (ng/ml)	Estimated concentration (ng/ml)		Alendronate ที่หลือ (%)
	Day 0	Day 45	
50	56.13 ± 2.93	54.05 ± 9.52	96.97 ± 22.0
200	212.86 ± 58.4	202.7 ± 18.2	97.75 ± 18.3

4.2 การประยุกต์วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาเกสซ์ชลนศาสตร์ในผู้ป่วยที่กำลังใช้ยา alendronate

4.2.1 ลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยและอาสาสมัครสุขภาพดี

ผู้ป่วยโรคไトイเรอรังที่มีคุณสมบัติเข้าเกณฑ์การศึกษาและเข้าร่วมการศึกษา มีจำนวนทั้งหมด 8 คน เป็นเพศชาย 2 คน (25%) เพศหญิง 6 คน (75%) มีอายุระหว่าง 43-81 ปี (73.13 ± 12.5 ปี) น้ำหนัก 40-91 กิโลกรัม (58.25 ± 17.5 กิโลกรัม) ส่วนสูง 147-168 เซนติเมตร (157.50 ± 7.71 เซนติเมตร) GFR $39.02\text{-}59.84$ ml/min/1.73 m² (51.92 ± 7.22 ml/min/1.73 m²) ซึ่งจัดเป็นโรคไトイเรอรังระยะที่ 4 คือ มีค่า GFR อยู่ในช่วง $30\text{-}60$ ml/min/1.73 m² โดยสาเหตุที่ทำให้การทำงานของไตลดลงส่วนใหญ่เกิดจากอายุที่มากขึ้นและโรคความดันโลหิตสูง ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยได้รวมรวมในตารางที่ 4-6

การศึกษาเกสซ์ชลนศาสตร์ของยา alendronate sodium ในผู้ป่วยโรคไトイเรอรังในครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดีด้วย โดยมีผู้ที่มีคุณสมบัติเข้าเกณฑ์การศึกษาจำนวน 7 คน เป็นเพศชาย มีอายุระหว่าง 19-27 ปี (22.29 ± 2.50 ปี) น้ำหนัก 52-74 กิโลกรัม (63.14 ± 8.99 กิโลกรัม) ส่วนสูง 168-181 เซนติเมตร (171.57 ± 4.72 เซนติเมตร) ดัชนีมวลกาย $18.42\text{-}26.22$ (21.45 ± 3.04) และมีค่า GFR $93.99\text{-}111.66$ ml/min/1.73 m² (102.13 ± 5.59 ml/min/1.73 m²) ส่วนข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยได้รวมรวมในตารางที่ 4-7

ผู้ที่เข้าร่วมการศึกษาทุกคนมีค่าทางห้องปฏิบัติการอยู่ในเกณฑ์ปกติ สามารถเก็บข้อมูลจากผู้เข้าร่วมการศึกษาจากผู้ป่วยทุกคนได้โดยสมบูรณ์ ดังนั้น ในผลการศึกษานี้ จึงใช้ข้อมูลจากผู้ป่วยจำนวน 8 คน และอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 7 คน ในการคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ทางเกสซ์ชลนศาสตร์ต่าง ๆ เมื่อรับประทานยา alendronate sodium ทั้งในพลาสมาและปัสสาวะ

ในระหว่างทำการศึกษา หลังจากที่ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษารับประทานยา alendronate sodium แล้วพบว่า มีอาการไม่พึงประสงค์เกิดขึ้น จำนวน 2 คน ส่วนใหญ่เป็นอาการไม่พึงประสงค์ที่เกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องอืด ท้องเฟ้อ แน่นท้อง เหร แบบร้อนบริเวณทางเดินอาหาร เป็นต้น ซึ่งจัดเป็นอาการไม่พึงประสงค์ที่ไม่รุนแรง

ตารางที่ 4-6 ลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่เข้าร่วมการศึกษา

Patient	Gender	Age (year)	Weight (kg)	Height (cm)	GFR (ml/min/1.73 m ²)
1	F	43	44	150	39.02
2	F	74	54	150	59.09
3	M	74	49	162	46.69
4	M	80	91	168	49.50
5	F	78	47	147	48.63
6	F	75	69	165	59.84
7	F	80	40	158	55.39
8	F	81	72	160	57.22

M = male, F = female, GFR = glomerular filtration rate

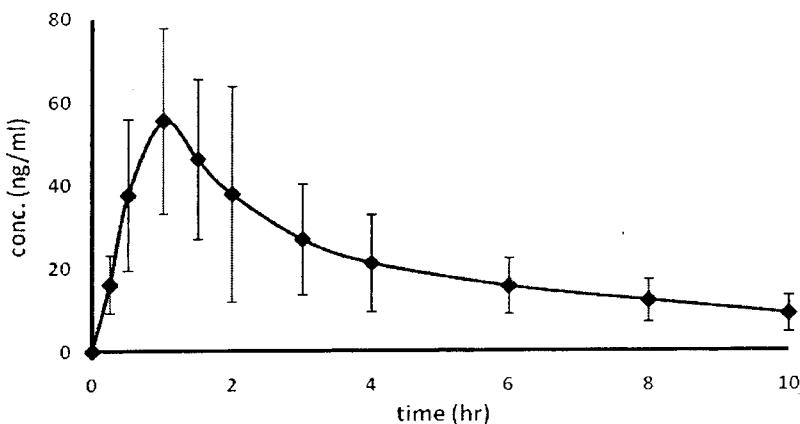
ตารางที่ 4-7 ลักษณะทั่วไปของอาสาสมัครสุขภาพดีที่เข้าร่วมการศึกษา

Patient	Gender	Age (year)	Weight (kg)	Height (cm)	GFR (ml/min/1.73 m ²)
1	M	27	74	168	106.25
2	M	21	53	168	101.33
3	M	22	72	174	111.66
4	M	23	64	181	93.99
5	M	23	69	171	101.21
6	M	19	52	168	101.74
7	M	21	58	171	98.70

M = male, BMI = body mass index, GFR = glomerular rate filtration

4.2.2 เกสัชจลนศาสตร์ของ alendronate ในผู้ป่วยไตเรื้อรังและอาสาสมัครสุขภาพดี

กราฟระดับยาในพลาสมาหลังจากรับประทานยา alendronate sodium 70 mg พบร้า การดูดซึมยาเกิดอย่างรวดเร็ว โดยระดับยาสูงสุดเกิดภายใน 1.0 ชั่วโมงและมีค่าปริมาณ 60 ng/ml ดังแสดงในรูปที่ 4-5 หลังจากนั้น ยังสามารถติดตามระดับยาได้ภายใน 10 ชั่วโมง ค่าพื้นที่ๆ ได้กราฟพร้อมทั้งค่า elimination half life, clearance/F ได้แสดงในตารางที่ 4-8



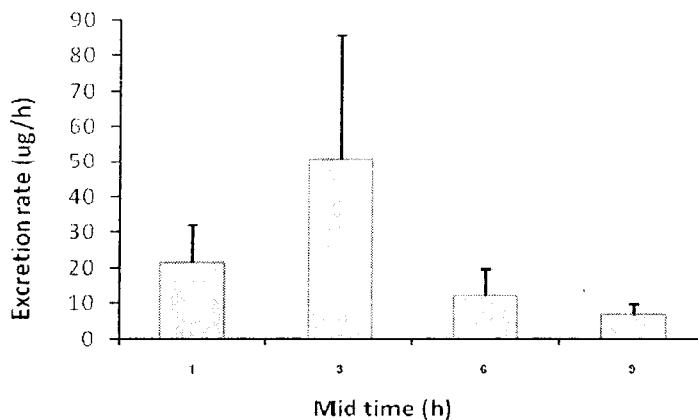
รูปที่ 4-5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระดับยาแอลเดนตรอนในพลาสมากับเวลาของผู้ป่วยโรคไตรีโอรัง
หลังรับประทานยา alendronate sodium 70 mg ($N = 8$)

ตารางที่ 4-8 พารามิเตอร์ทางเภสัชคลินิกาสตร์จากผู้ป่วยโรคไตรีโอรังและอาสาสมัครสุขภาพดี
และผลวิเคราะห์ทางสถิติ

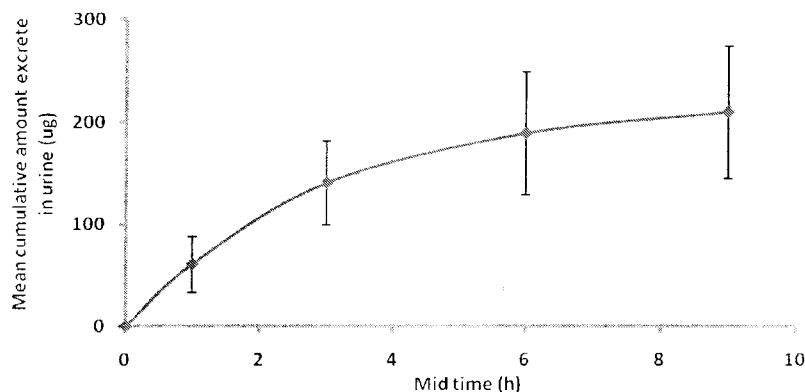
parameters	Patient (N = 8)	Healthy volunteers (N = 7)	<i>p</i> -value
GFR (ml/min/1.73 m ²)	51.92 ± 7.22	102.13 ± 5.59	
C _{max} (ng/ml)	59.90 ± 20.6	56.59 ± 11.8	0.352
T _{max} (h)	1.06 ± 0.50	1.29 ± 0.39	0.175
AUC _{0-t} (ng.h/ml)	220.79 ± 93.0	132.40 ± 47.0	0.019*
AUC _{0-∞} (ng.h/ml)	335.52 ± 199.6	150.98 ± 52.7	0.018*
k _e (h ⁻¹)	0.145 ± 0.09	0.278 ± 0.14	0.031*
t _{1/2} (h)	7.65 ± 5.82	3.43 ± 2.24	0.045*
Cl/F (L/h)	249.40 ± 85.9	510.44 ± 161.9	0.002*
V _d /F (L)	2444.42 ± 1727.0	2495.96 ± 1814.0	0.478

* = significance value

จากข้อมูลระดับยาในปัสสาวะ (รูปที่ 4-6) พบว่า อัตราการกำจัดยาทางปัสสาวะมีค่าสูงสุดในช่วง 2-4 ชั่วโมง กราฟปริมาณที่ขับออกจะสมกับเวลา (mid time) ดังแสดงในรูปที่ 4-7 พบว่า ปริมาณที่ขับออกทางปัสสาวะเริ่มคงที่ตั้งแต่ที่ 8 ชั่วโมง ดังนั้น ปริมาณยาส่วนใหญ่ถูกขับออกทางปัสสาวะภายใน 10 ชั่วโมง ข้อมูลการกำจัดยาทางปัสสาวะได้สรุปไว้ในตารางที่ 4-9



รูปที่ 4-6 แผนภูมิแสดงอัตราการกำจัดยาทางปัสสาวะ (Mean urinary excretion rate) กับเวลา (mid time) ในผู้ป่วยโรคไตรีโอรัง ภายหลังรับประทานยา alendronate sodium 70 mg (N=8)



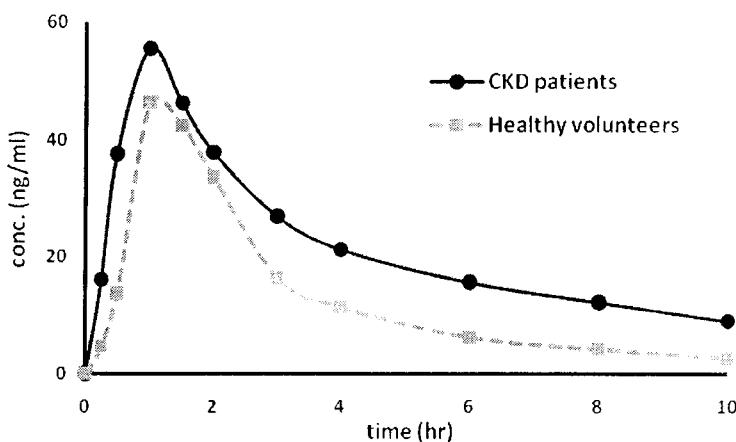
รูปที่ 4-7 กราฟแสดงปริมาณที่ถูกขับออกทางปัสสาวะ (Mean cumulative amount excrete in urine) กับเวลา (mid time) ในผู้ป่วยโรคไตรีโอรังที่รับประทานยา alendronate sodium 70 mg (N=8)

ตารางที่ 4-9 พารามิเตอร์ทางเภสัชคลินิกาสตร์ในปัสสาวะจากผู้ป่วยโรคไตรีโอรังและอาสาสมัครสุขภาพดี และผลวิเคราะห์ทางสถิติ

Pharmacokinetics parameters	Patient (N = 8)	Healthy volunteers (N = 7)	<i>p</i> -value
Total urine volume (ml)	736.00 ± 256.5	979.71 ± 269.49	
T _{max} (h)	3.00 ± 2.62	1.29 ± 0.76	0.057
Maximum excretion rate [R _{max}] (ug/h)	46.49 ± 20.8	143.32 ± 72.8	0.006*
Total amount excrete [U ₀₋₁₀] (ug)	209.59 ± 64.2	578.59 ± 308.9	0.010*

* = significance value

ในอาสาสมัครสุขภาพดี พบว่า ระดับยาสูงสุดในพลาสมามีค่าเฉลี่ยประมาณ 57 ng/ml และ เกิดภายใน 1.0-1.5 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4-8 ซึ่งแสดงระดับยาที่ได้จากผู้ที่สุขภาพดีและผู้ป่วยไตรีอรัง หลังช่วงการดูดซึม ยาสูงสุด ระดับยาในพลาสมางานผู้ที่สุขภาพดี จะลดลงที่มีความชันต่างกันเป็น 2 ช่วงอย่างชัดเจน ในขณะที่ระดับยาในพลาสมางานที่ได้จากผู้ป่วยโรคไตรีอรัง จะปรากฏลักษณะดังกล่าว เช่น กันแต่มีความชันของกราฟที่น้อยกว่า อย่างไรก็ตามระดับยาสูงสุดในพลาสมา (C_{max}) และ T_{max} ในผู้ที่สุขภาพดีมีต่ำกว่าระดับยาสูงสุดใน พลาสมางานผู้ป่วยโรคไตรีอรัง (ตารางที่ 4-8) ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชokinศาสตร์จากอาสาสมัครสุขภาพดี ดัง สรุปในตารางที่ 4-8 พบว่า ค่าพื้นที่ได้กราฟ (AUC) และค่าครึ่งชีวิตของการกำจัดยา ($t_{1/2}$) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคไตรีอรังมีค่าสูงกว่าค่า AUC และ $t_{1/2}$ ในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4-8) แต่เนื่องจากระดับยาในพลาสมากลับจาก 10 ชั่วโมงของผู้เข้าร่วมการศึกษาทั้ง 2 กลุ่ม จะมีค่าน้อยกว่าจึงจำกัดการ ตรวจวัด ซึ่งอาจทำให้ระดับยาที่วัดได้มีความคลาดเคลื่อนสูง ดังนั้น ระดับยาในพลาสมาตั้งแต่ 10 ชั่วโมงเป็นต้นไปจะไม่นำมาวิเคราะห์และแปลผลในการศึกษานี้



รูปที่ 4-8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของระดับยาในพลาสมากับเวลาเฉลี่ยของผู้ป่วยโรคไตรีอรังและ จากราบอาสาสมัครสุขภาพดีหลังรับประทานยา alendronate sodium 70 mg จำนวน 1 เม็ด

ระดับยาในปัสสาวะจากผู้ที่สุขภาพดี พบว่า alendronate ถูกขับออกมากทางปัสสาวะอย่างรวดเร็วใน ช่วงเวลา 0-2 ชั่วโมงแรก (รูปที่ 4-9) ในขณะที่อัตราการกำจัดยาสูงสุดทางปัสสาวะ (R_{max}) ในผู้ป่วยไตรีอรังมี ค่าสูงสุดในช่วง 2-4 ชั่วโมง (รูปที่ 4-6) โดยค่า R_{max} ในผู้ป่วยไตรีอรังมีค่าต่ำกว่าในผู้ที่สุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ (ตารางที่ 4-9) นอกจากนี้ปริมาณยาสะสม ในปัสสาวะภายใน 10 ชั่วโมง (U_{0-10}) ในผู้ป่วยไตรีอรังน้อย กว่าค่าที่ได้ผู้ที่สุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4-10 และ ตารางที่ 4-9) ซึ่งแสดงถึงการกำจัดยาที่ลดลง อย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยกลุ่มนี้ การทำงานที่ลดลงในผู้ป่วยไตรีอรังแสดงโดยการลดลงของค่า GFR ซึ่งเมื่อ

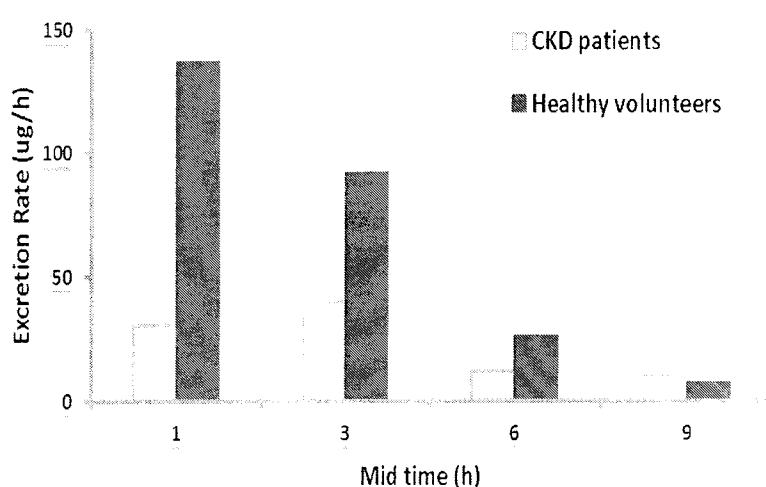
สรุกราฟระหว่าง GFR และ $AUC_{0-\infty}$ พบว่ามีแนวโน้มของความสัมพันธ์เชิงเส้น โดยค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) = -0.583 (รูปที่ 4-11)

ตารางที่ 4-10 พารามิเตอร์ทางเภสัชokinetics ในพลาสม่าของอาสาสมัครสุขภาพดีหลังรับประทานยา alendronate sodium ขนาด 70 mg (Fosamax[®]) เปรียบเทียบกับการศึกษาที่มีรายงานมาก่อน

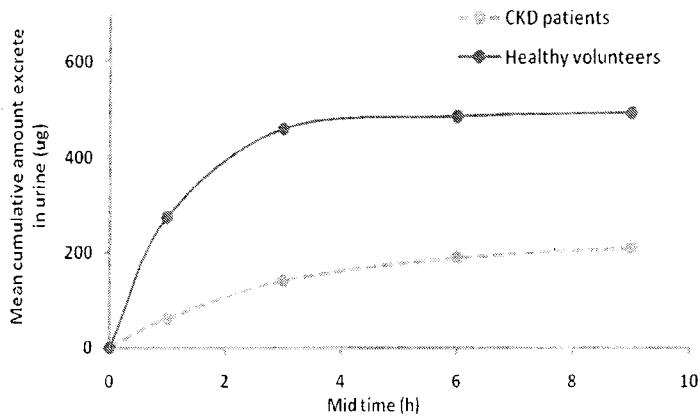
parameters	การศึกยาน* (N = 7)	Yun, et al^{11**} (N = 24)
C_{max} (ng/ml)	56.6 ± 11.8	38.5 ± 24.4
T_{max} (h)	1.29 ± 0.39	0.99 ± 0.51
AUC_{0-t} (ng.h/ml)	132.4 ± 46.9	102.4 ± 70.0
$AUC_{0-\infty}$ (ng.h/ml)	151.0 ± 52.7	110.2 ± 72.4
k_e (h ⁻¹)	0.28 ± 0.14	0.40 ± 0.18
$t_{1/2}$ (h)	3.43 ± 2.24	1.87 ± 0.62
Cl/F (L/h)	510.4 ± 162	889.5 ± 486
V_d/F (L)	2495.9 ± 1813.9	2576.4 ± 1826

* อาสาสมัครสุขภาพดี รับประทาน Fosamax PlusTM 1 เม็ด

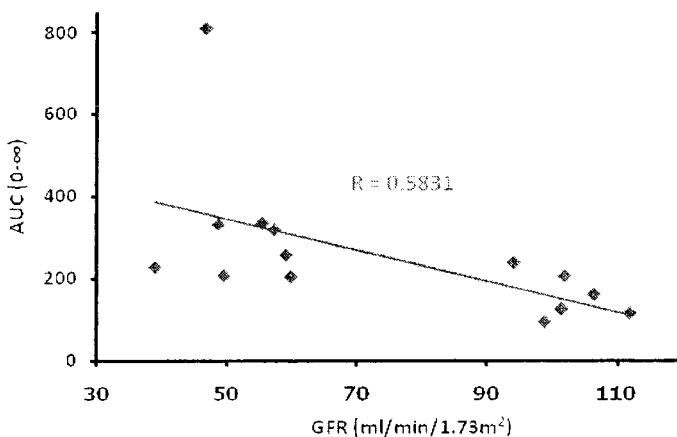
** อาสาสมัครสุขภาพดี รับประทาน Fosamax[®] 1 เม็ด



รูปที่ 4-9 กราฟแสดงอัตราการกำจัดยาทางปัสสาวะ (Mean urinary excretion rate) กับเวลา (Mid time) ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง เปรียบเทียบกับอาสาสมัครสุขภาพดี หลังรับประทานยา alendronate sodium 70 mg จำนวน 1 เม็ด



รูปที่ 4-10 กราฟแสดง Mean cumulative amount excrete in urine กับเวลา (mid time) ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง เมื่อเทียบกับอาสาสมัครสุขภาพดี หลังรับประทานยา alendronate sodium 70 mg



รูปที่ 4-11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า GFR กับ AUC_{0-∞} จะเห็นว่าเมื่อค่า GFR เพิ่มสูงขึ้น ค่า AUC_{0-∞} ของยา alendronate ในพลาสม่าจะลดลง

4.3 อภิปรายผลการศึกษา

การวิเคราะห์โดยใช้สภาวะที่พัฒนาขึ้น สามารถตรวจวัดพีคของยา และ IS ได้ที่ 11.4 และ 9.4 นาที ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงการแยกกันอย่างชัดเจนของพีคตัวยา และ IS การที่ retention time ของตัวยาและIS ห่างกันประมาณ 2 นาที นี้แตกต่างจากการศึกษาโดย Yun and Kwon¹¹ ที่พีคของตัวยา และIS ห่างกันประมาณ 1 นาที แสดงถึง resolution ของวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษานี้ นอกจากนี้ เมื่อมีการตั้งการให้ลุกของmobile phase แบบ gradient elution โดยการเพิ่มอัตราส่วนของ methanol และ acetonitrile และตั้งอุณหภูมิของการวิเคราะห์ที่ 35 °C ทำให้สามารถตรวจตัวยา และ IS ได้ภายใน 15 นาทีดังกล่าวไปแล้วนั้น แตกต่างจากวิธีวิเคราะห์โดย

Kang และคณะ¹⁸ ที่รายงาน retention time ของตัวยาและ IS ประมาณ 22.0 และ 18.3 นาที ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เพื่อชีวสารที่ถูก derivatized ซึ่งติดค้างใน column การชีวสารในการศึกษานี้ จึงต้องใช้เวลาวิเคราะห์ทั้งหมด (total run time) ประมาณ 40 นาที ซึ่งมากกว่าวิธีที่รายงานไว้ก่อนหน้านี้ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 25 นาที¹¹ แต่การยืดระยะเวลาออก ทำให้สามารถแยกสารตัวอย่างออกได้อย่างชัดเจนและสามารถดีดอาขุกราชีวงานของ column ได้

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ alendronate ที่พัฒนาขึ้น มีความจำเพาะเจาะจง ปราศจากสารรบกวนต่อ alendronate ทั้งในพลาสม่าและปัสสาวะ เมื่อว่าจะมีการรบกวนต่อ IS การหักล้างสิ่งรบกวนจากโครมาโทแกรมของตัวอย่างที่มียา (background subtraction) จะทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความแม่นยำ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณยาในพลาสม่าในช่วงความเข้มข้น 0-100 ng/ml ครอบคลุมความเข้มข้นของยาในพลาสม่าที่ตรวจด้วยการศึกษาแก๊สชลนศาสตร์ของยาโดยการรับประทาน และ เป็นช่วงเดียวกันกับที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้¹¹ ส่วนกราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณยาในปัสสาวะในการศึกษานี้ (0-200 ng/ml) นั้น แตกต่างจากการศึกษาที่รายงานไว้ก่อนหน้านี้โดย Kang และคณะที่รายงานกราฟมาตรฐานยาในปัสสาวะ 25-5,000 ng/ml¹⁸ ความชันของสมการเส้นตรงของการฟามาตรฐานของการวิเคราะห์พลาสม่า (0.005 ± 0.00035) มีค่าเฉลี่ยกว่าที่ Yun and Kwon รายงานไว้ (0.0099 ± 0.0004)¹¹ รวมถึงค่า LOD และ LLOQ ใน การวิเคราะห์พลาสม่า (6.66 และ 18.34 ng/ml ตามลำดับ) นั้นสูงกว่าที่ Yun and Kwon รายงานไว้ก่อนหน้านี้ (LLOQ 1 ng/ml)¹¹ แสดงถึงความไวของวิธีวิเคราะห์ยาในพลาสม่าที่ต่ำกว่าวิธีที่รายงานมาก่อน อย่างไรก็ตาม ในการวิเคราะห์ปัสสาวะ ความชันของสมการเส้นตรงของการฟามาตรฐานของการวิเคราะห์ยาในปัสสาวะ (0.0215 ± 0.0062) มีค่าสูงกว่าที่ Kang และคณะรายงานไว้ (0.0031 ± 0.0001)¹⁸ รวมถึง LOD และ LLOQ ในปัสสาวะ (5.19 และ 18.33 ng/ml ตามลำดับ) มีค่าต่ำกว่าวิธีของ Kang และคณะ (LLOQ 25 ng/ml)¹⁸ แสดงถึงความไวของวิธีวิเคราะห์ยาในปัสสาวะที่สูงกว่าวิธีที่รายงานมาก่อน นอกจากนี้ การศึกษานี้มีการตรวจวัดระดับยาในพลาสม่าและปัสสาวะเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ในขณะที่การวัดระดับยาในพลาสม่าโดย Yun and Kwon นั้นกระทำภายใน 7 ชั่วโมง¹¹ และการติดตามวัดระดับยาในปัสสาวะโดย Kang และคณะ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง¹⁸ วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ ใช้ตัวอย่างพลาสม่าและปัสสาวะเพียง 3 และ 1 ml ตามลำดับ

ความถูกต้องของการวิเคราะห์ยาในพลาสมາทดสอบที่ความเข้มข้น 15, 40 และ 80 ng/ml มีค่าระหว่าง 94.6%- 99.6% ความถูกต้องของการวิเคราะห์ยาในปัสสาวะทดสอบที่ความเข้มข้น 5, 15 และ 40 ng/ml มีค่าระหว่าง 82.5%-119.9% ซึ่งค่าส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์ $\pm 15\%$ ยกเว้นการทดสอบในตัวอย่างปัสสาวะ(QCM) ที่มีค่าความถูกต้องนอกช่วง $\pm 15\%$ ความแม่นยำของการวิเคราะห์ตัวยาในพลาสมามีค่า 6.38-18.6 % (within run) และ 9.93-13.2% (between run) ความแม่นยำของ การวิเคราะห์ตัวยาในปัสสาวะมีค่า 1.54-14.3% (within run) และ 2.58-19.7% (between run) วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องและแม่นยำในการวิเคราะห์อยู่ในช่วงที่ยอมรับแต่ การวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสม่าอาจมีความถูกต้องและแม่นยำน้อยกว่าที่รายงานโดย Yun and Kwon (Intra-day accuracy and precision ไม่เกิน 9%; interday accuracy and precision ไม่เกิน 15%)¹¹ ยามีความคงตัวดีในพลาสม่า เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 45 วัน โดยปริมาณยาคงเหลือในพลาสม่าประมาณ 97.0% ของความเข้มข้นเริ่มต้น

ผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์การศึกษาห้องหมด จัดเป็นผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังในระยะที่ 4 (GFR 30-60 ml/min/1.73m²) จากผลการศึกษาพบว่า ยา alendronate ถูกคุณซึมเข้าสู่ร่างกายและเลือดได้อย่างรวดเร็ว โดยระดับยาสูงสุดในเลือด (C_{max}) มีค่าเฉลี่ยประมาณ 60 ng/ml โดยที่ T_{max} มีค่าเฉลี่ยกว่า 1.5 ชั่วโมง กราฟแสดงระดับยาในเลือดเทียบกับเวลา แสดงในรูปที่ 11 ซึ่งให้เห็นว่า ระดับยาในพลาสมาน้ำที่ได้จากผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังจะมีลักษณะการลดลงเป็น 2 ช่วงที่ ไม่ชัดเจน ดังเช่นที่สังเกตได้จากระดับยาในพลาสมาน้ำผู้ที่มีการทำงานของไตปกติ (รูปที่ 4-9) ซึ่งอาจอธิบายได้ จากความแตกต่างของการกระจายยา alendronate ระหว่าง 2 กลุ่ม โดยที่ในผู้ที่มีการทำงานของไตปกติซึ่งไม่เคยได้รับยามาก่อนการกระจายยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดสมดุลระหว่างระดับยาในกระแสเลือดกับระดับยาที่ กระดูกรวมทั้งอวัยวะอื่น ๆ เกิดขึ้นในระยะเวลาที่สั้นกว่าที่จะเกิดในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง นอกจากนี้ในกลุ่มผู้ป่วย โรคไตเรื้อรัง ระดับยาในพลาสมาน้ำเวลา 10 ชั่วโมงหลังรับประทานยาซึ่งค่อนข้างสูง ซึ่งเป็นผลจากการกำจัดยาที่ลดลงในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ส่งผลให้ค่า AUC extrapolated to infinity ค่อนข้างสูง (> 20% total AUC) ซึ่งแตกต่างจาก กลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดในการเก็บตัวอย่างเลือดในผู้ป่วยไตเรื้อรังนาน กว่า 10 ชั่วโมงนั้น ทำให้การใช้เลือดหลัง 10 ชั่วโมงไม่สามารถทำได้

จากตารางที่ 4-8 และ 4-9 ซึ่งแสดงการเปรียบเทียบพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ทั้งในพลาสมาและ ปัสสาวะระหว่างผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังและอาสาสมัครสุขภาพดี จะเห็นว่า ค่า $AUC_{0-\infty}$, k_e , $t_{1/2}$, CI/F และ U_{0-10} ของ ทั้ง 2 กลุ่ม แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า $AUC_{0-\infty}$ และ $t_{1/2}$ ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีค่ามากกว่า อาสาสมัครสุขภาพดีประมาณ 2 เท่า ในขณะที่ ค่า k_e และ CI/F ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีค่าเฉลี่ยกว่าอาสาสมัคร สุขภาพดีประมาณ 2 เท่า เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณยาที่ขับออกทางปัสสาวะ (U_{0-10}) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การ ทำงานของไตที่ลดลง มีผลต่อการกำจัดยาออกจากร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายใน 12 ชั่วโมงหลังรับประทานยา

นอกจากนี้ ยังพบว่าในอาสาสมัครสุขภาพดี ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ได้จากพลาสมาและ ปัสสาวะมีความสอดคล้องกันเป็นอย่างดี เช่น ค่า T_{max} ซึ่งมีค่า 1.29 ± 0.39 ชั่วโมง (จากพลาสมา) และ 1.29 ± 0.76 ชั่วโมง (จากปัสสาวะ) ในขณะที่ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ได้จากพลาสมาและปัสสาวะในผู้ป่วยโรค ไตเรื้อรังนั้น ไม่ได้มีความสอดคล้องกัน ($T_{max} 1.06 \pm 0.45$ และ 3.00 ± 2.62 ชั่วโมง จากพลาสมา และปัสสาวะ ตามลำดับ) ดังเช่นที่สังเกตได้ในอาสาสมัครสุขภาพดี อย่างไรก็ตาม เมื่อสังเกตจากค่า SD ของค่า AUC, C_{max} และ T_{max} ที่เป็นค่าที่กว้าง แสดงถึงเภสัชจลนศาสตร์ของ alendronate ที่แปรปรวนสูงทั้งในกลุ่มผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังและ กลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี นอกจากนี้ การคุณซึมยาอาจเกิดช้า เนื่องจากภาวะ delayed gastric emptying ที่มักพบ ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง⁴¹

จากการเปรียบเทียบพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ในอาสาสมัครสุขภาพดีในการศึกษานี้กับรายงาน การศึกษาของ Yun และคณะ¹¹ ที่ทำการศึกษาโดยอาศัยระดับยาในพลาสมา (ตารางที่ 4-10) พบว่า T_{max} มีค่า ใกล้เคียงกัน ในขณะที่ C_{max} , AUC_{0-t} และ $AUC_{0-\infty}$ ในการศึกษานี้มีค่าสูงกว่า แต่ค่า k_e , $t_{1/2}$ และ CI/F มีค่าเฉลี่ยกว่า ค่าที่รายงานโดย Yun และคณะ และเมื่อเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ในการศึกษานี้กับค่าที่รายงานโดย Kang และ คณะ¹⁸ ที่ทำการศึกษาโดยอาศัยระดับยาในปัสสาวะ (ตารางที่ 16) พบว่า T_{max} มีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่ค่า R_{max} และ U_{0-t} มีค่าสูงกว่าการศึกษาที่รายงานมาก่อน การที่ CI/F มีค่าเฉลี่ยจากนี้ของมาจากการกำจัดยาที่น้อย หรือมีการ คุณซึมหรือ bioavailability (F) เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การขัดยาทางปัสสาวะในการศึกษานี้มีค่าค่อนข้างสูง ดังนั้น

จึงเป็นไปได้ที่ค่า CI/F ใน การศึกษานี้ ความแตกต่างไปจากการศึกษา ก่อนหน้า มีสาเหตุจากค่า F ที่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากรูปแบบของยาที่ใช้ในการศึกษานี้ แตกต่างจากการศึกษา ก่อนหน้า กล่าวคือ ผู้เข้าร่วมการศึกษาในครั้งนี้ได้รับยา Fosamax PlusTM ซึ่งประกอบด้วย alendronate sodium บวก cholecalciferol (Vitamin D₃) ในขณะที่ การศึกษาโดย Yun และคณะ¹¹ และ Kang และคณะ¹⁸ นั้น ผู้เข้าร่วมการศึกษาได้รับยา Fosamax[®] ซึ่งเป็น alendronate sodium เพียงชนิดเดียว ผลการศึกษานำร่อง (Preliminary phase) ที่ได้ศึกษาการจัดยาในปัสสาวะ โดยยาASAสมัครสุขภาพดีรับประทานยา alendronate sodium ขนาด 70 mg (Fosamax[®]) สนับสนุนข้อสันนิษฐาน ข้างต้น เนื่องจากว่าค่าพารามิเตอร์ของยาในปัสสาวะที่ได้จากการศึกษานำร่องมีค่าใกล้เคียงกับข้อมูลที่รายงานโดย Kang และคณะ (ตารางที่ 4-11)

ตารางที่ 4-11 พารามิเตอร์ทางเภสัชokinetics ในปัสสาวะของยา ASAสมัครสุขภาพดีหลังรับประทานยา alendronate sodium ขนาด 70 mg (Fosamax[®]) เปรียบเทียบกับการศึกษาที่มีรายงานมาก่อน

Pharmacokinetics parameters	การศึกษานี้	Preliminary phase	Kang, et al¹⁸
	(N = 7)	(N=5)	(N = 7)
T _{max} (h)	1.29 ± 0.76	1.40 ± 0.89	0.93 ± 0.59
Maximum excretion rate [R _{max}] (μg/h)	143.3 ± 72.8	52.84 ± 14.6	65.67 ± 20.8
Total amount excrete [U ₀₋₁] (μg)	578.6 ± 309	178.7 ± 51.2	198.4 ± 81.2

ค่าพารามิเตอร์ (AUC_{0-∞}, C_{max}, t_{1/2}) ที่ได้ในการศึกษานี้ ทั้งในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังและยาASAสมัครสุขภาพดี มีความแปรปรวนค่อนข้างสูง ซึ่งอาจเป็นผลจากสาเหตุหลายประการ ออาทิเช่น

- ความผิดปกติของการดูดซึมยาในกลุ่มผู้ที่มีการทำงานของไตบกพร่อง ผู้ป่วยกลุ่มนี้มักเกิด delayed gastric emptying⁴¹ ทำให้การดูดซึมยาในบริเวณลำไส้ช้าลง ส่งผลให้ต่อค่า T_{max} และ C_{max} มีความแปรปรวน
- จากคุณสมบัติของยา alendronate เอง โดยมีรายงานว่าการดูดซึมยาผ่านเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารเกิดผ่าน paracellular pathway (pore channel) อย่างไรก็ตาม โครงสร้างที่มีประจุลบ (anion) ที่ physiological pH อาจส่งทำให้การดูดซึมยาผ่าน pore channel เกิดขึ้นได้ยาก

บทที่ ๕

สรุปผลการศึกษา

วิธีวิเคราะห์โดย HPLC ที่ตรวจวัดโดยฟลูออร์เเชนซ์ (fluorescence detection) เพื่อตรวจวัดระดับยา alendronate จากผู้ป่วยโรคไടิเรื้อรังและอาสาสมัครสุขภาพดี ได้ถูกพัฒนาขึ้นในการศึกษานี้ และทดสอบความน่าเชื่อถือ และ ทดสอบในการศึกษากลั่นศาสตร์ของยาในอาสาสมัครสุขภาพดีและ ผู้ป่วยโรคไடิเรื้อรัง ที่ได้รับยา alendronate แบบรับประทานขนาด 70 มก.เพียงครั้งเดียว

การเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณยา alendronate ในพลาสma ทำโดยการตกลงกอน โปรดีนด้วย 6% TCA (ตัวอย่างปัสสาวะจะไม่มีขั้นตอนนี้) เดือนมาผ่านกระบวนการตกลงกอนด้วย calcium ในสภาวะที่เป็นค่า 2 ครั้ง จากนั้นกำจัด calcium และ phosphate ที่เหลือด้วย ion-exchange resin ชนิด DEA-SPE cartridge ทำปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ด้วย 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) ก่อนวิเคราะห์หาปริมาณ และ ใช้ pamidronate เป็น internal standard (IS) การแยกสารจะใช้ชุดลัมภ์ชนิดคาร์บอน-18 และ mobile phase ประกอบด้วยสารละลายผสมของ acetonitrile-methanol-citrate/pyrophosphate buffers และค่ออย ๆ เพิ่มสัดส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ จาก 32% เป็น 40% v/v ที่อัตราการไหล 1.5 มล./นาที ทำการตรวจด้วยฟลูออร์เเชนซ์ ที่ความยาวคลื่น 260 nm (excitation) และ 310 nm (emission) ที่อุณหภูมิ 35 °C alendronate สามารถแยกออกจาก IS ได้ที่เวลา 9.72 และ 11.45 นาที ตามลำดับ ใช้เวลาในการวิเคราะห์รวม 40 นาที ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ มีค่าขีดจำกัดของการวัด (LOD) เท่ากับ 5.13 ng/ml เมื่อใช้พลาสma 3 ml. และ 5.27 ng/ml เมื่อใช้ปัสสาวะ 1 ml ค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ (LLOQ) ในพลาสma 20.84 ng/ml และในปัสสาวะ มีค่า 16.67 ng/ml เส้นกราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรง ($R^2 > 0.99$) ที่ความเข้มข้น 0-100 ng/ml ในพลาสma และ 0-200 ng/ml ในปัสสาวะ การทดสอบความถูกต้องในพลาสma ได้ผลเท่ากับ 99.55%, 94.63% และ 98.48% ที่ความเข้มข้น 15, 40 และ 80 ng/ml ตามลำดับ ส่วนการทดสอบความถูกต้องในปัสสาวะ ได้ผลเท่ากับ 82.47%, 119.88% และ 105.10% ที่ความเข้มข้น 5, 15 และ 40 ng/ml ตามลำดับ ความแม่นยำของการทดสอบในพลาสma อุญในช่วง 6.38-18.6% (วิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน) และ 9.93-13.2% (วิเคราะห์ต่างวันกัน) ความแม่นยำของการทดสอบในปัสสาวะ อุญในช่วง 1.54-14.3% (วิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน) และ 2.58-19.7% (วิเคราะห์ต่างวันกัน) เมื่อเก็บตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 45 วันเพื่อทดสอบความคงตัว พนว่าปริมาณยาคงเหลือในพลาสma มีค่าเท่ากับ 97.0% และ 97.7% ที่ความเข้มข้น 50 และ 150 ng/ml ตามลำดับ

การประยุกต์วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้ โดยการศึกษากลั่นศาสตร์ของยา alendronate ในอาสาสมัครสุขภาพดี และผู้ป่วยโรคไടิเรื้อรังที่ได้รับยาอะเลนโตรเนตในรูปแบบรับประทานขนาด 70 มก. พนว่า ยาถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้อย่างรวดเร็ว โดยเวลาที่เกิดระดับยาสูงสุดในพลาสma มีค่าต่ำกว่า 1.5 ชั่วโมง ในอาสาสมัครสุขภาพดี AUC, C_{max} , $t_{1/2}$ สอดคล้องกับพารามิเตอร์ในปัสสาวะ (R_{max} , U_{1-10}) ค่า AUC ในผู้ป่วยโรคไടิเรื้อรังมีค่าใกล้เคียงกับค่าจากอาสาสมัครสุขภาพดี แต่ปริมาณยาทั้งหมดที่ขับออกทางปัสสาวะรวมทั้งอัตราการขับออกในปัสสาวะลดลงอย่างชัดเจน ในผู้ป่วยโรคไടิเรื้อรัง

บรรณานุกรม

1. Kimmel D. 2007. Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates. *Journal of Dental Research.* 86(1): 1022-1033.
2. Graham R, Russell G. 2007. Bisphosphonates: Mode of action and pharmacology. *Pediatrics.* 119: S150-S162.
3. Reszka A, Roda G. 2003. Bisphosphonate mechanism of action. *Current Rheumatology Reports.* 5: 65-74.
4. Bonnick S. 2006 Osteoporosis in men and women. *Clin Cornerstone.* 8(1): 28-39.
5. Levine J. 2006 Pharmacologic and nonpharmacologic management of osteoporosis. *Clin Cornerstone.* 8(1): 40-53.
6. Pongchayakul C, Songpattanasilp T, and Taechakraichana N. 2008. Osteoporosis: Overview in disease, epidemiology, treatment and health economy. *Journal of Medical Association of Thailand.* 91(4): 581-594.
7. รัชดา รัชดาวนิน, นทีพิพิช กฤญนามระ, บุญส่อง องค์พิพัฒนกุล โรคกระดูกพรุน ใน:วันเพ็ญ ชัยคำภา, สุกัศน์ พู่เจริญ, อภิวัฒน์ มุติรางคูร, กิเชก ลุมพิกานนท์, บรรณาธิการ. งานวิจัยเพื่อรู้งาน ฐานรากของการพัฒนาประเทศไทย ตามปรัชญาเศรษฐกิจพอเพียง เล่มที่ 1 : การวิจัยเพื่อรู้งานเพื่อพัฒนาสุขภาพ. กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย(สกอ); 2551. หน้า 179-95.
8. Cremers S, Pillai G, Papapoulos S. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of bisphosphonates: Use for optimization of intermittent therapy for osteoporosis [review]. *Clin Pharmacokinet.* 2005; 44(6): 551-70.
9. Porras A, Holland S, Gertz B. Pharmacokinetics of alendronate. *Clin Pharmacokinet.* 1999; 36(5): 315-28.
10. Tarcomnicu I, Silvestro L, Rizea Savu S, Gherase A, Dulea C. Development and application of a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry method to determine alendronate in human urine. *J Chromatogr A.* 2007; 1160:21-33.
11. Yun M, Kwon K. High-performance liquid chromatography method for determining alendronate sodium in human plasma by detecting fluorescence: Application to a pharmacokinetic study in humans. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; 40: 168-72.
12. Kline WF, Matuszewski BK. Improved determination of the bisphosphonate alendronate in human plasma and urine by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography with fluorescene and electrochemical detection *J Chromatogr B* 1992; 583(2):83-193.
13. Yun MH, Woo JS, Kwon KI Bioequivalence and pharmacokinetics of 70 mg alendronate sodium tablets by measuring alendronate in plasma *Arch Pharm Res.* 2006; 29 (4):328-32.

14. Rhim SY, Park JH, Park YS, Lee MH, Kim DS, Shaw LM, Yang SC, Kang JS. Bioavailability and bioequivalence of two oral formulations of alendronate sodium 70 mg: An open-label, randomized, two-period crossover comparison in healthy Korean adult male volunteers *Clin Ther* 2009; 31(5): 1037-1045.
15. Lin J. Bisphosphonates: A review of their pharmacokinetic properties (review). *Bone*. 1996; 18(2):75-85.
16. Porras A, Holland S, Gertz B. Pharmacokinetics of alendronate. *Clin Pharmacokinet*. 1999; 36(5): 315-28.
17. Ptacek P, Klima J, Macek J. Determination of alendronate in human urine as 9-fluorenylmethyl derivative by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 2002; 767: 111-16.
18. Kang H, Hwang S, Park J. HPLC method validation and pharmacokinetic study of alendronate sodium in human urine with fluorescence detection. *J Liq Chromatogr Related Technol*. 2006; 29:1589-600.
19. Apostolou C, Dotsikas Y, Kousoulos C, Tsatsou G, Colocouri F, Soumelas G-S, Loukas YL. Application of a semi-automated 96-well format solid-phase extraction, column-switching, fluorescence detection protocol for the determination of alendronate in human urine samples obtained from a bioequivalence study. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 43 (3):1151-55.
20. Kline WF, Matuszewski BK. Improved determination of the bisphosphonate alendronate in human plasma and urine by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography with fluorescence and electrochemical detection *J Chromatogr B* 1992; 583(2):83-193.
21. Merck Sharp & Dohme. 2008. Fosamax Plus™. Available at:
http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/f/fosamax/fosamax_plus_d_pi.pdf. Accessed Sep 5, 2010.
22. Miller PD. 2005 Treatment of osteoporosis in chronic kidney disease and end stage renal disease. *Current Osteoporosis Reports*. 3(1): 5-12.
23. สมชาย เอี่ยมอ่อง, เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์, เกรียง ตั้งส่ง่า และเดลิงศักดิ์ กาญจนบุรย์ (บรรณาธิการ). Clinical Dialysis. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพ: เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น, 2550.
24. Reszka A and Roda G. 2003. Bisphosphonate mechanism of action. *Current Rheumatology Reports*. 5: 65-74.
25. Graham R and Russell G. 2007. Bisphosphonates: Mode of action and pharmacology. *Pediatrics*. 119: S150-S162.
26. Adami S. 2007. Bisphosphonate antifracture efficacy. *Bone*. 41: S8-S15.
27. Roelofs A, Thompson K, Gordon S, and Roger M. 2006. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: Current status. *Clinical Cancer Research*. 12(20): 6222s-6330s.

28. Lovdahl MJ, Pietrzyk DJ. Anion-exchange separation and determination of bisphosphonates and related analytes by post column indirect fluorescence detection. *J Chromatogr A.* 1999; 850(1-2): 143-52.
29. Pérez-Ruiz T, Martínez-Lozano C, García-Martínez MD. A sensitive post-column photochemical derivatization/fluorimetric detection system for HPLC determination of bisphosphonates. *J Chromatogr A.* 2009;1216 (9): 1312-18.
30. Tarcomnicu I, Silvestro L, Rizea Savu S, Gherase A, Dulea C. Development and application of a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry method to determine alendronate in human urine. *J Chromatogr A.* 2007; 1160:21-33.
31. Han YHR., Qin XZ. Determination of alendronate sodium by ion chromatography with refractive index detection. *J Chromatogr A.* 1996; 719(2):345-52.
32. Tsai EW, Ip DP, Brooks MA. Determination of alendronate in pharmaceutical dosage formulations by ion chromatography with conductivity detection. *J Chromatogr A.* 1992; 596(2):217-24.
33. Zacharis CK, Tzanavaras PD. Determination of bisphosphonate active pharmaceutical ingredients in pharmaceutical and biological material: A review of analytical methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2008; 48:483-96.
34. Sparidans RW, den Hartigh J. Chromatographic analysis of bisphosphonates. *Pharm World Sci* 1999; 21:1-10.
35. Flesch G, Tominaga N, Degen P. Improved determination of the bisphosphonate pamidronate disodium in plasma and urine by pre-column derivatization with fluorescamine, high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J Chromatogr B* 1991;568 (1):261-6.
36. Wong JA, Renton KW, Crocker JFS, O'Regan PA, Acott PD. Determination of pamidronate in human whole blood and urine by reversed-phase HPLC with fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* 2004;18(2): 98-101.
37. Sparidans RW, Hartigh JD, Beijnen JH, Vermeij P. Determination of pamidronate in urine by ion-pair liquid chromatography after derivatization with 1-naphthylisothiocyanate. *J Chromatogr B* 1997;696 (1):137-44.
38. Sparidans RW, Hartigh JD, Beijnen JH, Vermeij P. Semi-automatic liquid chromatographic analysis of pamidronate in serum and citrate plasma after derivatization with 1-naphthylisothiocyanate. *J Chromatogr B.* 1998; 705 (2): 331-9.
39. Sparidans RW, Hartigh JD, Cremers S, Beijnen JH, Vermeij P. Semi-automatic liquid chromatographic analysis of pamidronate in urine after derivatization with 1-naphthylisothiocyanate *J Chromatogr B.* 1999; 730 (1):95-9.
40. Lainesse A, Ozalp Y, Wong H, and Alpan RS. 2004. Bioequivalence studies on bisphosphonates: The example of alendronate. *Arzneimittelforschung.* 54(9a): 569-572.

41. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. 2001.
42. Burton ME, Shaw LM, Schentag JJ, and Evan WE. 2006. Applied Pharmacokinetics & Pharmacodynamics: Principles of Therapeutic Drug Monitoring. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 194-195.