

เภสัชจลนศาสตร์ของตำรับยาทาผิวหนังก finasteride ในหนูแรท

นางสาวสุธีรา ภูมิภักดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR) are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

Pharmacokinetics of finasteride topical formulation in rats

Miss Suteera Pumpakdee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacology
Inter-Department of Pharmacology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2018
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ เภสัชจลนศาสตร์ของตำรับยาทาผิวหนึ่ง finasteride ในหนูแรท
โดย นางสาวสุธีรา ภูมิภักดิ์
สาขาวิชา เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุรีย์ เจียรณมงคล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรมบุญ หนูจักร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์สุพิชา วิทย์เลิศปัญญา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุรีย์ เจียรณมงคล)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยนุช วงศ์อนันต์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัทมา ลีวนิช)

สุธีรา ภูมิภักดี : เกสัชจลนศาสตร์ของตำรับยาทาผิวหนัง finasteride ในหนูแรท
(Pharmacokinetics of finasteride topical formulation in rats)

อ.ที่ปรึกษา : รศ. ภญ. ดร.สุรีย์ เจียรณมงคล, 76 หน้า

ยาฟินาสเทอไรด์ (finasteride) เป็นยาในกลุ่ม 5-alpha reductase inhibitor ใช้รักษาโรคผมร่วงทางพันธุกรรมในเพศชาย โดยยาฟินาสเทอไรด์อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงหลายประการได้แก่ การเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ ปริมาณน้ำอสุจิลดลง ดังนั้นควรมีการถูกใช้ในรูปแบบยาทาหนังศีรษะเพื่อลดผลข้างเคียงดังกล่าว โดยการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับยาฟินาสเทอไรด์ในเลือดและในชั้นผิวหนัง หลังการให้ยาความแรง 0.5% ด้วยการทาผิวหนังเพียงครั้งเดียว (single dose) และแบบทาผิวหนังหลายครั้ง (repeated dose) บนพื้นที่ 4 ตารางเซนติเมตรของหนูแรทเพศผู้สายพันธุ์ Sprage-Dawley โดยมีการเก็บพลาสมาและผิวหนังภายใน 24 ชั่วโมง หลังการทายาครั้งสุดท้ายและสกัดยาออกมาเพื่อตรวจวัดระดับยาฟินาสเทอไรด์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ระดับยาฟินาสเทอไรด์ในพลาสมาหลังการให้ยาด้วยการทาผิวหนังเพียงครั้งเดียวมีแนวโน้มการดูดซึมเข้ากระแสเลือดเพิ่มขึ้นตามปริมาตรยาที่ทา โดยเริ่มตรวจพบระดับยาที่เวลา 4 ชั่วโมง หลังทายาในปริมาตร 300 ไมโครลิตร เพียงครั้งเดียว แต่ไม่พบระดับยาในพลาสมาของกลุ่มที่ได้รับยาปริมาตร 75 หรือ 150 ไมโครลิตร นอกจากนี้การทายาซ้ำวันละ 1 ครั้งและทายาซ้ำวันละ 2 ครั้งติดต่อกัน 7 วัน ไม่มีนัยสำคัญต่อระดับยาในพลาสมา ซึ่งเห็นได้ว่ายาฟินาสเทอไรด์ถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดได้น้อยหลังการให้ยาด้วยการทาผิวหนัง สำหรับอัตราส่วนระหว่างระดับยาในผิวหนังและระดับยาในพลาสมาที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังได้รับยาทางปากเพียงครั้งเดียวมีค่าประมาณ 2.6 เท่า โดยพบอัตราส่วนระหว่างระดับยาในผิวหนังบริเวณที่ไม่สัมผัสยา (control sites) และระดับยาในพลาสมาเกินกว่า 2.6 เท่า ในหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยาทางผิวหนังทุกกลุ่ม ทั้งนี้ค่าที่ตรวจพบระดับยาในพลาสมามีความแปรปรวนสูงมาก อย่างไรก็ตามผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ยาฟินาสเทอไรด์สามารถสะสมอยู่ในผิวหนังชั้นหนังแท้ (dermis) และถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้น้อยหลังให้ยาด้วยการทาผิวหนัง ทั้งนี้จำนวนครั้งการทำทั้งการทำซ้ำวันละ 1 ครั้งและการทำซ้ำวันละ 2 ครั้ง อาจไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการดูดซึมยาเข้าสู่กระแสเลือด

สาขาวิชา เกสัชวิทยา

ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก.....

5887271220 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS: FINASTERIDE, PHARMACOKINETICS, ANDROGENETIC ALOPECIA, TOPICAL
ADMINISTRATION

SUTEERA PUMPAKDEE: PHARMACOKINETICS OF FINASTERIDE TOPICAL
FORMULATION IN RATS. ADVISOR: ASSOC. PROF. SUREE JIANMONGKOL, Ph.D.,
76 pp.

Finasteride, a specific inhibitor of 5-alpha reductase, is used for treatment of androgenic alopecia. This drug may cause several side effects such as sexual dysfunction, abnormal ejaculation. Therefore, this drug should be administered topically on scalp. This study was to determine plasma and skin drug levels after single and repeated topical application of 0.5% finasteride solution on 4 cm² skin area of male Sprage-Dawley rats. Plasma and skin were collected within 24 hours after last dose and extracted for finasteride prior to LC-MS/MS determination. The results demonstrated that plasma levels of finasteride after single application was likely to depend on the applied volume. The plasma drug levels were observed 4 h after single applied volume at 300 µl, but not at 75 and 150 µl. In addition, repetitive application either 1 or 2 times daily for 7 days had no significant effect on plasma finasteride levels. Apparently, finasteride was very slightly absorbed into systemic circulation after topical administration. The skin-to-blood ratio at 24 h after oral administration was approximately 2.6. In rats with the topical administration, the skin-to-blood ratio at the “not-applied” skin area (control site) were observed at the values of greater than 2.6 with the high variation of plasma finasteride. Nevertheless, this study suggested that finasteride could retain in the dermis and was poorly absorbed into systemic circulation after topical administration. Topical repetitive administration of finasteride for either 1 or 2 times daily might have no significant systemic effects.

Field of study: Pharmacology

Student's Signature.....

Academic Year: 2018

Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยการให้ความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ เกษัชรหญิง ดร.สุรียีย์ เจียรณ์มงคล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้กรุณาให้กำลังใจ คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ผู้เขียนจึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.ทมนันต์ พุกษะริตานนท์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำ แนวทางการแก้ปัญหา ในงานวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ เกษัชร ดร.ทวีชัย วชิรยณเสถียร และเจ้าหน้าที่หน่วยวิจัยชีวโมเลกุลทาง การแพทย์ อาคารไบโอเทค สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ขอขอบคุณ คุณกาญจนา แข่งคุ่ม และเจ้าหน้าที่สำนักงานส่งเสริมวิชาการ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอดสำหรับงานวิจัยในสัตว์ทดลองเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่บริษัท Pharma Nueva ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือเป็นอย่างดี ด้านการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาของงานวิจัยนี้

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์สุพีชา วิทยเลิศปัญญา ที่กรุณาให้เกียรติเป็นประธาน พร้อมทั้งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยนุช วงศ์อนันต์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัทมา ลีวนิช ที่กรุณาให้เกียรติ เป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ประจำหลักสูตรภาควิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้วิชาความรู้ ตลอดจนจริยธรรมให้แก่ผู้เขียน

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ภาควิชาเภสัชวิทยา สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้ผู้เขียนเสมอมา

ท้ายนี้ขอขอบพระคุณ ครอบครัวของผู้เขียน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และเป็นแรงผลักดันสามารถให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

สุธีรา ภูมิภักดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ค	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ง	ง
กิตติกรรมประกาศ.....จ	จ
สารบัญ.....ฉ	ฉ
สารบัญตาราง.....ญ	ญ
สารบัญรูปภาพ.....ฎ	ฎ
สารบัญแผนภาพ.....ฐ	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....ท	ท
บทที่ 1 บทนำ.....1	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการทำวิจัย.....1	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....2	2
1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย.....3	3
1.5 สมมติฐานของงานวิจัย.....4	4
1.6 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....4	4
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทำวิทยานิพนธ์.....4	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....5	5
2.1 โครงสร้างผิวหนัง การกำเนิดของผมและวงจรชีวิตเส้นผม.....5	5
2.1.1 โครงสร้างผิวหนัง.....5	5
2.1.2 การกำเนิดของผมและวงจรชีวิตเส้นผม.....7	7
2.2 ความแตกต่างของผิวหนังคนและหนูแรท.....8	8
2.3 ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับยาฟินเนสเทอไรด์.....9	9
2.3.1 คุณลักษณะเฉพาะของยาฟินเนสเทอไรด์.....9	9
2.3.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยาฟินเนสเทอไรด์.....9	9

2.3.3	เภสัชจลนศาสตร์ของฟินเนสเทอไรด์.....	10
2.4	ยาฟินเนสเทอไรด์ในการรักษาโรค Androgenetic alopecia.....	11
บทที่ 3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	14
3.1	สารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์ สัตว์ทดลอง.....	14
3.1.1	สารเคมี.....	14
3.1.2	เครื่องมือและอุปกรณ์.....	14
3.1.2.1	เครื่องมือ.....	14
3.1.2.2	อุปกรณ์.....	15
3.1.3	สัตว์ทดลอง.....	16
3.2	รูปแบบงานวิจัย.....	16
3.3	ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม.....	16
3.4	วิธีดำเนินการวิจัย.....	17
3.4.1	การพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างผิวหนังเพื่อวิเคราะห์ปริมาณยาสะสม ในชั้นหนังแท้ (dermis).....	17
3.4.1.1	การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาเพื่อประเมินความลึกของผิวหนังชั้นหนัง กำพวด (epidermis).....	17
3.4.1.2	การศึกษาการจัดผิวหนังชั้นหนังกำพวด (epidermis) ด้วยวิธี Tape stripping.....	17
3.4.2	การศึกษาในสัตว์ทดลอง.....	18
3.4.2.1	การให้ยาครั้งเดียว (single dose).....	18
3.4.2.1.1	การให้ยาครั้งเดียว (single dose) รูปแบบการให้ทางปาก.....	18
3.4.2.1.2	การให้ยาเพียงครั้งเดียว (single dose) รูปแบบการทาผิวหนัง.....	18
3.4.2.2	การให้ยาซ้ำ (repeated dose) รูปแบบการทาผิวหนังซ้ำ.....	19
3.4.2.2.1	การทายาซ้ำทุก 24 ชั่วโมง.....	19
3.4.2.2.2	การทายาซ้ำทุก 12 ชั่วโมง.....	19

3.4.3 การเก็บตัวอย่างเลือดและผิวหนัง.....	20
3.4.3.1 หนูแรทที่ได้รับยาครั้งเดียว (single dose) รูปแบบการให้ทางปากและการทาผิวหนัง.....	20
3.4.3.2 หนูแรทที่ได้รับยาซ้ำ (repeated dose) รูปแบบการทาผิวหนัง.....	20
3.4.4 การเตรียมตัวอย่างพลาสมาและผิวหนังเพื่อตรวจวิเคราะห์.....	21
3.4.4.1 การเตรียมตัวอย่างพลาสมา.....	21
3.4.4.2 การเตรียมตัวอย่างผิวหนัง.....	21
3.4.4.2.1 การขจัดขจัดผิวหนังชั้นหนังกำพวด (epidermis) ด้วยวิธี Tape stripping.....	21
3.4.4.2.2 การสกัดตัวยาพินเนสเทอไรด์ออกจากผิวหนัง ด้วยวิธี Liquid-liquid extraction.....	22
3.5 การวิเคราะห์ระดับยาพินเนสเทอไรด์ในพลาสมาและผิวหนังหนูแรท ด้วยเครื่อง Liquid chromatography-mass spectrometry.....	25
3.5.1 ระบบของเครื่อง LC-MS/MS สำหรับการวิเคราะห์ ระดับยาพินเนสเทอไรด์ในพลาสมา.....	26
3.5.2 ระบบของเครื่อง LC-MS/MS สำหรับการวิเคราะห์ ระดับยาพินเนสเทอไรด์ในผิวหนัง.....	26
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	26
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	27
4.1 การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาเพื่อประเมินความลึกของ ผิวหนังชั้นหนังกำพวด (epidermis)	27
4.2 การศึกษาการขจัดผิวหนังชั้นหนังกำพวด (epidermis) ด้วยวิธี Tape stripping.....	28
4.3 การตรวจรับรองความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาพินเนสเทอไรด์ ในพลาสมาและผิวหนังหนูแรทด้วยเครื่อง LC-MS/MS.....	30
4.3.1 การตรวจรับรองความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาพินเนสเทอไรด์ในพลาสมา 4.3.1.1 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)	30

4.3.1.2 ความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision).....	31
4.3.1.3 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอไรด์ได้ (Lower limit of quantitation, LLOQ)	31
4.3.1.4 สารรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอไรด์ (Matrix effect)	32
4.3.1.5 ค่าการคืนกลับสมบูรณ์ของวิธีวิเคราะห์ (Recovery of extraction).....	32
4.3.1.6 ความคงสภาพของยาฟิแนสเทอไรด์ (Freeze and Thaw stability)	33
4.3.2 การตรวจรับรองความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาฟิแนสเทอไรด์ในผิวหนังหนูแรท	
4.3.2.1 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)	33
4.3.2.2 ความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision)	33
4.3.2.3 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอไรด์ได้ (Lower limit of quantitation, LLOQ)	34
4.3.2.4 สารรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอไรด์ (Matrix effect)	34
4.3.2.5 การคืนกลับสมบูรณ์ของวิธีวิเคราะห์ (Recovery of extraction)	34
4.3.2.6 ความคงสภาพของยาฟิแนสเทอไรด์ (Freeze and Thaw stability).....	35
4.4 การศึกษาระดับยาฟิแนสเทอไรด์ในเลือดและผิวหนังของหนูแรท.....	35
4.4.1 การให้ยาครั้งเดียว (single dose) รูปแบบการให้ทางปาก.....	35
4.4.2 การให้ยาครั้งเดียว (single dose) รูปแบบการทาผิวหนัง.....	37
4.4.3 การให้ยาซ้ำ (repeated dose) รูปแบบการทาผิวหนังซ้ำเปรียบเทียบ ระหว่างทาซ้ำทุก 24 ชั่วโมงหรือ 12 ชั่วโมง ติดต่อกัน 7 วัน.....	42
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	46
บรรณานุกรม.....	50
ภาคผนวก.....	54
ประวัติผู้เขียน.....	76

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ความลึกชั้นหนังกำพวด (epidermis)	27
ตารางที่ 2 ความลึกของผิวหนังชั้นหนังกำพวด (epidermis) ก่อนและหลังทดสอบ tape stripping.....	30
ตารางที่ 3 ระดับยาฟิแนสเทอโรดในตัวอย่างพลาสมาที่เวลาต่างๆ และในผิวหนังหนูแรท ที่ได้รับยาทางปากขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเพียงครั้งเดียว.....	36
ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอโรดในตัวอย่างพลาสมาที่เวลาต่างๆ และผิวหนังหนูแรท ที่ได้รับยาด้วยการทาผิวหนังครั้งเดียว ในปริมาตรยา 75 ไมโครลิตร.....	38
ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอโรดในตัวอย่างพลาสมาที่เวลาต่างๆ และผิวหนังหนูแรท ที่ได้รับยาด้วยการทาผิวหนังครั้งเดียว ในปริมาตรยา 150 ไมโครลิตร.....	39
ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอโรดในตัวอย่างพลาสมาที่เวลาต่างๆ และผิวหนังหนูแรท ที่ได้รับยาด้วยการทาผิวหนังครั้งเดียว ในปริมาตรยา 300 ไมโครลิตร.....	40
ตารางที่ 7 อัตราส่วนระดับยาฟิแนสเทอโรดระหว่างในผิวหนังบริเวณที่ไม่ทายา (control sites) กับในพลาสมาที่เวลาสุดท้ายหลังทายา ของหนูแรทที่ได้รับยาทาเพียงครั้งเดียว ปริมาตร 75, 150 และ 300 ไมโครลิตร.....	41
ตารางที่ 8 ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอโรดในตัวอย่างพลาสมาที่เวลาต่างๆและผิวหนัง หนูแรทที่ได้รับยาด้วยการทาผิวหนังรูปแบบทาช้ำ (repeated dose) ทุก 24 ชั่วโมง ติดต่อกัน 7 วัน รวมจำนวนครั้งการทา 7 ครั้ง.....	43
ตารางที่ 9 ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอโรดในตัวอย่างพลาสมาที่เวลาต่างๆและผิวหนัง หนูแรทที่ได้รับยาด้วยการทาผิวหนังรูปแบบทาช้ำ (repeated dose) ทุก 12 ชั่วโมง ติดต่อกัน 7 วัน รวมจำนวนครั้งการทา 14 ครั้ง.....	44
ตารางที่ 10 อัตราส่วนระดับยาฟิแนสเทอโรดระหว่างในผิวหนังบริเวณที่ไม่ทายา (control sites) กับในพลาสมาที่เวลาสุดท้ายหลังทายา ของหนูแรทที่ได้รับยาทาช้ำทุก 24 ชั่วโมงและ 12 ชั่วโมง ติดต่อกัน 7 วัน ปริมาตรยา 150 ไมโครลิตร.....	45

ตารางที่ 11	ค่าความถูกต้อง (Accuracy) ของการวิเคราะห์สารมาตรฐานฟิแนสเทอโรไต์ในพลาสติก ในช่วงความเข้มข้น 6 ความเข้มข้นของความเป็นเส้นตรง (Linearity)	61
ตารางที่ 12	ค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) ของการวิเคราะห์สารมาตรฐาน ฟิแนสเทอโรไต์ในพลาสติก ภายใต้การทดสอบวันเดียวกัน (Within-run).....	62
ตารางที่ 13	ค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) ของการวิเคราะห์สารมาตรฐาน ฟิแนสเทอโรไต์ในพลาสติก ภายใต้การทดสอบระหว่างวัน (Between-run).....	63
ตารางที่ 14	ค่าความถูกต้อง (Accuracy) และค่าความแม่นยำ (Precision) ของการวิเคราะห์สาร มาตรฐานฟิแนสเทอโรไต์ในพลาสติกที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (LLOQ).....	64
ตารางที่ 15	ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันของสารรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์ (Matrix effect) ความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟิแนสเทอโรไต์ในพลาสติก.....	65
ตารางที่ 16	ค่าการคืนกลับสมบูรณ์ (Recovery of extraction) ของสารมาตรฐานฟิแนสเทอโรไต์ใน พลาสติกที่ผ่านการสกัดด้วยวิธี Liquid-liquid extraction.....	66
ตารางที่ 17	ค่าความถูกต้อง (Accuracy) ของสารมาตรฐานฟิแนสเทอโรไต์ในพลาสติกภายหลัง การแช่แข็ง-ละลาย 0 และ 2 รอบ (Freeze and Thaw stability).....	67
ตารางที่ 18	ค่าความถูกต้อง (Accuracy) ของการวิเคราะห์สารมาตรฐานฟิแนสเทอโรไต์ในผิวหนัง ในช่วงความเข้มข้น 6 ความเข้มข้นของความเป็นเส้นตรง (Linearity)	68
ตารางที่ 19	ค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) ของการวิเคราะห์สารมาตรฐาน ฟิแนสเทอโรไต์ในผิวหนังภายใต้การทดสอบวันเดียวกัน (Within-run).....	69
ตารางที่ 20	ค่าความถูกต้อง (Accuracy) และค่าความแม่นยำ (Precision) ของการวิเคราะห์สาร มาตรฐานฟิแนสเทอโรไต์ในผิวหนังที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (LLOQ).....	70
ตารางที่ 21	ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันของสารรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์ (Matrix effect) ความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟิแนสเทอโรไต์ในผิวหนัง.....	71
ตารางที่ 22	ค่าการคืนกลับสมบูรณ์ (Recovery of extraction) ของสารมาตรฐานฟิแนสเทอโรไต์ใน ผิวหนังที่ผ่านการสกัดด้วยวิธี Liquid-liquid extraction.....	72
ตารางที่ 23	ค่าความถูกต้อง (Accuracy) ของสารมาตรฐานฟิแนสเทอโรไต์ในพลาสติกภายหลัง การแช่แข็ง-ละลาย 0 และ 2 รอบ (Freeze and Thaw stability).....	73

สารบัญรูปร่างภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ชั้นหนังกำพรั้า ชั้นหนังแท้ เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง.....	7
รูปที่ 2 วงจรชีวิตเส้นผม.....	8
รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของยาฟีแนสเทอไรด์.....	9
รูปที่ 4 finasteride และ metabolites.....	11
รูปที่ 5 อุปกรณ์ต้อมน้ำหนักรที่ใช้ในขั้นตอนการทดสอบ Tape stripping เพื่อจัดผิวหนังชั้นหนังกำพรั้า.....	16
รูปที่ 6 ตำแหน่งการทายาฟีแนสเทอไรด์ (FNS site) และตำแหน่งที่ไม่ทายา (control sites).....	19
รูปที่ 7 ลักษณะการย้อมติดสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน กำลังขยาย 10 เท่าของโครงสร้างชั้นผิวหนังหนูปกติ.....	28
รูปที่ 8 ลักษณะการย้อมติดสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน กำลังขยาย 10 เท่าของโครงสร้างชั้นผิวหนัง หนูปกติก่อนทดสอบ และหลังทดสอบ tape stripping จำนวน 1, 2, 3, 4, 5, 10 และ 15 ครั้ง.....	30
รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานของฟีแนสเทอไรด์ในพลาสติกหุ้มหลอด.....	31
รูปที่ 10 โคโรมาโตแกรมของยาฟีแนสเทอไรด์ในพลาสติกหุ้มหลอดที่ความเข้มข้นต่ำสุด (LLOQ).....	32
รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานของฟีแนสเทอไรด์ในผิวหนังหนูปกติ.....	33
รูปที่ 12 โคโรมาโตแกรมของยาฟีแนสเทอไรด์ในผิวหนังที่ความเข้มข้นต่ำสุด (LLOQ).....	34
รูปที่ 13 ค่าเฉลี่ยระดับยาฟีแนสเทอไรด์ในพลาสติกหุ้มหลอดที่ช่วงเวลาต่างๆ หลังให้ยาทางปากเพียงครั้งเดียว.....	37
รูปที่ 14 ลักษณะการย้อมติดสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน กำลังขยาย 10 เท่าของโครงสร้างชั้นผิวหนัง หนูปกติก่อนและหลังการเช็ดด้วย 70% EtOH และน้ำกลั่น ก่อนทำการเก็บตัวอย่างเพื่อป้องกันยาตกค้างอยู่บนผิวชั้นบนสุดและการหลุดลอก ของชั้นหนังกำพรั้า.....	59

สารบัญแผนภาพ

หน้า

แผนภาพที่ 1	รูปแบบการทดลองที่ให้ยาเพียงครั้งเดียว (single dose) ของยารูปแบบการให้ทางปาก และเวลาที่เก็บตัวอย่างเลือดและฉีดยา.....	23
แผนภาพที่ 2	รูปแบบการทดลองที่ให้ยาเพียงครั้งเดียว (single dose) ของยารูปแบบการให้ทางฉีดยา และเวลาที่เก็บตัวอย่างเลือดและฉีดยา.....	24
แผนภาพที่ 3	รูปแบบการทดลองที่ให้ยาซ้ำ (repeated dose) ติดต่อกัน 7 วัน ของยารูปแบบการให้ทางฉีดยาและเวลาที่เก็บตัวอย่างเลือดและฉีดยา.....	25

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AUC _{0-t}	area under the curve from time zero to the last sampling time point
C _{max}	maximal plasma concentration
CO ₂	carbon dioxide
DHT	dihydrotestosterone
EtOH	ethanol
IS	internal standard
LC-MS/MS	liquid chromatography-mass spectrometry
LLE	liquid-liquid extraction
LLOQ	lower limit of quantitation
R ²	correlation coefficient
TBME	<i>tert-Butyl</i> methyl ether
T _{max}	time for peak plasma concentration

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการทำวิจัย

โรคผมร่วงจากพันธุกรรม (Androgenetic alopecia) เป็นโรคผิวหนังเรื้อรังชนิดหนึ่ง พบในกลุ่มเพศชายมากกว่าเพศหญิง ช่วงอายุ 50 ปีขึ้นไป สาเหตุหลักเกิดจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรมร่วมกับอิทธิพลของฮอร์โมน androgen ซึ่งทำให้ลดระยะการเจริญเติบโตของผมและเข้าสู่ระยะเตรียมหลุดร่วงเร็วกว่าปกติ อาการผมร่วงจะเพิ่มขึ้นตามอายุ ส่งผลให้ผู้ป่วยมีศีรษะล้าน สูญเสียความมั่นใจในการเข้าสังคม เกิดความวิตกกังวลและความเครียด (Varothai et al., 2014)

กลไกการร่วงของเส้นผมส่วนหนึ่งเกิดจากเพิ่มขึ้นของฮอร์โมน dihydrotestosterone (DHT) ซึ่งพบได้ที่บริเวณหนังศีรษะ โดย DHT เป็นฮอร์โมนสำคัญที่ทำให้ต่อมรากผม (hair follicles) มีขนาดเล็กลง เป็นผลให้เลือดและสารอาหารมาเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นผม (dermal papilla) ได้น้อยลง ทำให้เกิดการหลุดร่วงของเส้นผมได้ ซึ่ง DHT นั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน testosterone โดยเอนไซม์ 5 α -reductase type 2 (Steiner, 1993) ปัจจุบันยาฟินาสเทอไรด์ (Finasteride) ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาแห่งประเทศสหรัฐอเมริกาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1997 ให้ใช้รักษาโรคผมร่วงจากพันธุกรรมในเพศชาย ซึ่งในการรักษาดังกล่าวจะใช้ยา finasteride รูปแบบรับประทานขนาด 1 มิลลิกรัมต่อวัน ติดต่อกันนาน 3-6 เดือน จึงเห็นผลการหยุดร่วงและพัฒนาการงอกใหม่ของเส้นผม ทั้งนี้เมื่อหยุดรับประทานยาแล้ว ประสิทธิภาพในการรักษาจะหายไป (Blumeyer et al., 2011) กลไกออกฤทธิ์ของยาฟินาสเทอไรด์ ได้แก่ การยับยั้งเอนไซม์ 5 α -reductase type 2 โดยไม่มีผลจับกับ androgen receptor ทำให้ยา finasteride ลดปริมาณฮอร์โมน DHT โดยไม่มีฤทธิ์กระตุ้น androgen receptor ที่รากผม (Libecco and Bergfeld, 2004) ข้อมูลผลข้างเคียงที่พบในการศึกษาทางคลินิกของยาฟินาสเทอไรด์ขนาด 1 มิลลิกรัม เมื่อใช้ต่อเนื่อง 12 เดือน ได้แก่ ความต้องการทางเพศลดลง ปริมาณน้ำอสุจิลดลง (Hirshburg et al., 2016) ดังนั้นนักวิจัยและบริษัทยาต่างๆ จึงได้พัฒนาตำรับยาฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบทาหนังศีรษะขึ้น โดยหวังผลให้การออกฤทธิ์ของยาเป็นแบบเฉพาะที่ ทำให้ระดับ DHT ในชั้นหนังศีรษะลดลง และช่วยลดอาการข้างเคียงทางระบบ systemic ลงเมื่อเปรียบเทียบกับการให้ในรูปแบบ

รับประทาน อย่างไรก็ตามในปัจจุบันในประเทศไทย ยังไม่มีตำรับยาฟินาสเทอไรด์รูปแบบยาทาหนังศีรษะที่ได้รับอนุมัติทะเบียนจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ให้ใช้เป็นยาใช้ภายนอกสำหรับโรค androgenetic alopecia แต่อย่างไรก็ตาม ประกอบกับมีภาคเอกชนในประเทศไทยให้ความสนใจที่จะพัฒนายาฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบยาทาหนังศีรษะ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาผลทางเภสัชจลนศาสตร์และปริมาณยาสะสมที่ชั้นผิวหนังหนุแรกเมื่อให้ยาฟินาสเทอไรด์ทางผิวหนัง โดยเปรียบเทียบกับการให้ยาทางปากเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาทางคลินิกต่อไป

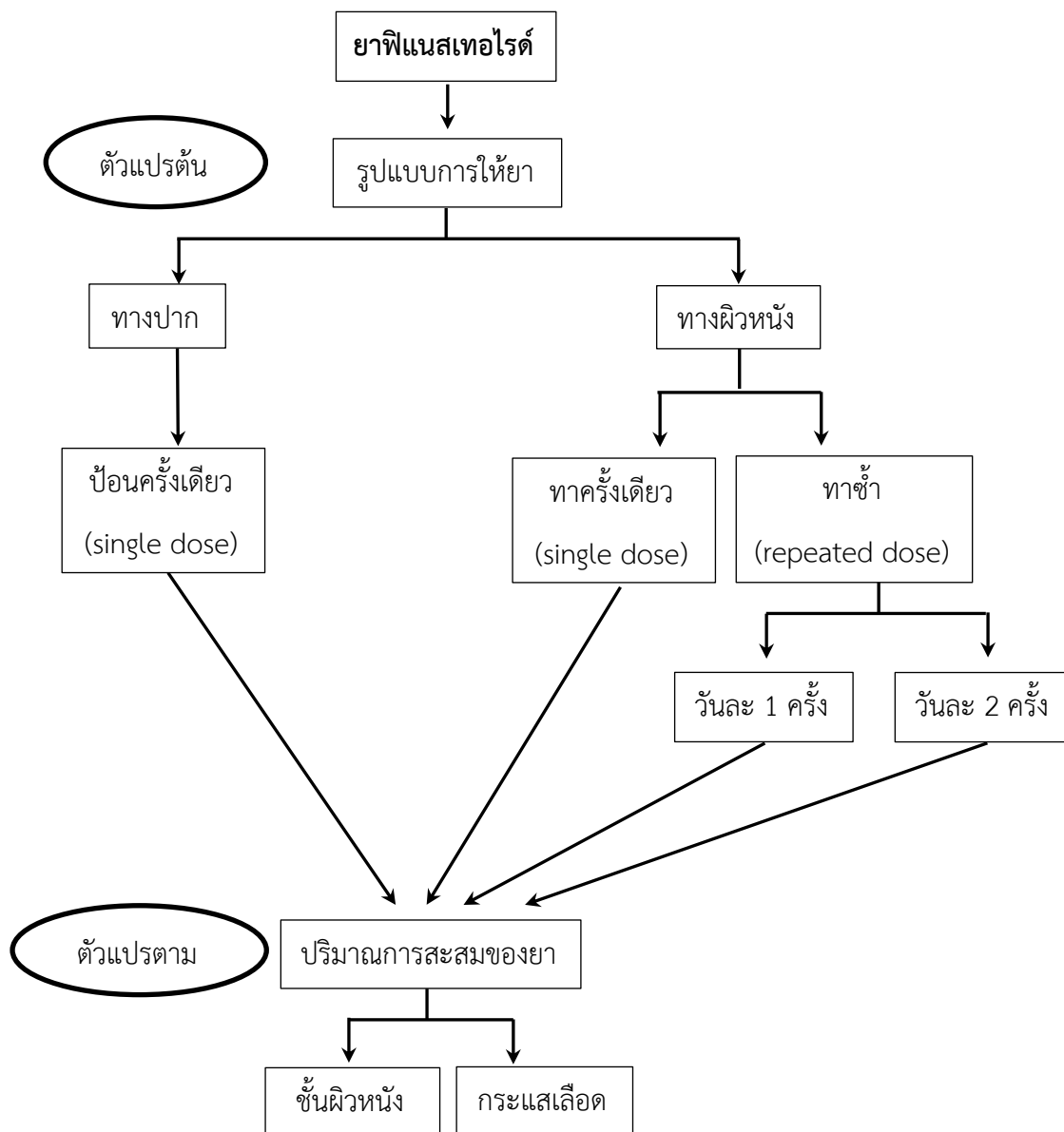
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาระดับยา finasteride ในเลือดและในชั้นผิวหนัง เมื่อให้ยาโดยการทาผิวหนังครั้งเดียว (single dose) และแบบทาผิวหนังหลายครั้ง (repeated dose) โดยเปรียบเทียบกับการให้ทางปากแก่สัตว์ทดลอง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาในหนุแรกเพื่อหาระดับยา finasteride ในเลือดและในชั้นผิวหนัง ทั้ง C_{max} และ T_{max} เมื่อให้โดยการทาผิวหนัง โดยทำการศึกษาทั้งแบบการทาครั้งเดียวและทาซ้ำทุก 24 ชั่วโมงหรือทุก 12 ชั่วโมงติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน

1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย



1.5 สมมติฐานของงานวิจัย

ยาฟินาสเทอไรด์เมื่อให้ในรูปแบบยาทาผิวหนังศีรษะจะถูกดูดซึมและสะสมอยู่ในผิวหนังชั้นหนังแท้ (dermis) ที่มี hair follicles และมีระดับการแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดต่ำ

1.6 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- Finasteride
- Pharmacokinetics
- Androgenetic alopecia
- Topical administration

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทำวิทยานิพนธ์

งานวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลเชิงการดูดซึมของยาฟินาสเทอไรด์ในรูปแบบยาทาผิวหนังที่เข้าสู่กระแสเลือดเมื่อให้ในจำนวนครั้งแตกต่างกัน ซึ่งจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อออกแบบงานวิจัยทางคลินิกที่ต้องการประสิทธิผลในการลดผลข้างเคียงจากรูปแบบรับประทานได้

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างผิวหนัง การกำเนิดของผมและวงจรชีวิตเส้นผม

2.1.1 โครงสร้างผิวหนัง

ผิวหนังแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ที่ปกคลุมอยู่ด้านบน ความหนาของหนังกำพร้าในแต่ละส่วนของร่างกายจะแตกต่างกันไป โดยส่วนของหนังกำพร้าที่มีความหนามากมักเป็นส่วนของผิวหนังที่ถูกใช้งานหนักหรือใช้งานเกือบตลอดเวลา เช่น ผิวหนังบริเวณอุ้งเท้า (footpad) ส่วนชั้นหนังแท้ (dermis or corium) เป็นชั้นผิวหนังที่อยู่ด้านในซึ่งเชื่อมติดกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และอยู่ร่วมกับเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) โดยชั้นหนังแท้บางแห่งจะมีเนื้อเยื่อไขมันแทรกอยู่

- **ชั้นหนังกำพร้า (epidermis)**

ชั้นหนังกำพร้าเป็นส่วนของเนื้อเยื่อบุผิวที่ปกคลุมอยู่ที่ผิวหนังด้านนอกของร่างกาย โดยทั่วไปจะเป็นเนื้อเยื่อของผิวหนังที่เจริญเปลี่ยนแปลงมาจากเนื้อเยื่อชั้นนอก (ectoderm) ของตัวอ่อน ชั้นหนังกำพร้าจัดเป็นเนื้อเยื่อบุผิวชนิดเซลล์รูปร่างแบนตรงกลางป่องที่เรียงตัวซ้อนกันหลายชั้น และเป็นชั้นที่ไม่มีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยง ความหนาของชั้นหนังกำพร้าแตกต่างกันตามส่วนต่างๆของร่างกาย เซลล์ชั้นบนสุดของหนังกำพร้าจะเป็นเซลล์ที่มีลักษณะแห้งและมีการตายเกิดขึ้นตลอดเวลา จึงเกิดการหลุดลอกออกของเซลล์จากผิวหนังของร่างกาย ชั้นหนังกำพร้าเป็นชั้นผิวหนังที่ไม่มีเส้นเลือดและเส้นน้ำเหลืองปรากฏอยู่ โดยสารอาหารที่มาหล่อเลี้ยงเซลล์ในชั้นนี้มาจากการแพร่ผ่านจากชั้นหนังแท้ นอกจากนี้ระหว่างชั้นต่างๆของหนังกำพร้าอาจจะมีส่วนของปลายประสาทรับความรู้สึก (free nerve ending) มาแทรกอยู่ ส่วนประกอบของชั้นหนังกำพร้านับจากชั้นล่างสุดที่ติดกับชั้นหนังแท้มีลำดับ ดังนี้

- **Stratum basale** เป็นชั้นหนังกำพร้าชั้นล่างสุดที่อยู่ติดกับชั้นหนังแท้ โดยเซลล์ในชั้นนี้เป็นเซลล์รูปทรงกระบอก หรือเซลล์รูปลูกบาศก์และมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) ตลอดเวลา โดยเซลล์จะเจริญแล้วพัฒนาเป็นเซลล์ที่อยู่ในชั้นถัดขึ้นไป

- **Stratum spinosum** เซลล์ที่อยู่ในชั้นถัดขึ้นมาจะมีรูปร่างแบนลง และมีเหลี่ยมมุมที่มีส่วนยื่นมาเชื่อมต่อกัน

- **Stratum granulosum** เซลล์ในชั้นนี้รูปร่างแบนและมีนิวเคลียสไม่เด่นชัด เรียงตัวกัน 3-5 ชั้นซ้อนกัน และปรากฏ keratohyalin granules สีม่วงเข้มภายในไซโตพลาสซึม โดย granules เหล่านี้เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้าง keratin

- **Stratum lucidum** เป็นชั้นบางๆที่มีเซลล์รูปร่างแบนจนแทบไม่เห็นไฮโดรพลาสซึมของเซลล์ มีสารที่ทำให้เซลล์ใส ผิวหนังบางส่วนของร่างกายจะไม่มีชั้นนี้ปรากฏ

- **Stratum corneum or cornified layer** เป็นชั้นบนสุดของชั้นหนังกำพวด มีความหนาที่สุด เซลล์จะมีการตายและซ้อนทับกันของเซลล์ที่ตายแล้วจึงทำให้หนาขึ้นเรื่อยๆ การตายของเซลล์เกิดขึ้นจากชั้นเซลล์ที่อยู่ไกลจากชั้นหนังแท้มากกว่าชั้นอื่นๆ จึงไม่ได้รับสารอาหารที่มาหล่อเลี้ยง การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากเซลล์ที่ตายแล้วและทับถมกันอยู่ทางด้านบนจะมีการหลุดลอกออกไปได้ เรียกว่า keratinization หรือ cornification

- **ชั้นหนังแท้ (dermis หรือ corium)**

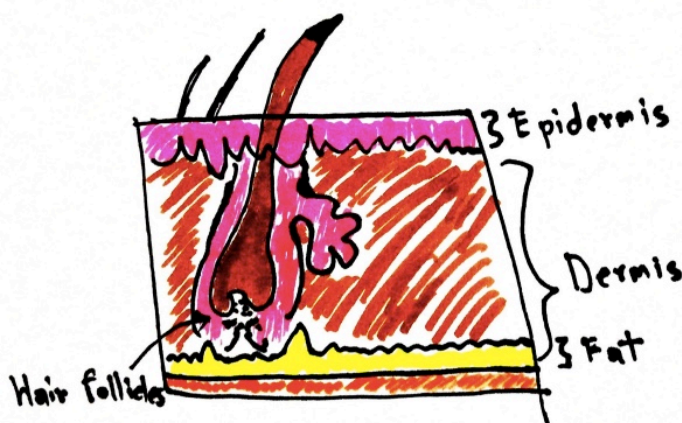
ชั้นล่างสุดของหนังกำพวดจะพัฒนาเป็นแผ่นที่มีลักษณะคล้ายนิ้วมือ ที่ยื่นเข้าไปในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของชั้นหนังแท้ เรียกว่า epidermal pegs ชั้นหนังแท้จะหนากว่าชั้นหนังกำพวด โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชั้นย่อย ได้แก่

- **Papillary layer** อยู่ติดกับชั้นหนังกำพวดชั้นล่างสุด มีลักษณะเป็นคลื่นเว้าเข้าไปในชั้นหนังกำพวดที่สอดรับกับ epidermal บริเวณนี้จะพบปลายเส้นประสาทรับความรู้สึก (sensory nerve fibers) ที่เปลี่ยนแปลงเป็นปลายประสาทรับสัมผัส (Meissners corpuscles) และเส้นเลือดฝอย เส้นน้ำเหลืองได้

- **Reticular layer** เป็นชั้นหนังแท้ที่อยู่ลึกลงไปอยู่ติดกับเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง (subcutaneous tissues) ชั้นนี้จะมีเส้นใยคอลลาเจนวางตัวประสานกันเป็นลักษณะตาข่าย และมีเส้นประสาท เส้นเลือดแดง arterioles ปลายประสาทรับสัมผัส (Paccinian corpuscles) นอกจากนี้ยังมีต่อมเหงื่อ (sweat glands) ส่วนปลายของรากขน (hair papilla) รุกุมขน (hair follicles) ต่อมไขมัน (sebaceous glands) และกล้ามเนื้อผิวหนัง (erector pili muscles) ปรากฏอยู่ด้วย ส่วนของหนังแท้จะพบปลายประสาทของระบบซิมพาเทติกมากระตุ้นการทำงานของเส้นเลือด ต่อม และกล้ามเนื้อเรียบ

- เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง (hypodermis or superficial or subcutaneous tissue)

เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง ได้แก่ เนื้อเยื่อที่แยกส่วนของผิวหนังออกจากกล้ามเนื้อและกระดูก โดยชั้นนี้จะเกี่ยวข้องกับการทำให้ผิวหนังมีการเคลื่อนไหวได้อย่างอิสระไม่ฝืดกักติดง่าย เนื้อเยื่อใต้ผิวหนังจะเป็นตำแหน่งหนึ่งของร่างกายที่ใช้เก็บสะสมไขมันเรียกว่า ไขมันใต้ผิวหนัง



รูปที่ 1 ชั้นหนังกำพร้า ชั้นหนังแท้ เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง ดัดแปลงจาก Frandson และคณะ (2009)

2.1.2 การกำเนิดของผมและวงจรชีวิตเส้นผม

ขนกำเนิดมาจากต่อมขน (hair follicles) ซึ่งเกิดจากชั้นหนังกำพร้าที่เว้าลึกลงไปในชั้นหนังแท้ส่วนโคนของต่อมขนมีลักษณะเป็นกระเปาะ มีชั้นหนังแท้เรียกว่า hair papilla เป็นแกน และมีชั้นหนังกำพร้าหุ้มล้อมรอบเป็นส่วนของ hair matrix รูปร่างของต่อมขนแตกต่างกันไปตามละบริเวณทำให้ขนที่สร้างมีลักษณะต่างกัน

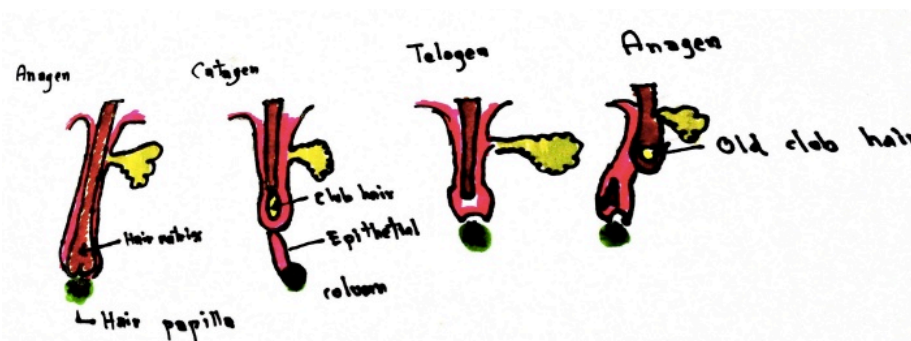
เส้นผมประกอบไปด้วยโครงสร้างหลัก 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่มีชีวิต และส่วนที่ไม่มีชีวิต สำหรับส่วนที่มีชีวิต คือ ส่วนของรากผม ซึ่งฝังตัวอยู่ในต่อมรากผมและเป็นส่วนที่สร้างเซลล์เส้นผม ส่วนที่ไม่มีชีวิต คือส่วนที่เห็นเป็นเส้นผมแผ่ล้นพ้นหนังศีรษะขึ้นมา (hair shaft) ประกอบไปด้วยโปรตีนเป็นหลัก โดยเจริญเติบโตมาจากรากผม (hair root) บนหนังศีรษะ รากผมเป็นส่วนที่ทำให้เส้นผมหลุดร่วง เส้นผมมีการงอกใหม่และหลุดร่วงเป็นวงจรทุกวัน สามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ

- **ระยะเจริญ (anagen)** เส้นผมบนหนังศีรษะทั้งหมดอยู่ในระยะเจริญประมาณร้อยละ 85-90 ในระยะนี้ต่อมรากผมจะสร้างเซลล์เส้นผม ทำให้เส้นผมงอกยาวขึ้น โดยใช้เวลาประมาณ 3-

7 ปี จากนั้นจะเข้าสู่ระยะหยุด (catagen) ซึ่งเป็นระยะที่เส้นผมจะหยุดเจริญเติบโต ดังนั้นหากระยะเจริญ (anagen) ยาวนาน ทำให้ต่อมรากผมผลิตเส้นผมได้นานขึ้น ผมจึงยาวและหนา แต่ถ้าระยะดังกล่าวสั้น เส้นผมก็จะยิ่งเข้าสู่ระยะพักเร็วขึ้น ซึ่งเป็นการร่นระยะเวลาให้เส้นผมยิ่งร่วงเร็ว ผมที่งอกใหม่ก็จะสั้น บางและไม่แข็งแรง จึงทำให้เกิดอาการศีรษะล้านก่อนวัยอันควร

- **ระยะหยุด (catagen)** เป็นระยะเวลาสั้นๆ ประมาณ 2-3 สัปดาห์ แล้วค่อยเข้าสู่ระยะพัก ซึ่งฮอร์โมน DHT มีบทบาทสำคัญในระยะนี้โดย DHT จะกระตุ้นการสังเคราะห์ growth factor เช่น TGF- β 2 และมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เส้นผม ทำให้ปลายรากผมจะเลื่อนตัวสูงขึ้นผิวหนัง เส้นผมจะเจริญช้าลงและค่อยๆ หยุดการเจริญเติบโตในที่สุด (Hibino and Nishiyama, 2004) จำนวนเส้นผมในระยะนี้คิดเป็นร้อยละ 1 ของจำนวนเส้นผมทั้งหมดบนหนังศีรษะ

- **ระยะพัก หรือ ระยะสุดท้าย (telogen)** รากผมในระยะนี้เป็นเซลล์ที่ไม่มีชีวิตแล้ว เส้นผมจะเคลื่อนที่และฝังตัวใกล้กับพื้นผิวหนังเพื่อรอการหลุดร่วง ขณะเดียวกันจะมีผมเส้นใหม่ที่กำลังเริ่มเข้าสู่ระยะเจริญมาดันผมเส้นเก่าที่ตายแล้วหลุดร่วงไป โดยปกติ เส้นผมจะหลุดร่วงประมาณ 70-100 เส้นต่อวัน เส้นผมทั้งหมดบนหนังศีรษะจะมีประมาณร้อยละ 10-15 ที่อยู่ในระยะนี้ และแต่ละเส้นจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 2-3 เดือน การงอกและการหลุดร่วงของเส้นผมเกิดขึ้นเป็นประจำทุกวัน เมื่ออายุมากขึ้น เส้นผมชุดใหม่จะยิ่งบางและมีอายุสั้นลง รวมถึงหลุดร่วงมากกว่าปกติด้วย ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของผมบางที่อาจนำไปสู่ลักษณะของศีรษะล้านได้



รูปที่ 2 วงจรชีวิตเส้นผม ดัดแปลงจาก Justine และคณะ (2002)

2.2 ความแตกต่างของผิวหนังคนและหนูแรท

สำหรับการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมของยาทางผิวหนัง (percutaneous absorption) ที่ต้องการให้ยาออกฤทธิ์เฉพาะที่ผิวหนังในสัตว์ทดลองนั้น หนูแรทมักถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนการศึกษาเพื่อ

นำไปใช้ประโยชน์ต่อคน เนื่องจาก มีลักษณะโครงสร้างผิวหนังและวงจรชีวิตของเส้นผมคล้ายคลึงกับคน (Zendzian, 1989) อย่างไรก็ตาม You และ Maibach (2018) ได้ทำการศึกษาความแตกต่างระหว่างผิวหนังคนและหนูแรท พบว่า ผิวหนังหนูแรทมีชั้นหนังกำพร้า (epidermis) และชั้นหนังแท้ (dermis) บางกว่าของคน แต่มีขนาดต่อมไขมัน (sebaceous glands) จำนวนรูขุมขน (hair follicles) ต่อพื้นที่หนังศีรษะ รวมถึงอัตราการดูดซึมมากกว่าของคนด้วย

2.3 ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับยาฟินเนสเทอไรด์

2.3.1 คุณสมบัติเฉพาะของยาฟินเนสเทอไรด์

สูตรทางเคมี : $C_{23}H_{36}N_2O_2$

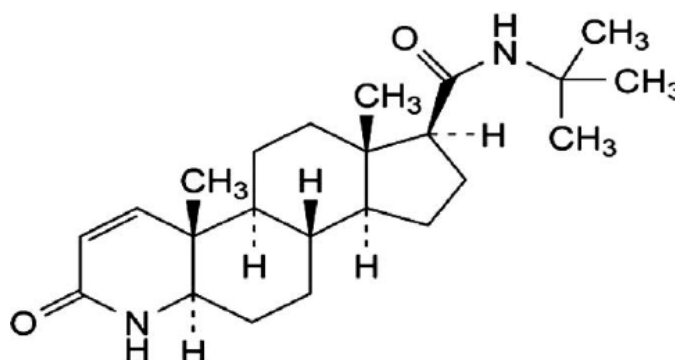
มวลโมเลกุล : 372.553

ลักษณะยา : ผลึกของแข็งสีขาว

จุดหลอมเหลว : 252-254°C

สัมประสิทธิ์การกระจายตัว : 3.03

คุณสมบัติการละลาย : ละลายได้ดีใน chloroform, DMSO, ethanol, methanol, n-propanol ละลายได้น้อยใน hydrogen chloride, sodium hydroxide, water



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างโมเลกุลของยาฟินเนสเทอไรด์ (Gormley, 1997)

2.3.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยาฟินเนสเทอไรด์

ยาฟินเนสเทอไรด์ เป็นยากลุ่ม anti-androgens ออกฤทธิ์ต้านฮอร์โมนเพศชาย androgen ผ่านกลไกยับยั้งเอนไซม์ 5-alpha reductase type 2 ที่พบมากในต่อมลูกหมาก (prostate gland), ต่อม

สร้างน้ำเลี้ยงอสุจิ (seminal vesicles), ถุงเก็บตัวอสุจิ (epididymis) และหนังศีรษะ (scalp) เอนไซม์ 5-alpha reductase type 2 ทำหน้าที่สำคัญในการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมน testosterone เป็น dihydrotestosterone (DHT) ซึ่งสามารถจับกับเซลล์สร้างเส้นผมและลดขนาดต่อมรากผมบริเวณหนังศีรษะ ดังนั้นถ้าบริเวณหนังศีรษะมีปริมาณฮอร์โมน DHT สูง จะมีผลให้เส้นผมเข้าสู่ระยะ telogen ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายของวงจรการเจริญเติบโตเร็วกว่าปกติ โดยเซลล์รากผมในระยะ telogen เป็นเซลล์ที่ไม่มีชีวิต จึงมีผลทำให้เส้นผมเคลื่อนที่และฝังตัวใกล้กับพื้นผิวหนังเพื่อรอการหลุดร่วง จากกลไกดังกล่าวนี้ ยาฟินเนสเทอไรด์จึงถูกนำมาใช้รักษาโรคผมร่วงจากพันธุกรรม (Androgenetic alopecia) โดยมีขนาดที่แนะนำให้รับประทานคือ 1 มิลลิกรัมต่อวัน ยาจะช่วยลดระยะ telogen ของวงจรเส้นผม และทำให้ระยะเวลาของช่วงที่มีการเจริญเติบโต คือ ระยะ anagen เพิ่มขึ้น เป็นผลให้ต่อมรากผมสามารถผลิตเส้นผมได้มากขึ้น (Neste et al., 2000)

2.3.3 เกสัชจลนศาสตร์ของยาฟินเนสเทอไรด์

- การดูดซึมยา (Absorption)

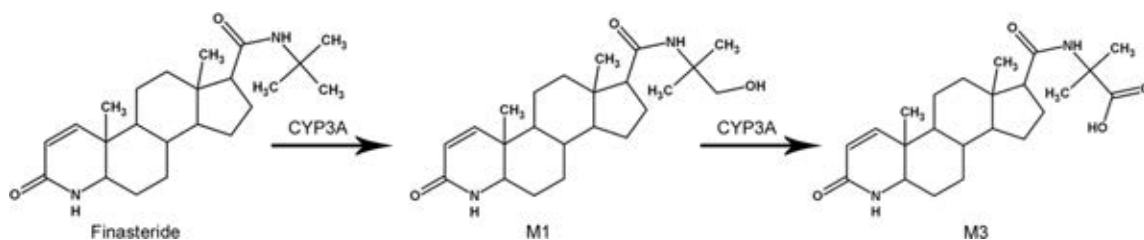
จากการศึกษาในกลุ่มอาสาสมัครเพศชายสุขภาพดี โดยให้ยาฟินเนสเทอไรด์รูปแบบรับประทานขนาด 5, 10, 20, 50 และ 100 มิลลิกรัม ชนิดให้ครั้งเดียว พบระดับความเข้มข้นของยาในพลาสมาสูงสุด คือ 38.1, 81.5, 147.1, 442.0 และ 835.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และช่วงเวลาที่มึระดับความเข้มข้นของยาสูงสุดคือ 1.8 ถึง 2.8 ชั่วโมง สำหรับค่าเฉลี่ยของชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) คือร้อยละ 63 และอาหารไม่มีผลต่อชีวปริมาณออกฤทธิ์ของยา (Ohtawa et al., 1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ในหนูแรทที่ได้รับยาฟินเนสเทอไรด์ทางปากขนาด 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ชนิดให้ครั้งเดียว พบระดับยาในพลาสมาสูงสุด 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และช่วงเวลาที่มึระดับความเข้มข้นของยาสูงสุดคือ 1 ชั่วโมง โดยมีค่าครึ่งชีวิตของยา 1.7 ชั่วโมง (Merck, 1989)

- การกระจายยา (Distribution)

ยาฟินเนสเทอไรด์รูปแบบรับประทาน ขนาด 5 มิลลิกรัม มี volume of distribution (Vd) 76 ลิตร โดยพบการสะสมของยาปริมาณมากที่ต่อมลูกหมาก และยามีความสามารถในการจับกับโปรตีนในเลือดร้อยละ 90 (Ohtawa et al., 1991)

• การเปลี่ยนแปลงและขับยาออกจากร่างกาย (Metabolism and Elimination)

ยาฟินแอสเทอไรด์ถูกเปลี่ยนแปลงได้อย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์ CYP450 (3A4) ที่ตับ ได้เป็นสารเมตาบอไลต์ 2 ชนิด คือ hydroxy finasteride (M1) และ carboxylic acid finasteride (M3) ซึ่งเป็นสาร inactive metabolite การศึกษาในอาสาสมัครเพศชายสุขภาพดี (อายุ 39-53 ปี) จำนวน 6 ราย ที่ได้รับยาฟินแอสเทอไรด์รูปแบบรับประทานขนาด 38 มิลลิกรัม พบว่าปริมาณยาที่ถูกขับออกทางปัสสาวะและอุจจาระในรูปสารเมตาบอไลต์ คือ carboxylic acid finasteride (M3) ร้อยละ 39 และ hydroxy finasteride (M1) ร้อยละ 57 และมีค่าครึ่งชีวิต 5.9 ชั่วโมง (Carlin et al., 1992) ในอาสาสมัครเพศชายสุขภาพดีจำนวน 15 รายที่ได้รับยาฟินแอสเทอไรด์ โดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำ พบอัตราการกำจัดยาเฉลี่ย 165 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมีค่าครึ่งชีวิตของยา 4.5 ชั่วโมง อัตราการกำจัดยาฟินแอสเทอไรด์จะลดลงตามอายุหรือผู้ที่มีการทำงานของไตบกพร่อง นอกจากนี้ไม่พบรายงานการเกิดอันตรกิริยาอย่างที่มีนัยสำคัญทางคลินิกระหว่างยาฟินแอสเทอไรด์ กับยาที่ถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์ CYP450 เช่น antipyrine (Steiner et al., 1993)



รูปที่ 4 finasteride และ metabolites (Carlin et al., 1992)

2.4 ยาฟินแอสเทอไรด์ในการรักษาโรค Androgenetic alopecia

จากรายงานการศึกษาผลทางคลินิกของยาฟินแอสเทอไรด์ในอาสาสมัครเพศชายสุขภาพดี (อายุ 25-38 ปี) ที่ได้รับประทานยาฟินแอสเทอไรด์ 5 มิลลิกรัม ต่อวันอย่างต่อเนื่องนาน 28 วัน พบว่ายาฟินแอสเทอไรด์ทำให้ระดับฮอร์โมน DHT ในอาสาสมัครลดลงจาก 1.1 ± 0.2 นาโนโมลต่อลิตร เป็น 0.15 ± 0.04 นาโนโมลต่อลิตร (Rittmaster et al., 1992) การศึกษาในผู้ป่วยเพศชายโรคผมบางแบบพันธุกรรมจำนวน 1,553 ราย (อายุ 18-41 ปี) ที่ได้รับประทานยาฟินแอสเทอไรด์ 1 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นเวลาติดต่อกัน 2 ปี เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก พบว่า ผู้ป่วยกลุ่มที่รับยาฟินแอสเทอไรด์มีปริมาณเส้นผมเพิ่มขึ้นและระยะเวลาการหลุดร่วงของเส้นผมช้ากว่ากลุ่มที่ได้รับยาหลอก (Kaufman et al., 1998) ทั้งนี้ความสัมพันธ์ระหว่างยาฟินแอสเทอไรด์กับการลดระดับฮอร์โมน DHT ทั้งในเลือดและหนังศีรษะของ

ยาฟินเนสเทอโรลได้ถูกแสดงในการศึกษาการใช้ยานี้ในผู้ป่วยเพศชายจำนวน 249 ราย (อายุ 18-50 ปี) โดยผู้ป่วยได้รับยาในรูปแบบรับประทาน ขนาดยา 0.01-5 มิลลิกรัมต่อวัน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก พบว่า กลุ่มที่ได้รับยาฟินเนสเทอโรลมีระดับ ฮอโรโมน DHT ในเลือดและหนังศีรษะลดลงจากค่าเริ่มต้น คิดเป็นร้อยละ 14.9-69.4 และร้อยละ 49.5-72.2 ตามลำดับ ขึ้นกับความเข้มข้นของยาที่ศึกษา (Drake et al., 1999) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเส้นผม ในผู้ป่วยศีรษะล้าน ด้านหน้าเพศชายจำนวน 326 ราย (อายุ 18-40 ปี) ที่ได้รับยาฟินเนสเทอโรลขนาด 1 มิลลิกรัมต่อวัน อย่างต่อเนื่องระยะเวลา 1 ปี พบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับยามีปริมาณของเส้นผมเพิ่มขึ้นภายใน 2 ปี หลังการศึกษา โดยจะเริ่มเห็นผลการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ 6 เดือนแรกหลังใช้ยา (Leyden et al., 1999) อย่างไรก็ตามการใช้ยาในโรค female androgenetic alopecia ของผู้ป่วยเพศหญิงวัยหมดประจำเดือน จำนวน 137 ราย (อายุ 41-60 ปี) โดยผู้ป่วยได้รับยาฟินเนสเทอโรลขนาด 1 มิลลิกรัมต่อวันอย่างต่อเนื่อง ระยะเวลา 1 ปี พบว่า ยาฟินเนสเทอโรลไม่ให้ผลทางการรักษา (Price et al., 2000)

สำหรับข้อมูลการศึกษาทางคลินิกของผลิตภัณฑ์ฟินเนสเทอโรลรูปแบบยาทาหนังศีรษะที่ถูกพัฒนาขึ้น โดยนักวิจัยกลุ่มต่าง ๆ นั้น ได้มีตัวอย่างรายงานการศึกษาโดย Mazzarella และคณะ (2009) ที่ให้ผู้ป่วยโรค androgenetic alopecia จำนวน 52 ราย (อายุ 18-38 ปี) ใช้ยาฟินเนสเทอโรล ความแรง 0.005% รูปแบบยาทาหนังศีรษะ โดยให้ผู้ป่วยทายาปริมาณ 1 มิลลิลิตร วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 16 เดือน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก พบว่า กลุ่มทดสอบมีจำนวนผมร่วงและพื้นที่ของศีรษะล้านลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก (Mazzarella et al., 2009) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาฟินเนสเทอโรลและผลการลดระดับฮอโรโมน DHT ในผู้ป่วยเพศชายจำนวน 24 ราย ที่ได้รับยาฟินเนสเทอโรล ความแรง 0.25% รูปแบบยาทาหนังศีรษะ โดยทายาปริมาณ 1 มิลลิลิตร วันละ 2 ครั้ง นาน 7 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่รับยารูปแบบรับประทาน ขนาด 1 มิลลิกรัมต่อวัน นาน 7 วัน พบว่า กลุ่มที่ได้รับยาในรูปแบบยาทาหนังศีรษะมีระดับยาในพลาสมาสูงสุด 0.46 ± 0.28 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีระดับฮอโรโมน DHT ในพลาสมาลดลงคิดเป็นร้อยละ 62 ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับยาฟินเนสเทอโรลรูปแบบรับประทาน มีระดับยาในพลาสมาสูงสุด 6.86 ± 1.78 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และมีระดับฮอโรโมน DHT ในพลาสมาลดลงคิดเป็นร้อยละ 68 ทั้งนี้ไม่พบรายงานการเกิดผลข้างเคียงทางคลินิกขึ้นในกลุ่มที่ได้รับยารูปแบบยาทาหนังศีรษะ (Caserini et al., 2014) อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน ยังไม่มีตำรับยาฟินเนสเทอโรลรูปแบบยาทาหนังศีรษะ ที่ได้รับการอนุมัติทะเบียนยาให้ใช้เป็นยาภายนอกสำหรับโรค androgenetic alopecia แต่อย่างใด

การแพร่ผ่านของยารูปแบบทาหนังศีรษะเข้าสู่ชั้นผิวหนังจะขึ้นกับองค์ประกอบในสูตรตำรับยา (Pandey et al., 2014) ดังนั้นสูตรตำรับยาที่แตกต่างกันอาจส่งผลต่อปริมาณยาที่แพร่ผ่านของ ยาฟิแนสเทอไรด์เข้าสู่ชั้นผิวหนังและดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด ดังเช่นตัวอย่างการศึกษาเปรียบเทียบ อัตราส่วนของ propylene glycol ในสูตรตำรับต่อการแพร่ผ่านของฟิแนสเทอไรด์เข้าสู่ชั้นผิวหนังของหนู แรทเพศผู้ โดยทายาฟิแนสเทอไรด์ ความแรง 0.25% ในตำรับยาทาผิวหนังที่มี propylene glycol ในอัตราส่วนต่างๆ พบว่า ระดับความลึกของชั้นผิวหนังที่พบยาฟิแนสเทอไรด์ แปรผันตามอัตราส่วนของ propylene glycol ในสูตรตำรับ ทั้งนี้ความถี่ของการทายาไม่มีผลเพิ่มปริมาณการสะสมของยาใน ระดับชั้นผิวหนัง (Monti et al., 2014) ดังนั้นในการพัฒนาตำรับยาทาผิวหนังฟิแนสเทอไรด์จึงควรมี ข้อมูลพรีคลินิกด้านการดูดซึมยาฟิแนสเทอไรด์เข้าสู่ร่างกายและการสะสมยาฟิแนสเทอไรด์ในบริเวณที่ทา เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาทางคลินิกต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์ สัตว์ทดลอง

3.1.1 สารเคมี

- Finasteride solution ความเข้มข้น 0.5% ได้รับการอนุเคราะห์จากบริษัท สยามฟาร์มาซูติคอลล
- Finasteride-D9 (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Mestanolone (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Sodium chloride, analytical grade (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Sucrose (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Gelatin (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Chromium potassium sulfate (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Hematoxylin & eosin (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Xylene, analytical grade (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Optimal cutting temperature compound (Bio-Optica, Milano, Italy)
- Ethanol, analytical grade (Merk, Darmstadt, Germany)
- Methanol, HPLC grade (Merk, Darmstadt, Germany)
- Acetonitrile, HPLC grade (Merk, Darmstadt, Germany)
- Methyl tert-butyl ether, analytical grade (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Formic acid, HPLC grade (Scharlau, Barcelona, Spain)
- Rat plasma (National laboratory animal center, Nakhon Pathom, Thailand)

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

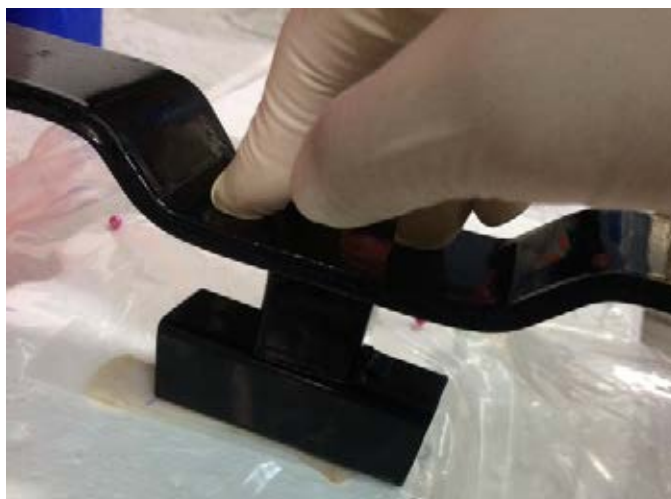
3.1.2.1 เครื่องมือ

- Chromatographic system (Shimadzu, Tokyo, Japan), solvent delivery: LC-20AD, degasser: DGU-20A, system controller: CBM-20A, auto sampler: SIL-20AC, valve unit: FCV-11AL, column oven: CTO-20A

- Mass spectrometer (API4000, AB Sciex, MA, USA)
- Column hypurity C₁₈ 4.0 x 150 mm i.d. 5 μm (Thermo scientific, MA, USA)
- Vortex mixer (G-560E, Scientific industries, NY, USA)
- Centrifuge (5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany)
- CentriVap concentrator (Labconco, MO, USA)
- Deep freezer (VXS490, Jouan, Saint-Herblain, France)
- Refrigerator (MR-F26D, Mitsubishi Electric, Bangkok, Thailand)
- Sonicator (RK1028H, Bandelin electronic, Berlin, Germany)
- Cryostat microtome (CM1800, Leica, Baden-Württemberg, Germany)
- Homogenizer (Glas-col, IN, USA)
- Analytical balance (ME36S, Sartorius, Göttingen, Germany)
- Light microscope (Nikon Eclipse E600, Nikon corporation, Tokyo, Japan)

3.1.2.2 อุปกรณ์

- Potter-Elvehjem PTFE pestle and glass tube working volume 8 mL
(Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Microtome blades s35 (Pfm medical, CA, USA)
- Glass microscope slides (Thomas scientific, NJ, USA)
- Transpore surgical tape (3M™ Transpore™, 3M health care company, MN, USA)
- ตุ่มน้ำหนัก 700 กรัม แสดงตามรูปที่ 5



รูปที่ 5 อุปกรณ์ต้อน้ำหนักที่ใช้ในขั้นตอนการทดสอบ Tape stripping เพื่อขจัดผิวหนังชั้นหนังกำพวด

3.1.3 สัตว์ทดลอง

หนูแรทเพศผู้สายพันธุ์ Sprage-Dawley อายุ 9-10 สัปดาห์ น้ำหนักตัว 350-450 กรัม โดยสัตว์ทดลองได้รับอาหารสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยงหนูและน้ำอย่างเพียงพอต่อความต้องการของสัตว์ในแต่ละวัน สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงสัตว์ใน mini clean room อย่างน้อย 5 วัน เพื่อให้สัตว์ทดลองได้ปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมก่อนการศึกษา โดยห้องเลี้ยงสัตว์จะถูกควบคุมสภาพแวดล้อมให้มีอุณหภูมิ 22 ± 3 องศาเซลเซียส ความชื้น $60 \pm 10\%$ อัตราการระบายอากาศ 15-20 รอบต่อชั่วโมง ระยะเวลาการให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง และมีด 12 ชั่วโมง และความดังของเสียงไม่เกิน 85 เดซิเบล

3.2 รูปแบบงานวิจัย

งานวิจัยเชิงทดลองในสัตว์ทดลอง (*In vivo study*)

3.3 ขอบพิจารณาด้านจริยธรรม

งานวิจัยนี้ได้รับอนุญาตในการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ จากหน่วยวิจัยชีววิทยาโมเลกุลทาง การแพทย์ อาคารไบโอเทค อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งชาติ (Biotech) เลขที่ BT-animal 16/2561 ในส่วนการศึกษาการให้ยาครั้งเดียวแก่สัตว์ทดลอง และ

จากสำนักงานวิจัยและส่งเสริมวิชาการ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ RA2017-49
 ในส่วนการศึกษาการให้ยาฆ่าแกงสัตว์ทดลอง (ภาคผนวก ก)

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 การพัฒนาวิธีเตรียมตัวอย่างผิวหนังเพื่อวิเคราะห์ปริมาณยาสะสม

ในชั้นหนังแท้ (dermis)

3.4.1.1 การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาเพื่อประเมินความลึกของผิวหนังชั้นหนังกำพวด (epidermis) มีขั้นตอนดังนี้

- ตัดชิ้นหนังหนูแรทบริเวณหลัง (dorsal site) ด้วยกรรไกรผ่าตัดจำนวน 5 ชิ้น จากหนูแรท 5 ตัว ให้มีขนาดพื้นที่ชิ้นละ 4 ตารางเซนติเมตร (กว้าง 2 เซนติเมตร ยาว 2 เซนติเมตร)
- แช่ชิ้นหนังหนูแรทเพื่อรักษาสภาพด้วย 4% formalin และ 30% sucrose
- ตัดชิ้นหนังหนูแรทตามแนวขวาง (cross section) ความหนาแผ่นละ 40 ไมโครเมตร ด้วยเครื่อง cryostat microtome (Leica, Baden-Württemberg, Germany) ภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

- ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน และศึกษาโครงสร้างชั้นผิวหนังด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Nikon corporation, Tokyo, Japan) กำลังขยาย 10 เท่า ประเมินความลึกชั้นหนังกำพวด โดยโปรแกรม ImageJ เวอร์ชัน k 1.45 (U.S. National Institutes of Health, MD, USA)

3.4.1.2 การศึกษาการขจัดผิวหนังชั้นหนังกำพวด (epidermis) ด้วยวิธี Tape stripping มีขั้นตอนดังนี้

- ตัดชิ้นหนังหนูแรทบริเวณหลัง (dorsal site) ด้วยกรรไกรผ่าตัดจำนวน 24 ชิ้น ให้มีขนาดพื้นที่ชิ้นละ 2 ตารางเซนติเมตร (กว้าง 1 ซม. ยาว 2 ซม.)
- ทำการปิดด้วย transpore tape (3M™ Transpore™, 3M health care company, MN, USA) ปิดทับบนหนังหนูให้ครอบคลุมพื้นที่ทั้งหมด
- วางตุ้มน้ำหนัก 700 กรัม บนชิ้นหนังหนู นาน 30 วินาที
- ครบเวลา ดึง transpore tape ออก ด้วยแรงดึงสม่ำเสมอ ทำซ้ำตาม 2 ขั้นตอนข้างต้นโดยแบ่งเป็นจำนวนครั้งการทำ tape stripping ดังนี้

- ชุดที่ 1 หนังกู 3 ชั้น ทดสอบ tape stripping ชั้นละ 1 ครั้ง
- ชุดที่ 2 หนังกู 3 ชั้น ทดสอบ tape stripping ชั้นละ 2 ครั้ง
- ชุดที่ 3 หนังกู 3 ชั้น ทดสอบ tape stripping ชั้นละ 3 ครั้ง
- ชุดที่ 4 หนังกู 3 ชั้น ทดสอบ tape stripping ชั้นละ 4 ครั้ง
- ชุดที่ 5 หนังกู 3 ชั้น ทดสอบ tape stripping ชั้นละ 5 ครั้ง
- ชุดที่ 6 หนังกู 3 ชั้น ทดสอบ tape stripping ชั้นละ 10 ครั้ง
- ชุดที่ 7 หนังกู 3 ชั้น ทดสอบ tape stripping ชั้นละ 15 ครั้ง
- แช่ชั้นหนังกูแรทเพื่อรักษาสภาพด้วย 4% formalin และ 30% sucrose
- ตัดชั้นหนังกูแรทตามแนวขวาง (cross section) ความหนาแผ่นละ 40

ไมโครเมตร ด้วยเครื่อง cryostat microtome (Leica, Baden-Württemberg, Germany)

ภายใต้อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส

- ย้อมด้วยสีอีมาทอกซีลินและอีโอซิน และศึกษาโครงสร้างชั้นผิวหนังกูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Nikon corporation, Tokyo, Japan) กำลังขยาย 10 เท่า ประเมินความคงเหลือของชั้นหนังกูภาพโดยใช้โปรแกรม ImageJ เวอร์ชัน k 1.45 (U.S. National Institutes of Health, MD, USA)

3.4.2 การศึกษาในสัตว์ทดลอง

การศึกษาระดับยาพิษในเลือดและผิวหนังกูของหนูกูแรท แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่

3.4.2.1 การให้ยาครั้งเดียว (single dose)

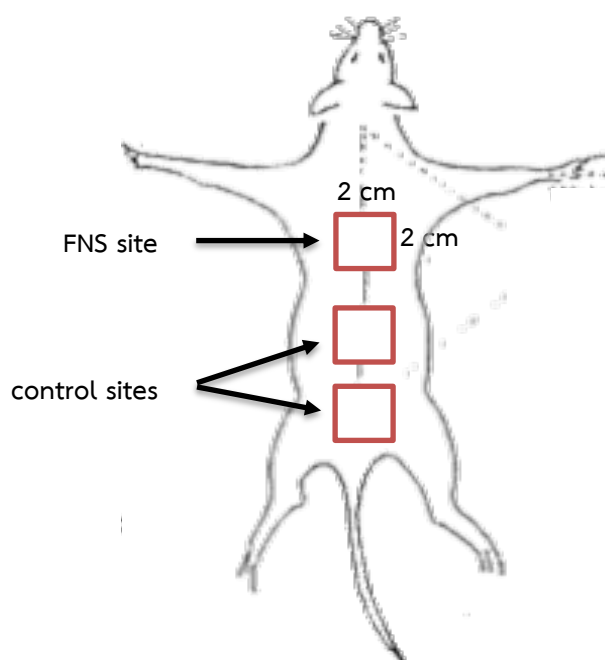
3.4.2.1.1 การให้ยาครั้งเดียว (single dose) รูปแบบการให้ทางปาก

- หนูกูแรทได้รับยาทางปากในขนาด 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ใช้สัตว์ทดลองจำนวน 3 ตัว

3.4.2.1.2 การให้ยาเพียงครั้งเดียว (single dose) รูปแบบการทำผิวหนังกู

- หนูกูแรทจะถูกโกนขนบริเวณหลัง 3 บริเวณ ล้วงหน้า 1 วันก่อนทดสอบ เพื่อเป็นส่วนที่ทายา (FNS site) 1 บริเวณ และส่วนที่ไม่ทายา (control sites) 2 บริเวณ ซึ่งแต่ละบริเวณมีพื้นที่ 4 ตารางเซนติเมตร (กว้าง 2 เซนติเมตร ยาว 2 เซนติเมตร) แสดงตามรูปที่ 6 โดยแบ่ง

สัตว์ทดลองเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว เพื่อทายาฟิแนสเทอไรด์ความแรง 0.5% ปริมาตร 75, 150, 300 ไมโครลิตร และยาจะถูกเกลี่ยให้ทั่วบริเวณพื้นที่ที่กำหนด



รูปที่ 6 ตำแหน่งการทายาฟิแนสเทอไรด์ (FNS site) และตำแหน่งที่ไม่ทายา (control sites)

3.4.2.2 การให้ยาซ้ำ (repeated dose) รูปแบบการทาผิวหนึ่งซ้ำ

- หนูแรทจะถูกโกนขนบริเวณหลัง 3 บริเวณ ล่วงหน้า 1 วันก่อนทดสอบ เพื่อเป็นส่วนที่ทายา (FNS site) 1 บริเวณ และส่วนที่ไม่ทายา (control sites) ซึ่งแต่ละบริเวณมีพื้นที่ 4 ตารางเซนติเมตร (กว้าง 2 เซนติเมตร ยาว 2 เซนติเมตร) แสดงตามรูปที่ 6 เพื่อทายาฟิแนสเทอไรด์ความแรง 0.5% ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และยาจะถูกเกลี่ยให้ทั่วบริเวณพื้นที่ที่กำหนด หลังจากนั้นทำการปิดผิวหนังส่วนทายาด้วยผ้าก๊อซและพันด้วยผ้าพันชนิดยืดหยุ่นได้ (coban) (3M™ Transpore™, 3M health care company, MN, USA) ปิดทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยการทายาจะทาที่ตำแหน่งเดิมทุกครั้ง ในการทายาซ้ำจะมี 2 แบบ ได้แก่

3.4.2.2.1 การทายาซ้ำทุก 24 ชั่วโมง ติดต่อกัน 7 วัน ใช้สัตว์ทดลอง 8 ตัว

3.4.2.2.2 การทายาซ้ำทุก 12 ชั่วโมง ติดต่อกัน 7 วัน ใช้สัตว์ทดลอง 8 ตัว

3.4.3 การเก็บตัวอย่างเลือดและผิวหนัง

3.4.3.1 หนูแรทที่ได้รับยาครั้งเดียว (single dose) รูปแบบการให้ทางปากและการทาผิวหนัง

ตัวอย่างเลือดและผิวหนังจะถูกเก็บตามเวลาที่กำหนด ดังแผนภาพที่ 1 และ 2

- ตัวอย่างเลือด จะถูกเก็บครั้งละ 300 ไมโครลิตร ด้วยการทำให้ catheterization บริเวณ carotid artery และใช้เครื่องเก็บเลือดอัตโนมัติ (CulexNxT™, Basi, IN, USA) ที่เวลา 0 (ก่อนให้ยา) และที่เวลา 6 ชั่วโมง หลังจากการให้ยาครั้งสุดท้ายของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยาด้วยการทาผิวหนัง (n=3) และที่เวลา 1, 2, 4, 6, 10 และ 24 ชั่วโมง หลังจากการให้ยาครั้งสุดท้ายของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยาทางปาก (n=3) และกลุ่มที่ได้รับยาด้วยการทาผิวหนัง (n=4) ตัวอย่างเลือดที่เก็บมาจะถูกแยกส่วนพลาสมาด้วยการปั่นเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเก็บรักษาตัวอย่างพลาสมาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

- ตัวอย่างผิวหนังทั้งส่วนที่ทายาและไม่ทายา (พื้นที่ 4 ตารางเซนติเมตร) จะถูกเก็บตามเวลาที่ระบุด้วยกรรไกรผ่าตัด โดยหลังจาก sacrifice สัตว์ทดลองด้วยการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ผิวหนังบริเวณที่ต้องการเก็บตัวอย่างจะถูกแช่ด้วยสําลึกก่อนกลมที่หยด 70% EtOH 1 มิลลิลิตร 1 ครั้ง แล้วแช่ซ้ำด้วยน้ำกลั่น อีก 1 ครั้ง เพื่อป้องกันยาคั่งค้างอยู่บนผิวชั้นบนสุด (ภาคผนวก ข) ตัวอย่างผิวหนังที่เก็บจะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.3.2 หนูแรทที่ได้รับยาซ้ำ (repeated dose) รูปแบบการทาผิวหนัง

ตัวอย่างเลือดและผิวหนังจะถูกเก็บตามเวลาที่กำหนด ดังแผนภาพที่ 3

- ตัวอย่างเลือด จะถูกเก็บครั้งละ 300 ไมโครลิตร ด้วยการเจาะเก็บจากเส้นเลือดดำด้านข้างที่หาง (lateral tail vein) ที่เวลา 0 (ก่อนให้ยาครั้งแรกและครั้งสุดท้าย) และที่เวลา 1, 3 และ 6 ชั่วโมง หลังจากการให้ยาครั้งสุดท้ายในวันที่ 7 (n=4) และ 1, 3, 6, 10 และ 24 ชั่วโมง หลังจากการให้ยาครั้งสุดท้ายในวันที่ 7 (n=4) ตัวอย่างเลือดที่เก็บมาจะถูกแยกส่วนพลาสมาด้วยการปั่นเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเก็บรักษาตัวอย่างพลาสมาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

- ตัวอย่างผิวหนังทั้งส่วนที่ทายาและไม่ทายา (พื้นที่ 4 ตารางเซนติเมตร) จะถูกเก็บตามเวลาที่ระบุด้วยกรรไกรผ่าตัด โดยหลังจาก sacrifice สัตว์ทดลองด้วยการใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ผิวหนังบริเวณที่ต้องการเก็บตัวอย่างจะถูกแช่ด้วยสําลึกก่อนกลมที่หยด 70% EtOH 1 มิลลิลิตร 1

ครั้ง แล้วฉีดซ้ำด้วยน้ำกลั่น อีก 1 ครั้ง เพื่อป้องกันยาคั่งค้างอยู่บนผิวชั้นบนสุด (ภาคผนวก ข) ตัวอย่างผิวหนังที่เก็บจะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.4 การเตรียมตัวอย่างพลาสมาและผิวหนังเพื่อตรวจวิเคราะห์

3.4.4.1 การเตรียมตัวอย่างพลาสมา

ตัวอย่างพลาสมาที่สกัดออกจากพลาสมาด้วยวิธี liquid-liquid extraction ตามขั้นตอนดังนี้

- ผสมตัวอย่างพลาสมา 80 ไมโครลิตร กับ mesthanolone 10 ไมโครลิตร (internal standard) และ *tert-Butyl methyl ether* (tBME) 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดย vortex เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำสารผสมไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 5,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- จากนั้นเก็บส่วนใสด้านบน (supernatant) ปริมาตรประมาณ 1.9 มิลลิลิตร มาระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- นำชั้นที่แยกอยู่ชั้นล่างมาผสมกับ tBME 4 มิลลิลิตร เพื่อสกัดยาซ้ำตาม 2 ขั้นตอน ข้างต้นอีก 1 ครั้ง
- นำ residue ที่ได้จากการระเหยแห้ง มาเติมสารละลายผสมระหว่าง 0.1% formic acid ในน้ำ และ 0.1% formic acid ใน acetonitrile อัตราส่วน 30:70 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดย vortex เป็นเวลา 1 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

3.4.4.2 การเตรียมตัวอย่างผิวหนัง

การเตรียมตัวอย่างผิวหนัง แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ได้แก่

3.4.4.2.1 การขจัดผิวหนังชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ด้วยวิธี

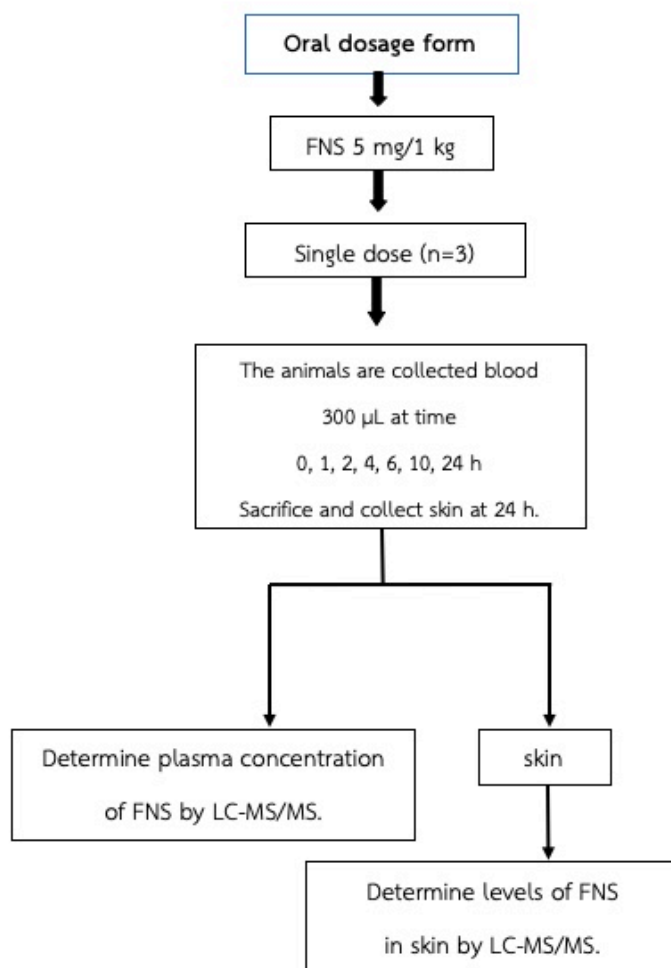
Tape stripping

- นำตัวอย่างผิวหนังที่เก็บมา ตัดแบ่งให้มีขนาดพื้นที่ชั้นละ 2 ตารางเซนติเมตร (กว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 2 เซนติเมตร) ทำการปิดด้วย transpore tape (3M™ Transpore™, 3M health care company, MN, USA) ปิดทับบนหนังหนุให้ครอบคลุมพื้นที่ทั้งหมด

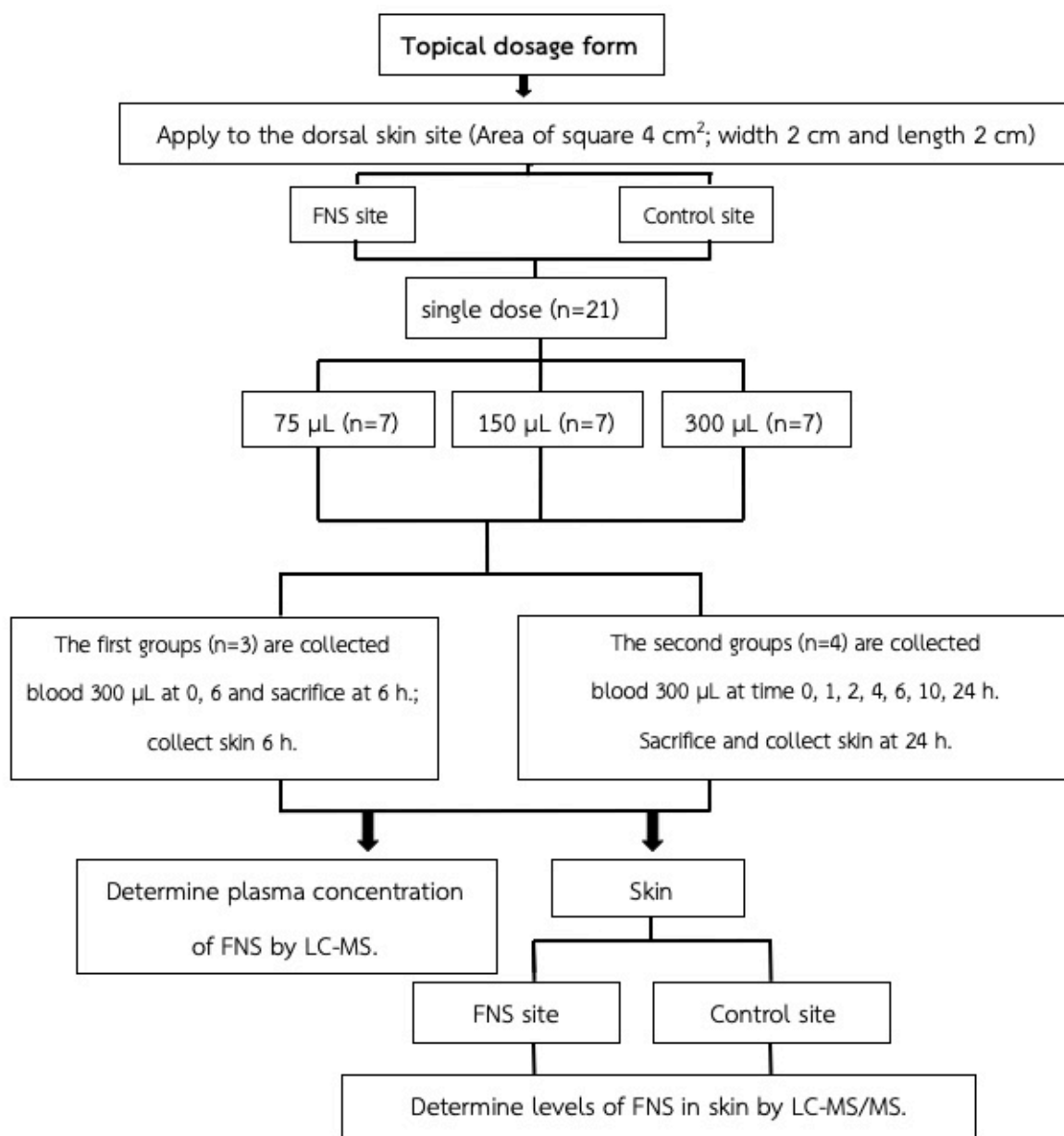
- วางตุ้มน้ำหนัก 700 กรัม บนชั้นหนังหนุ นาน 30 วินาที
- ครบเวลา ดึง transpore tape ออก ด้วยแรงดึงสม่ำเสมอ ทำซ้ำตาม 2 ขั้นตอน ข้างต้นอีก 3 ครั้ง

3.4.4.2.2 การสกัดด้วยยาฟิแนสเทอไรด์ออกจากผิวหนังด้วยวิธี Liquid-liquid extraction มีขั้นตอนดังนี้

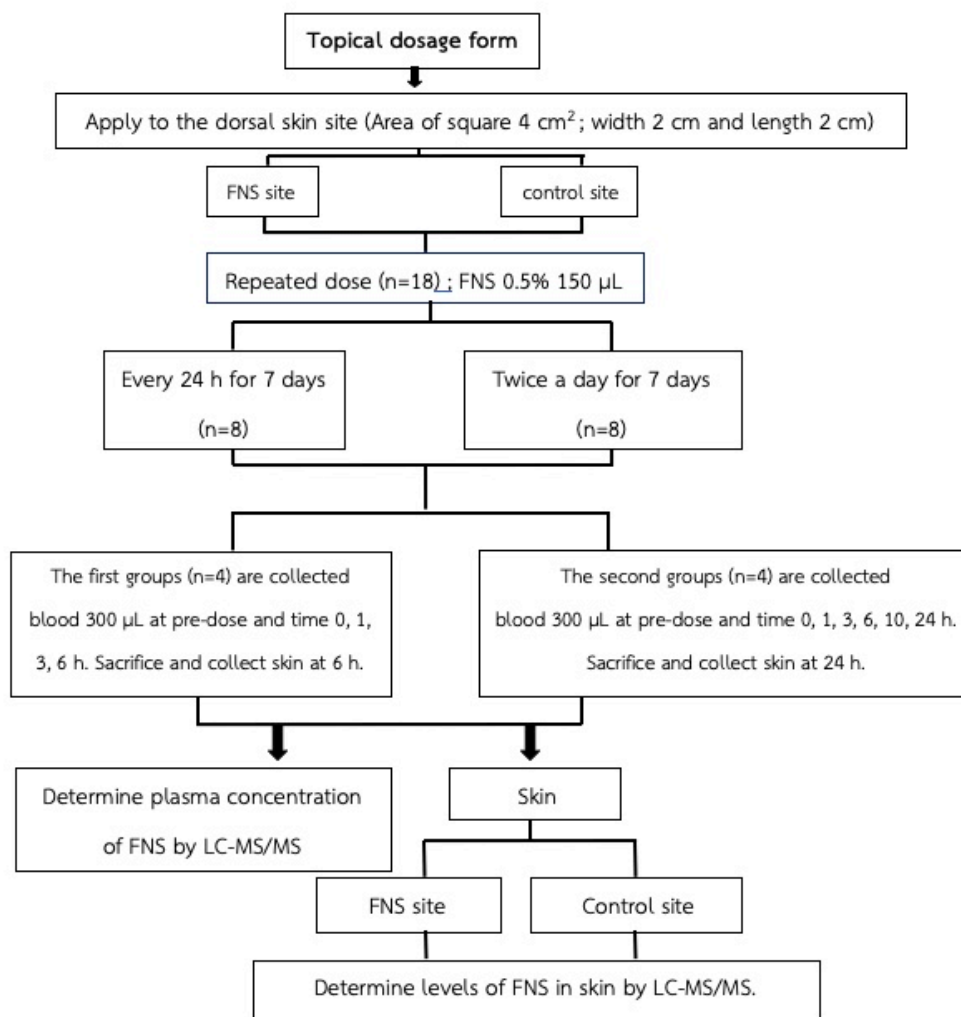
- นำหนังหนุที่ผ่านการทำ tape stripping มาตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อเตรียม 10% skin homogenate โดยนำชั้นหนังหนุบดให้ละเอียดใน 0.9% NaCl ด้วยเครื่อง homogenizer 20 รอบ (น้ำหนักหนังหนุ 350 กรัม ใน 0.9% NaCl 3.5 มิลลิลิตร)
 - ผสม 10% skin homogenate กับ mesthanolone (internal standard) และ tBME แล้วนำสารผสมไปทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 5,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
 - เก็บส่วนใสด้านบน (supernatant) เพื่อนำมาระเหยแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำชั้นที่แยกอยู่ชั้นล่างมาผสมกับ tBME เพื่อสกัดยาซ้ำตามขั้นตอนข้างต้นอีก 1 ครั้ง
 - ละลาย residue ที่ได้จากการระเหยแห้งในสารละลายผสมระหว่าง 0.1% formic acid ในน้ำ และ 0.1% formic acid ใน acetonitrile อัตราส่วน 30:70 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเศษหนังและไขมันจากหนังหนุ เก็บส่วนใสด้านบนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS



แผนภาพที่ 1 รูปแบบการทดลองที่ให้ยาเพียงครั้งเดียว (single dose) ของยาในรูปแบบการให้ทางปาก และเวลาที่เก็บตัวอย่างเลือดและผิวหนัง



แผนภาพที่ 2 รูปแบบการทดลองที่ให้ยาเพียงครั้งเดียว (single dose) ของยาในรูปแบบการให้ทางผิวหนัง และเวลาที่เก็บตัวอย่างเลือดและผิวหนัง



แผนภาพที่ 3 รูปแบบการทดลองที่ให้ยาซ้ำ (repeated dose) ติดต่อกัน 7 วัน ของยาในรูปแบบการให้ทางผิวหนังและเวลาที่เก็บตัวอย่างเลือดและผิวหนัง

3.5 การวิเคราะห์ระดับยาฟิแนสเทอไรด์ในพลาสมาและผิวหนังหนูแรทด้วยเครื่อง Liquid chromatography-mass spectrometry

ปริมาณยาฟิแนสเทอไรด์ที่สกัดได้จากพลาสมาและผิวหนัง ถูกวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ที่ บริษัท ฟาร์มา นูวา จำกัด โดยวิธีวิเคราะห์ของงานวิจัยนี้ได้ผ่านการตรวจรับรองความน่าเชื่อถือตามเกณฑ์เกณฑ์ของ US FDA Guideline ที่ประกอบด้วย ความเป็นเส้นตรง (linearity), ความถูกต้อง (accuracy) และความแม่นยำ (precision), ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นของยาได้ (lower limit of

quantitation, LLOQ), สิ่งรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์ความเข้มข้นของยา (matrix effect), ค่าการคืนกลับสมบูรณ์ของวิธีสกัดยา (recovery of extraction) และความคงสภาพของยา (stability) (ภาคผนวก ค) โดยมีระบบวิเคราะห์ยาฟิแนสเทอไรด์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ดังนี้

3.5.1 ระบบของเครื่อง LC-MS/MS สำหรับการวิเคราะห์ระดับยาฟิแนสเทอไรด์ในพลาสมา

เฟสเคลื่อนที่	: 0.1% formic acid ในน้ำ และ 0.1% formic acid ใน acetonitrile อัตราส่วน 30:70
คอลัมน์	: C ₁₈ ขนาด 4.0 x 150 มิลลิเมตร บรรจุซิลิกา C ₁₈ ขนาด 5 ไมครอน (Hypurity [®] , Thermo scientific, MA, USA)
อุณหภูมิคอลัมน์	: 40 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	: 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาณการฉีดสาร	: 10 ไมโครลิตร

3.5.2 ระบบของเครื่อง LC-MS/MS สำหรับการวิเคราะห์ระดับยาฟิแนสเทอไรด์ในผิวหนัง

เฟสเคลื่อนที่	: 0.1% formic acid ในน้ำ และ 0.1% formic acid ใน acetonitrile อัตราส่วน 30:70
คอลัมน์	: C ₁₈ ขนาด 2.1 x 50 มิลลิเมตร บรรจุซิลิกา C ₁₈ ขนาด 1.7 ไมครอน (Kinetex UPLC [®] , Water, MA, USA)
อุณหภูมิคอลัมน์	: 35 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	: 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาณการฉีดสาร	: 10 ไมโครลิตร

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ C_{max} และ T_{max} ใช้ข้อมูลจริงหาค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน สำหรับค่า AUC_{0-t} คำนวณโดยหลัก trapezoidal rule ระดับยาฟิแนสเทอไรด์ในชั้นผิวหนังของสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่ม จะถูกแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ข้อมูลจะถูกวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้ student's t-test และ One-way ANOVA วิเคราะห์ความแตกต่างรายคู่ด้วย tukey's post hoc test พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P-value น้อยกว่า 0.05 (P < 0.05)

บทที่ 4

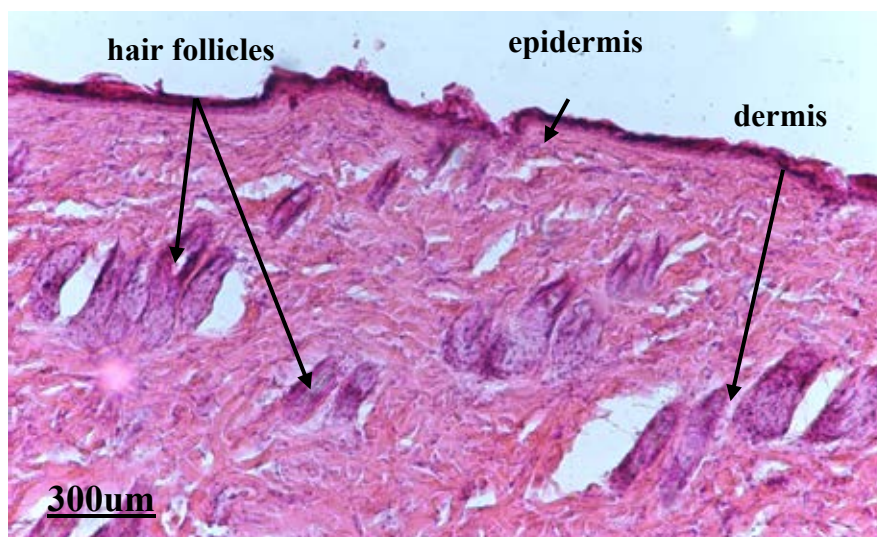
ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาเพื่อประเมินความลึกของผิวหนังชั้นหนังกำพวด (epidermis)

ในการศึกษาเบื้องต้นเพื่อประเมินความลึกของผิวหนังชั้นหนังกำพวด (epidermis) ซึ่งนำไปสู่การพัฒนาวิธีการจัดชั้นหนังกำพวดออกและสามารถวิเคราะห์ระดับยาในชั้นหนังแท้ (dermis) ที่เป็นตำแหน่งออกฤทธิ์ของยาฟิแนสเทอไรด์ พบว่าผิวหนังของหนูแรทตัวผู้ 5 ตัว มีความลึกของชั้นหนังกำพวดเฉลี่ย 37.584 ± 1.79 ไมโครเมตร (ตารางที่ 1) โดยพบต่อมรากผม (hair follicles) อยู่เป็นจำนวนมาก (รูปที่ 7)

ตารางที่ 1 ความลึกชั้นหนังกำพวด (epidermis) (n=5)

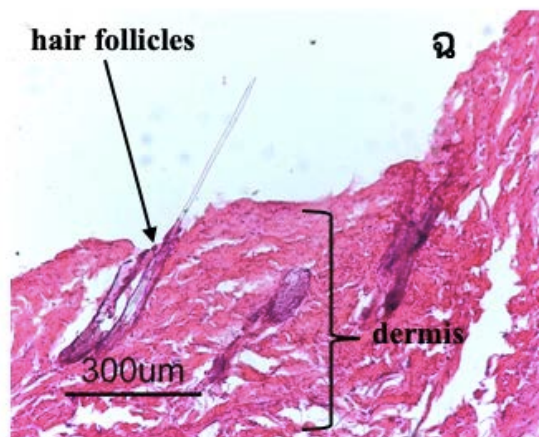
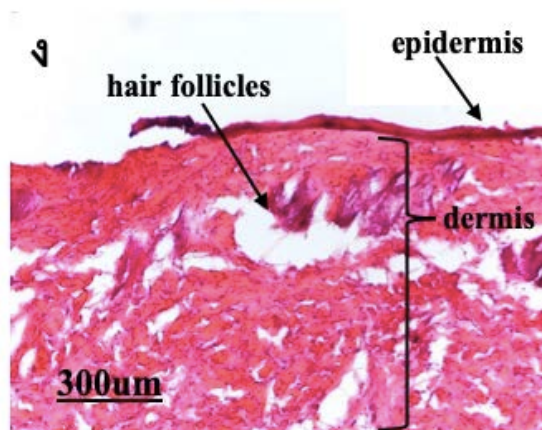
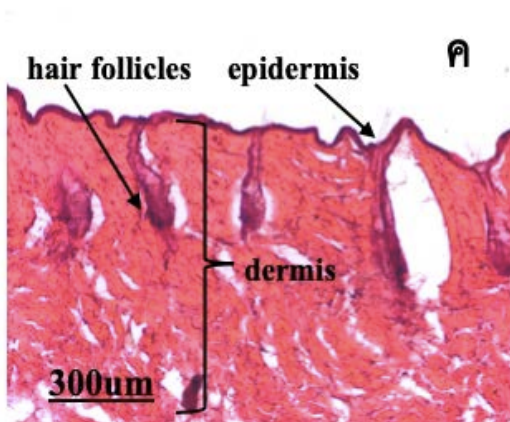
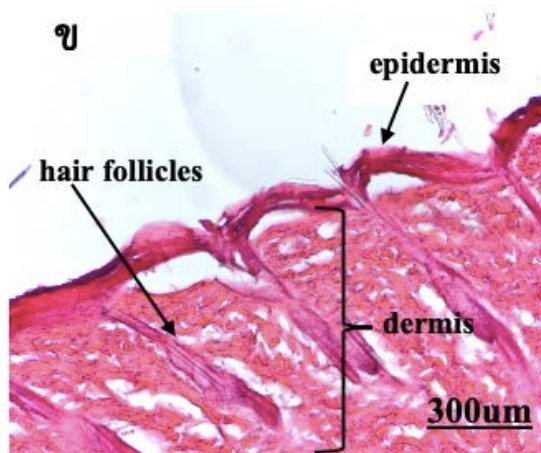
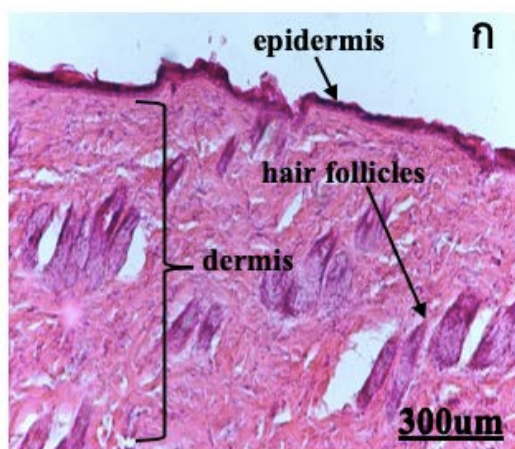
หนูแรท	ความลึกชั้นหนังกำพวด (ไมโครเมตร)
1	38.122
2	39.328
3	37.547
4	38.676
5	34.249
เฉลี่ย	37.584
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	1.79

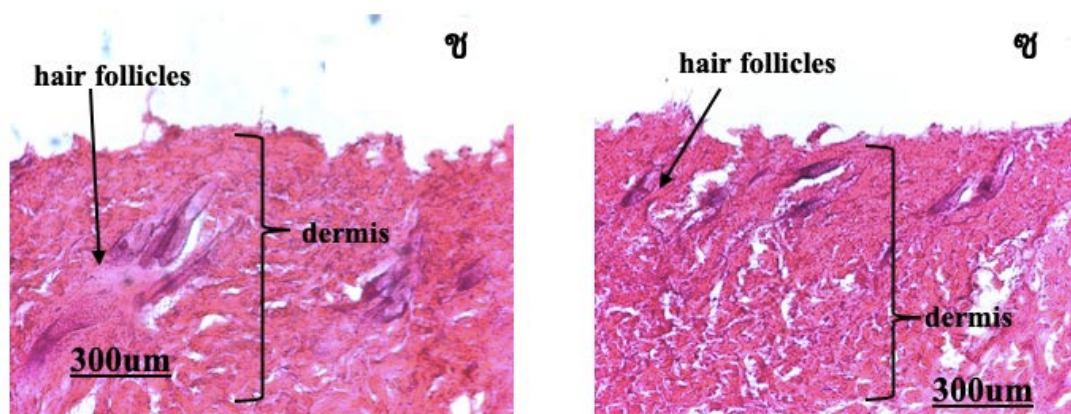


รูปที่ 7 ลักษณะการย้อมติดสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน
กำลังขยาย 10 เท่าของโครงสร้างชั้นผิวหนังหนูปกติ

4.2 การศึกษาการขจัดผิวหนังชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ด้วยวิธี Tape stripping

จากผลการศึกษาริธีขจัดผิวหนังชั้นหนังกำพร้า (epidermis) เพื่อให้เหลือเพียงชั้นหนังแท้ (dermis) ที่มีต่อมรากผมสะสมอยู่ พบว่าการทำ tape stripping จำนวน 4 ครั้ง (รูปที่ 8จ) สามารถขจัดผิวหนังชั้นหนังกำพร้าของหนูแรทออกได้หมด โดยไม่พบการคงเหลือของผิวหนังชั้นหนังกำพร้าเมื่อเปรียบเทียบกับผิวหนังที่ไม่ผ่านการทำ tape stripping (ตารางที่ 2) อีกทั้งไม่มีผลทำให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างของชั้นหนังแท้





รูปที่ 8 ลักษณะการย้อมติดสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน กำลังขยาย 10 เท่าของโครงสร้างชั้นผิวหนังหนูแรทก่อนทดสอบ (รูป ก) และหลังทดสอบ tape stripping จำนวน 1, 2, 3, 4, 5, 10 และ 15 ครั้ง (รูป ข-ช)

ตารางที่ 2 ความลึกของผิวหนังชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ก่อนและหลังทดสอบ tape stripping

จำนวนครั้ง tape stripping	ความลึกชั้นหนังกำพร้า (ไมโครเมตร±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	% การคงเหลือของ ผิวหนังชั้นหนังกำพร้า
0	37.584 ± 1.79	100
1	13.182 ± 3.02	35.07
2	9.173 ± 1.94	24.41
3	7.248 ± 1.19	19.28
4	N/A	N/A
5	N/A	N/A
10	N/A	N/A
15	N/A	N/A

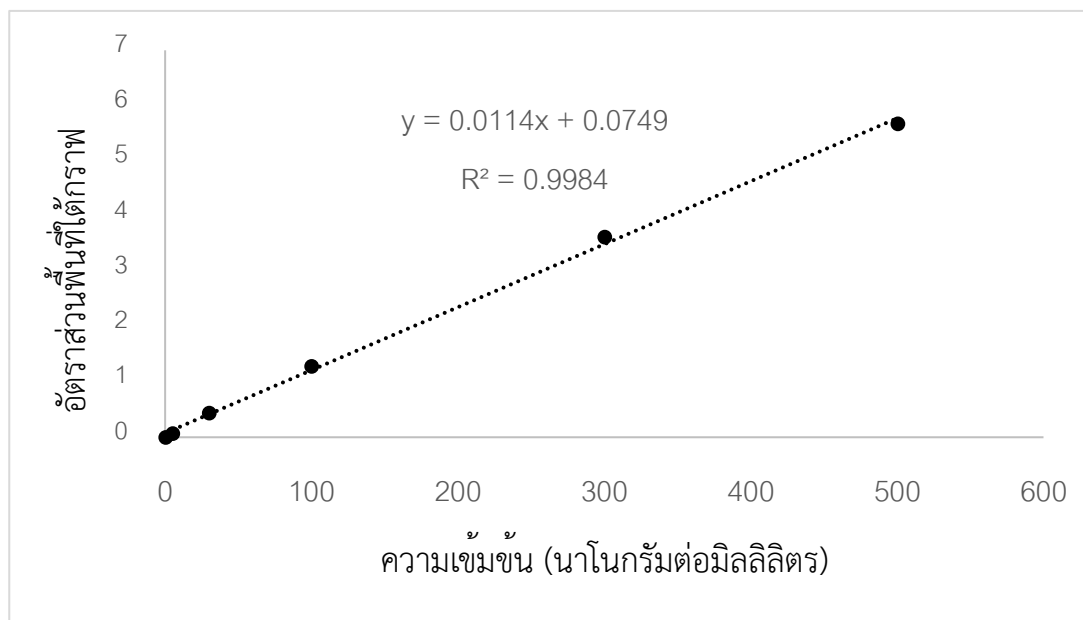
4.3 การตรวจรับรองความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาฟิแนสเทอไรด์ในพลาสมาและผิวหนังหนูแรทด้วยเครื่อง LC-MS/MS

4.3.1 การตรวจรับรองความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาฟิแนสเทอไรด์ในพลาสมา

4.3.1.1 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่ระดับต่างๆของยาฟิแนสเทอไรด์ในพลาสมาหนูแรทกับอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานฟิแนสเทอไรด์ต่อสารมาตรฐานภายใน มี

ความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.1-500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ของเส้นตรงมีค่ามากกว่า 0.99 คือ 0.9984 (รูปที่ 9) และค่าความถูกต้อง (accuracy) ของทุกความเข้มข้นอยู่ในช่วงกำหนดคือ 85-115% ยกเว้นที่ระดับ LLOQ อยู่ในช่วง 80-120%



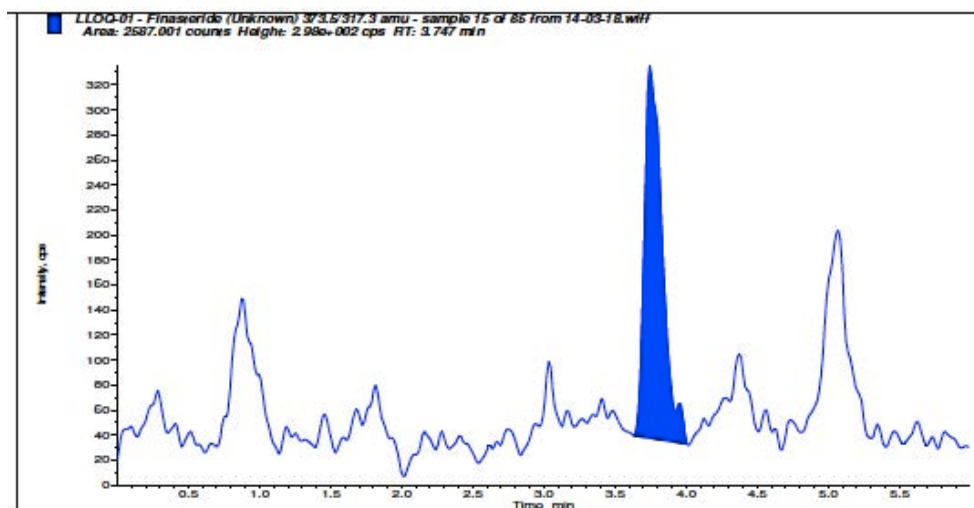
รูปที่ 9 กราฟมาตรฐานของฟิแนสเทอไรด์ในพลาสติกหุ้มยา

4.3.1.2 ความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision)

ความถูกต้องและความแม่นยำของการวัดผลซ้ำภายใต้การทดสอบวันเดียวกัน (Within-run) และระหว่างวัน (Between-run) ของแต่ละชุดควบคุม (QC samples) ทุกความเข้มข้นมีค่าผ่านตามเกณฑ์ตามเกณฑ์ของ US FDA Guideline คือ ค่าความถูกต้อง (accuracy) อยู่ในช่วง 85-115% และค่าความเที่ยงตรง (precision) ไม่เกิน 15% ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ไม่เกิน 20%

4.3.1.3 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอไรด์ได้ (Lower limit of quantitation, LLOQ)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของฟิแนสเทอไรด์ที่วิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS คือ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตัวอย่างโครมาโตแกรมแสดงในรูปที่ 10 โดยมีค่าความถูกต้อง (accuracy) และค่าความเที่ยงตรง (precision) ผ่านตามเกณฑ์ของ US FDA Guideline คือ 80-120% และ ไม่เกิน 20% ตามลำดับ



รูปที่ 10 โครมาโตแกรมของยาฟีแนสเทอไรด์ในพลาสติกที่มีความเข้มข้นต่ำสุด (LLOQ)

4.3.1.4 สารรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์ความเข้มข้นของยาฟีแนสเทอไรด์ (Matrix effect)

ผลของสารรบกวนต่อการวิเคราะห์ความเข้มข้นของฟีแนสเทอไรด์ที่ระดับต่ำ (0.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ระดับสูง (400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ สารมาตรฐานภายใน (Mestanolone) มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันผ่านตามเกณฑ์ของ US FDA Guideline คือ ไม่เกิน 20%

4.3.1.5 ค่าการคืนกลับสมบูรณ์ของวิธีวิเคราะห์ (Recovery of extraction)

ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของฟีแนสเทอไรด์ที่ระดับต่ำ (0.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ระดับกลาง (250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และระดับสูง (400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ผ่านการสกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction โดยเทียบกับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่างชีวภาพที่ไม่ผ่านการสกัด มีค่าการคืนกลับสมบูรณ์ผ่านตามเกณฑ์ของ US FDA Guideline คือ อยู่ในช่วง 85-115%

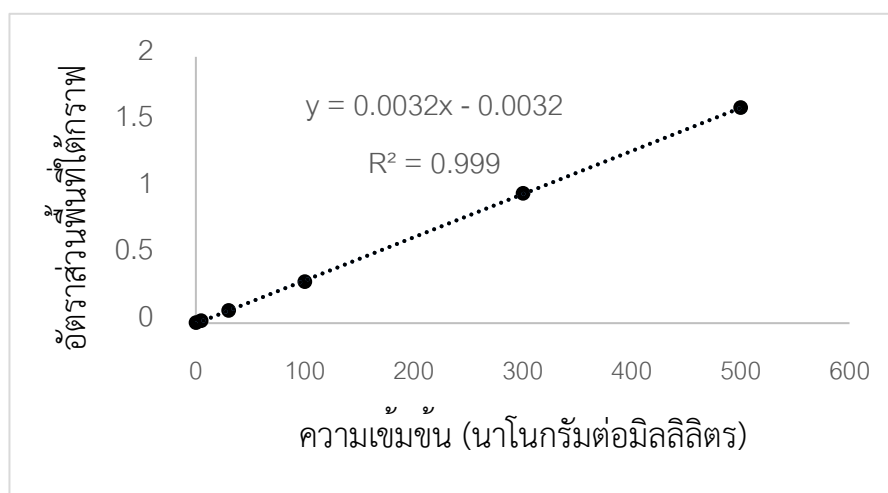
4.3.1.6 ความคงสภาพของยาฟิเนสเทอไรด์ (Freeze and Thaw stability)

ผลการวิเคราะห์ความคงสภาพของยาฟิเนสเทอไรด์ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ (0.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และระดับสูง (400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ภายหลังจากแช่แข็ง-ละลาย 0 และ 2 รอบ มีความถูกต้อง (accuracy) ผ่านตามเกณฑ์ของ US FDA Guideline คือ อยู่ในช่วง 85-115%

4.3.2 การตรวจรับรองความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาฟิเนสเทอไรด์ในผิวหนังหนูแรท

4.3.2.1 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่ระดับต่างๆของยาฟิเนสเทอไรด์ในผิวหนังหนูกับอัตราส่วนพื้นที่ได้โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานฟิเนสเทอไรด์ต่อสารมาตรฐานภายใน มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.1-500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ของเส้นตรงมีค่ามากกว่า 0.99 คือ 0.999 (รูปที่ 11) และค่าความถูกต้อง (accuracy) ของทุกความเข้มข้นอยู่ในช่วงกำหนดคือ 85-115% ยกเว้นที่ระดับ LLOQ อยู่ในช่วง 80-120%



รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานของฟิเนสเทอไรด์ในผิวหนังหนูแรท

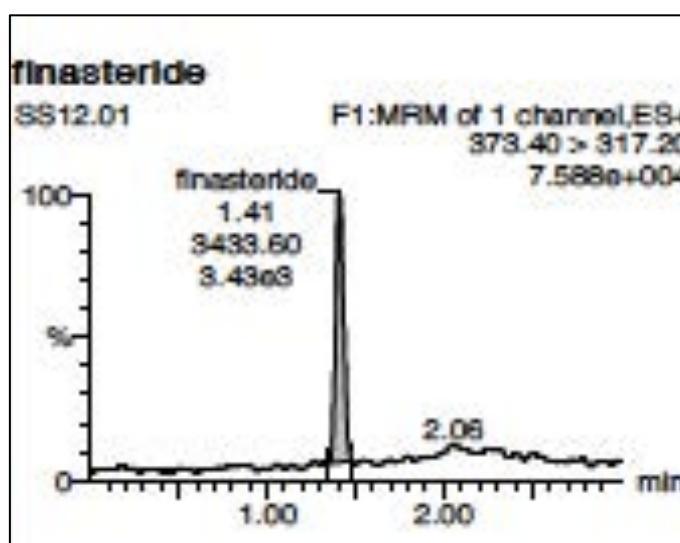
4.3.2.2 ความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision)

ความถูกต้องและความแม่นยำของการวัดผลซ้ำภายใต้การทดสอบวันเดียวกัน (Within-run) และระหว่างวัน (Between-run) ของแต่ละชุดควบคุม (QC samples) ทุกความเข้มข้นมีค่าผ่านตามเกณฑ์ของ US FDA Guideline คือ ค่าความถูกต้อง (accuracy) อยู่ในช่วง 85-115% และค่าความเที่ยงตรง (precision) ไม่เกิน 15% ยกเว้นที่ระดับ LLOQ ไม่เกิน 20%

4.3.2.3 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นของยาฟินาสเทอไรด์ได้

(Lower limit of quantitation, LLOQ)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาฟินาสเทอไรด์ที่วิเคราะห์ได้คือ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตั้งตัวอย่างโครมาโตแกรมแสดงในรูปที่ 12 โดยมีค่าความถูกต้อง (accuracy) และค่าความเที่ยงตรง (precision) ผ่านตามเกณฑ์ของ US FDA Guideline คือ 80-120% และ ไม่เกิน 20% ตามลำดับ



รูปที่ 12 โครมาโตแกรมของยาฟินาสเทอไรด์ในผิวหนังที่ความเข้มข้นต่ำสุด (LLOQ)

4.3.2.4 สารรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์ความเข้มข้นของยาฟินาสเทอไรด์

(Matrix effect)

ผลของสารรบกวนต่อการวิเคราะห์ความเข้มข้นของยาฟินาสเทอไรด์ที่ระดับต่ำ (0.3 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร) ระดับสูง (400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ สารมาตรฐานภายใน (Finasteride-D9) มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันผ่านตามเกณฑ์ของ US FDA Guideline คือ ไม่เกิน 20%

4.3.2.5 ค่าการคืนกลับสมบูรณ์ของวิธีวิเคราะห์ (Recovery of extraction)

ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของยาฟินาสเทอไรด์ที่ระดับต่ำ (0.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ระดับกลาง (250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และระดับสูง (400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ผ่านการสกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction โดยเทียบกับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง

ชีวภาพที่ไม่ผ่านการสกัด มีค่าการคืนกลับสมบูรณ์ผ่านตามเกณฑ์ของ US FDA Guideline คือ อยู่ในช่วง 85-115%

4.3.2.6 ความคงสภาพของยาพืแอสเทอไรด์ (Freeze and Thaw stability)

ผลการวิเคราะห์ความคงสภาพของยาพืแอสเทอไรด์ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ (0.3 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร) และระดับสูง (400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ภายหลังจากแช่แข็ง-ละลาย 0 และ 2 รอบ มีค่าความถูกต้อง (accuracy) ผ่านตามเกณฑ์ของ US FDA Guideline คือ อยู่ในช่วง 85-115%

4.4 การศึกษาระดับยาพืแอสเทอไรด์ในเลือดและผิวหนังของหนูแรท

4.4.1 การให้ยาครั้งเดียว (single dose) รูปแบบการให้ทางปาก

ผลการศึกษาระดับยาพืแอสเทอไรด์ในพลาสมาหนูแรท 3 ตัว ที่ได้รับยาทางปาก ขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพียงครั้งเดียว ที่เวลา 0 คือ ก่อนให้ยาและที่เวลา 1, 2, 4, 6, 10, 24 ชั่วโมงหลังให้ยา (ตารางที่ 3) และกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยระดับยาพืแอสเทอไรด์ในพลาสมา กับช่วงเวลาต่างๆ (รูปที่ 13) พบว่า ระดับยาพืแอสเทอไรด์ในพลาสมาหนูแรทสูงสุดที่เวลา 6 ชั่วโมง (T_{max}) หลังได้รับยา โดยมีค่าความเข้มข้น (C_{max}) เฉลี่ยอยู่ที่ 414.263 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า AUC_{0-t} คือ 3771.733 ± 577.899 นาโนกรัมนาที่ต่อมิลลิลิตร สำหรับความเข้มข้นของยาในผิวหนัง พบว่า มีค่าเฉลี่ย 13.527 นาโนกรัมต่อกรัม ซึ่งมีค่าสูงกว่าระดับยาในพลาสมาที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยเฉลี่ย 2.6 เท่า

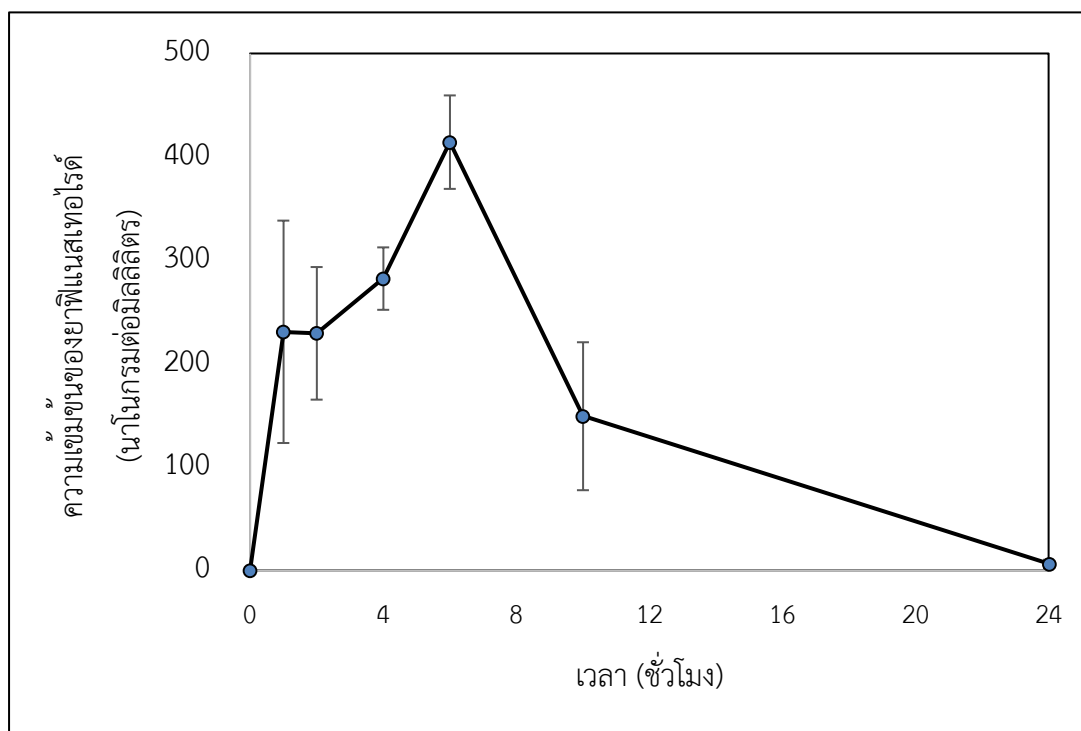
ตารางที่ 3 ระดับยาฟิแนสเทอไรด์ในตัวอย่างพลาสมาที่เวลาต่างๆ และในฝิวหนังหนูแรท
ที่ได้รับยาทางปากขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเพียงครั้งเดียว

หนูแรท	ระดับยาฟิแนสเทอไรด์ในพลาสมา (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)							ระดับยาใน ฝิวหนังที่เวลา 24 ชม หลังรับยาทาง ปาก (นาโนกรัมต่อกรัม)
	เวลา (ชั่วโมง)							
	0	1	2	4	6	10	24	
1	0	110.202	159.942	290.811	383.61	87.64	7.896	16.015
2	0	265.835	241.989	248.848	393.009	132.482	1.945	7.679
3	0	316.602	286.328	307.437	466.17	227.747	9.701	16.888
mean	0	230.879	229.419	282.365	414.263	149.289	6.514	13.527
SD	0	107.548	64.124	30.194	45.198	71.55	4.058	5.083

หมายเหตุ

(1) ความเข้มข้นต่ำสุดของยาฟิแนสเทอไรด์ที่สามารถวิเคราะห์ได้

(LLOQ) คือ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 13 ค่าเฉลี่ยระดับยาพิแนสเทอไรด์ในพลาสมาหนูแรทที่ช่วงเวลาต่างๆ
หลังให้ยาทางปากเพียงครั้งเดียว

4.4.2 การให้ยาครั้งเดียว (single dose) รูปแบบการทาผิวหนัง

ผลการศึกษาระดับยาพิแนสเทอไรด์ในพลาสมาหนูแรท 21 ตัว ที่ได้รับยาทางผิวหนังความแรง 0.5% ปริมาตรยา 75, 150 และ 300 ไมโครลิตร บริเวณหลังหนูแรทพื้นที่ 4 ตารางเซนติเมตร (กว้าง 2 เซนติเมตร ยาว 2 เซนติเมตร) เพียงครั้งเดียว โดยศึกษาที่เวลา 0 คือ ก่อนทายาและที่เวลา 1, 2, 4, 6, 10, 24 ชั่วโมงหลังทายา และเก็บตัวอย่างผิวหนังบริเวณที่ทายาและที่ไม่ได้ทายา ที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาส่วนใหญ่ไม่พบระดับยาพิแนสเทอไรด์ในพลาสมาของหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยาทา ปริมาตร 75 และ 150 ไมโครลิตร (ตารางที่ 4 และ 5) และค่าที่ได้ในหนูแรทแต่ละตัวของกลุ่มทดสอบ กลุ่มเดียวกัน มีความแปรปรวนสูงจึงไม่สามารถนำผลการศึกษามาคำนวณค่าเฉลี่ยได้ ขณะที่หนูแรทกลุ่มที่ได้รับยาปริมาตร 300 ไมโครลิตร มีแนวโน้มที่จะเริ่มถูกตรวจพบระดับยาพิแนสเทอไรด์ตั้งแต่วันที่ 4 ชั่วโมง โดยมีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นยาพิแนสเทอไรด์ในพลาสมาที่เวลา 4, 6 และ 10 ชั่วโมง หลังทายา คือ

0.272 ± 0.104 , 0.233 ± 0.079 , และ 0.278 ± 0.180 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ($n = 4$) (ตารางที่ 6)

ผลการศึกษาระดับยาฟิแนสเทอโรดในผิวหนังหนูแรท พบระดับยาบริเวณที่ทายาในผิวหนังชั้นหนังแท้ (dermis) ในปริมาณสูงทุกกลุ่มทดสอบและไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาที่ตรวจพบกับปริมาตรที่มีการทายาเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4, 5 และ 6) สำหรับผิวหนังบริเวณที่ไม่ทายา (control sites) พบว่า สามารถตรวจพบปริมาณยาฟิแนสเทอโรดได้เช่นกันแต่มีปริมาณน้อยกว่าผิวหนังบริเวณที่ทายา อย่างไรก็ตามผลที่ได้ความแปรปรวนสูงในทุกกลุ่มทดสอบทั้งนี้การตรวจพบยาบริเวณผิวหนังที่ไม่ทายาแสดงให้เห็นว่า ยาถูกดูดซึมเข้าสู่ผิวหนังบริเวณทายาถึงระดับชั้นหนังแท้ (dermis) เข้าสู่กระแสเลือดและมีการกระจายของยาจากกระแสเลือดไปสู่ผิวหนังบริเวณอื่นๆที่ไม่ได้ทายา เมื่อคำนวณอัตราส่วนระหว่างระดับยาบริเวณผิวหนังที่ไม่ทายากับระดับยาในพลาสมาที่เวลาสุดท้ายก่อนเก็บตัวอย่างผิวหนัง คือ 6 หรือ 24 ชั่วโมง หลังทายา พบว่าอยู่ในช่วง 10.89-164.94 เท่า (ตารางที่ 7) ซึ่งค่าที่ได้สูงกว่าค่าอัตราส่วนที่คำนวณได้จากการให้ยาทางปาก (2.6 เท่า) ในทุกกลุ่มทดสอบ

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอโรดในตัวอย่างพลาสมาที่เวลาต่างๆและผิวหนังหนูแรทที่ได้รับยาด้วยการทาผิวหนังครั้งเดียวในปริมาตรยา 75 ไมโครลิตร

หนูแรท	ระดับยาฟิแนสเทอโรดในพลาสมา (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)							ระดับยาในผิวหนังบริเวณทายา ที่เวลา สุดท้ายหลังทายา (นาโนกรัมต่อกรัม)
	เวลา (ชั่วโมง)							
	0	1	2	4	6	10	24	
1	0				0.445			3430 ^a
2	0				0.414			5140 ^a
3	0				<0.1			5130 ^a
4	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.766	44250 ^b
5	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.213	20605 ^b
6	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	20425 ^b
7	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	6501.235 ^b

หมายเหตุ

- (1) ความเข้มข้นต่ำสุดของยาฟิแนสเทอไรด์ที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LLOQ) คือ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
- (2) a คือ เก็บตัวอย่างผิวหนังที่เวลา 6 ชั่วโมง หลังทายา และ b คือ เก็บตัวอย่างผิวหนังที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังทายา

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอไรด์ในตัวอย่างพลาสมาที่เวลาต่างๆและผิวหนังหนูแรทที่ได้รับยาด้วยการทาผิวหนังครั้งเดียวในปริมาตรยา 150 ไมโครลิตร

หนูแรท	ระดับยาฟิแนสเทอไรด์ในพลาสมา (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)							ระดับยาในผิวหนังบริเวณ ทายา ที่เวลาสุดท้าย หลังทายา (นาโนกรัมต่อกรัม)
	เวลา (ชั่วโมง)							
	0	1	2	4	6	10	24	
1	0				8.411			86730 ^a
2	0				2.001			195560 ^a
3	0				3.426			265840 ^a
4	0	1.948	1.991	1.025	0.675	0.249	0.983	60160 ^b
5	0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	46420 ^b
6	0	<0.1	<0.1	<0.1	0.184	0.531	12.621	2789305 ^b
7	0	<0.1	<0.1	<0.1	0.18	0.11	0.463	186335 ^b

หมายเหตุ

- (1) ความเข้มข้นต่ำสุดของยาฟิแนสเทอไรด์ที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LLOQ) คือ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
- (2) a คือ เก็บตัวอย่างผิวหนังที่เวลา 6 ชั่วโมง หลังทายา b คือ เก็บตัวอย่างผิวหนังที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังทายา

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอโรอิดในตัวอย่างพลาสติกที่เวลาต่างๆและผิวหนังหนูแรทที่ได้รับยาด้วยการทาผิวหนังครั้งเดียวในปริมาตรยา 300 ไมโครลิตร

หนูแรท	ระดับยาฟิแนสเทอโรอิดในพลาสติก (นาโนกรัมต่อมิลลิตร)							ระดับยาในผิวหนังบริเวณ ทายา ที่เวลาสุดท้าย หลังทายา (นาโนกรัมต่อกรัม)
	เวลา (ชั่วโมง)							
	0	1	2	4	6	10	24	
1	0				5.619			300980 ^a
2	0				49.116			331310 ^a
3	0				1.596			27295 ^a
4	0	<0.1	0.11	0.355	0.305	0.218	0.811	24045 ^b
5	0	<0.1	0.11	0.355	0.305	0.218	0.811	76350 ^b
6	0	<0.1	<0.1	0.127	0.152	0.541	0.337	12517.5 ^b
7	0	<0.1	<0.1	0.263	0.184	0.135	0.169	70558 ^b

หมายเหตุ

- (1) ความเข้มข้นต่ำสุดของยาฟิแนสเทอโรอิดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LLOQ) คือ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิตร
- (2) a คือ เก็บตัวอย่างผิวหนังที่เวลา 6 ชั่วโมง หลังทายา และ b คือ เก็บตัวอย่างผิวหนังที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังทายา

ตารางที่ 7 อัตราส่วนระดับยาพิแนสเทอโรลระหว่างในผิวน้ำบริเวณที่ไม่ท่ายา (control sites) กับในพลาสติกที่เวลาสุดท้ายหลังท่ายา ของหนูแรทที่ได้รับยาทาเพียงครั้งเดียว ปริมาตร 75, 150 และ 300 ไมโครลิตร

ปริมาตรยา (ไมโครลิตร)	หนูแรท	ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่าง					
		6 ชั่วโมงหลังท่ายา			24 ชั่วโมงหลังท่ายา		
		ระดับยาพิแนสเทอโรล			ระดับยาพิแนสเทอโรล		
		ผิวน้ำส่วน ไม่ท่ายา	พลาสติก	อัตราส่วน	ผิวน้ำส่วน ไม่ท่ายา	พลาสติก	อัตราส่วน
75	1	1.2878	0.445	2.892	-	-	-
	2	3.825	0.414	9.239	-	-	-
	3	0.483	<0.1	n.d	-	-	-
	4	-	-	-	<0.1	0.766	n.d
	5	-	-	-	35.132	0.213	164.939
	6	-	-	-	11.952	<0.1	n.d
	7	-	-	-	1120	<0.1	n.d
150	1	175.163	8.411	20.825	-	-	-
	2	66.184	2.001	33.075	-	-	-
	3	42.553	3.426	20.825	-	-	-
	4	-	-	-	<0.1	0.983	n.d
	5	-	-	-	<0.1	<0.1	n.d
	6	-	-	-	137.557	12.621	10.899
	7	-	-	-	<0.1	0.463	n.d
300	1	325.579	5.619	57.943	-	-	-
	2	780	49.116	n.d	-	-	-
	3	18.397	1.596	11.527	-	-	-
	4	-	-	-	34.489	0.811	42.527
	5	-	-	-	<0.1	0.811	n.d
	6	-	-	-	9.291	0.337	27.57
	7	-	-	-	<0.1	0.169	n.d

หมายเหตุ

- (1) ความเข้มข้นต่ำสุดของยาฟิแนสเทอไรด์ที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LLOQ) คือ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
- (2) n.d, คือ not determined ไม่สามารถนำมาคำนวณเป็นอัตราส่วนได้

4.4.3 การให้ยาซ้ำ (repeated dose) รูปแบบการทาผิวหนังซ้ำเปรียบเทียบระหว่างทาซ้ำทุก 24 ชั่วโมงหรือ 12 ชั่วโมง ติดต่อกัน 7 วัน

จากการศึกษาในระดับยาฟิแนสเทอไรด์ในพลาสมาหนูแรท 16 ตัว ที่ได้รับยาทางผิวหนังความแรง 0.5% ปริมาตรยา 150 ไมโครลิตร ทุก 24 ชั่วโมง รวมจำนวนครั้งการทำ 7 ครั้ง (n=6) เพื่อเปรียบเทียบกับการทำในลักษณะที่ทาทุก 12 ชั่วโมง รวมจำนวนครั้งการทำ 14 ครั้ง (n=8) โดยทาบริเวณหลังหนูแรทพื้นที่ 4 ตารางเซนติเมตร (กว้าง 2 เซนติเมตร ยาว 2 เซนติเมตร) ทั้งนี้ทำการเก็บตัวอย่างพลาสมาที่เวลา 0 (ก่อนทายาครั้งสุดท้าย) และที่เวลา 1, 3, 6, 10, 24 ชั่วโมงหลังทายาครั้งสุดท้าย และเก็บตัวอย่างผิวหนังบริเวณที่ทายาและที่ไม่ได้ทายา ที่เวลา 6 และ 24 ชั่วโมง พบว่า ระดับยาที่เวลา 0 ก่อนให้ยาครั้งสุดท้ายของทุกตัวอย่างในกลุ่มทาซ้ำทุก 12 ชั่วโมง มีค่าใกล้เคียงกับระดับยาที่เวลา 24 โมงหลังให้ยาครั้งสุดท้าย ค่าเฉลี่ย 0.673 ± 0.011 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอาจแสดงถึงระดับยาในพลาสมาเข้าสู่สภาวะคงที่ (steady state) แต่ระดับยาที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 10 ชั่วโมงหลังทายาครั้งสุดท้าย มีความแปรปรวนสูงในทุกกลุ่มจึงไม่สามารถนำมาหาค่าเฉลี่ยได้ นอกจากนี้ยังไม่พบความแตกต่างของระดับยาในพลาสมาของทั้งสองกลุ่ม (ตารางที่ 8 และ 9)

ผลการศึกษาในระดับยาฟิแนสเทอไรด์ในผิวหนังหนูแรท พบว่า กลุ่มทาซ้ำทุก 24 ชั่วโมง พบระดับยาบริเวณที่ทายาในผิวหนังชั้นหนังแท้ (dermis) มีปริมาณมากกว่ากลุ่มทาซ้ำทุก 12 ชั่วโมงประมาณ 2 เท่า (ตารางที่ 8 และ 9) อย่างไรก็ตามมีความแปรปรวนของระดับยาภายในหนูแรทกลุ่มเดียวกัน แต่สำหรับกลุ่มทาซ้ำทุก 12 ชั่วโมง พบระดับยาบริเวณที่ทายาในผิวหนังชั้นหนังแท้ (dermis) ใกล้เคียงกัน ช่วงระหว่าง 10615-29518 นาโนกรัมต่อกรัม นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบปริมาณยาฟิแนสเทอไรด์บริเวณผิวหนังที่ไม่ทายา (control sites) ของหนูแรททั้งสองกลุ่ม แต่มีปริมาณน้อยกว่าผิวหนังบริเวณที่ทายาและมีความแปรปรวนสูงในทุกกลุ่มทดสอบเช่นเดียวกับกลุ่มให้ยาเพียงครั้งเดียว ทั้งนี้การตรวจพบยาบริเวณผิวหนังที่ไม่ทายาแสดงให้เห็นว่า ยาถูกดูดซึมเข้าสู่ผิวหนังบริเวณทายาถึงระดับชั้นหนังแท้ (dermis) เข้าสู่กระแสเลือดและมีการกระจายของยาจากกระแสเลือดไปสู่ผิวหนังบริเวณอื่นๆที่ไม่ได้ทายา เมื่อคำนวณอัตราส่วนระหว่างระดับยาบริเวณผิวหนังที่ไม่ทายากับระดับยาในพลาสมาที่เวลาสุดท้ายก่อน

เก็บตัวอย่างผิวหนัง คือ 6 หรือ 24 ชั่วโมง หลังทายา พบว่าอยู่ในช่วง 3.382-75.091 เท่า (ตารางที่ 10) ซึ่งค่าที่ได้สูงกว่าค่าอัตราส่วนที่คำนวณได้จากการให้ยาทางปาก (2.6 เท่า) ในทุกกลุ่มทดสอบ

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอไรด์ในตัวอย่างพลาสมาที่เวลาต่างๆและผิวหนัง
หนูแรทที่ได้รับยาด้วยการทาผิวหนังรูปแบบทาช้ำ (repeated dose) ทุก 24 ชั่วโมง
ติดต่อกัน 7 วัน รวมจำนวนครั้งการทา 7 ครั้ง

หนูแรท	ระดับยาฟิแนสเทอไรด์ในพลาสมา (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)							ระดับยาในผิวหนัง บริเวณทายา ที่เวลาสุดท้ายหลัง ทายา (นาโนกรัมต่อกรัม)
	เวลา (ชั่วโมง)							
	0 ^{pre a}	0 ^{pre b}	1	3	6	10	24	
1	0	0.599	11.497	25.1	8.753			54263 ^c
2	0	0.75	9.834	24.726	9.322			53625 ^c
3	0	0.647	24.761	40.436	9.773			55150 ^c
4	0	1.13	64.833	42.87	13.856	6.56	0.571	19777.5 ^d
5	0	132.442	120.6	20.179	9.986	3.887	0.689	18790 ^d
6	0	1.548	24.63	69.786	39.512	9.843	0.781	42480 ^d

หมายเหตุ

- (1) ความเข้มข้นต่ำสุดของยาฟิแนสเทอไรด์ที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LLOQ) คือ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
- (2) a คือ ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอไรด์ก่อนทายาครั้งแรก และ b คือ ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอไรด์ก่อนทายาครั้งสุดท้าย
- (3) c คือ เก็บตัวอย่างผิวหนังที่เวลา 6 ชั่วโมง หลังทายาครั้งสุดท้ายและ d คือ เก็บตัวอย่างผิวหนังที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังทายาครั้งสุดท้าย
- (4) หนูแรทตาย 2 ตัว ในวันที่ 3 ของการทดสอบ

ตารางที่ 9 ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอไรด์ในตัวอย่างพลาสมาที่เวลาต่างๆและผิวหนัง
 หนูแรทที่ได้รับยาด้วยการทาผิวหนังรูปแบบทซ้ำ (repeated dose) ทุก 12 ชั่วโมง
 ติดต่อกัน 7 วัน รวมจำนวนครั้งการทา 14 ครั้ง

หนูแรท	ระดับยาฟิแนสเทอไรด์ในพลาสมา (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)							ระดับยาในผิวหนัง บริเวณททายา ที่เวลาสุดท้ายหลัง ททายา (นาโนกรัมต่อกรัม)
	เวลา (ชั่วโมง)							
	0 ^{pre a}	0 ^{pre b}	1	3	6	10	24	
1	0	0.834	49.566	41.536	21.86			29518 ^c
2	0	0.478	32.21	30.648	14.299			26807.5 ^c
3	0	0.356	44.379	38.615	15.975			20758 ^c
4	0	0.621	16.011	24.437	11.204			22017.5 ^c
5	0	0.983	9.596	11.356	6.688	1.989	0.65	10615 ^d
6	0	0.502	9.775	13.206	13.608	6.918	1.399	12937.5 ^d
7	0	0.615	67.051	67.93	21.72	14.978	2.737	20127.5 ^d
8	0	0.69	67.649	37.141	11.507	7.269	0.69	11255 ^d

หมายเหตุ

- (1) ความเข้มข้นต่ำสุดของยาฟิแนสเทอไรด์ที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LLOQ) คือ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร
- (2) a คือ ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอไรด์ก่อนททายาครั้งแรก และ b คือ ความเข้มข้นของยาฟิแนสเทอไรด์ก่อนททายาครั้งสุดท้าย
- (3) c คือ เก็บตัวอย่างผิวหนังที่เวลา 6 ชั่วโมง หลังททายาครั้งสุดท้ายและ d คือ เก็บตัวอย่างผิวหนังที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังททายาครั้งสุดท้าย

ตารางที่ 10 อัตราส่วนระดับยาฟิแนสเทอไรด์ระหว่างในผิวหนังบริเวณที่ไม่ทายา (control sites) กับในพลาสมาที่เวลาสุดท้ายหลังทายา ของหนูแรทที่ได้รับยาทาซ้ำทุก 24 ชั่วโมงและ 12 ชั่วโมง ติดต่อกัน 7 วัน ปริมาตรยา 150 ไมโครลิตร

ความถี่การ ทายา	หนูแรท	ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่าง					
		6 ชั่วโมงหลังทายา			24 ชั่วโมงหลังทายา		
		ระดับยาฟิแนสเทอไรด์			ระดับยาฟิแนสเทอไรด์		
		ผิวหนัง ส่วนไม่ ทายา	พลาสมา	อัตราส่วน	ผิวหนังส่วน ไม่ทายา	พลาสมา	อัตราส่วน
ทุก 24 ชั่วโมง	1	128.07	8.753	14.632	-	-	-
	2	700	9.322	75.091	-	-	-
	3	207.05	9.773	21.186	-	-	-
	4	-	-	-	12.345	0.571	21.620
	5	-	-	-	15.425	0.689	22.388
	6	-	-	-	23.819	0.781	30.498
ทุก 12 ชั่วโมง	1	73.928	21.86	3.382	-	-	-
	2	153.228	14.299	10.716	-	-	-
	3	283.208	15.975	17.728	-	-	-
	4	287.038	11.204	25.619	-	-	-
	5	-	-	-	5.525	0.65	8.513
	6	-	-	-	18.996	1.399	13.578
	7	-	-	-	17.534	2.737	6.406
	8	-	-	-	117.314	0.69	10.195

หมายเหตุ

- (1) ความเข้มข้นต่ำสุดของยาฟิแนสเทอไรด์ที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LLOQ) คือ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ยาที่ให้โดยการทาผิวหนังอาจถูกดูดซึมผ่านชั้นผิวหนังเข้าสู่กระแสเลือด สำหรับยาทาผิวหนังเพื่อการออกฤทธิ์เฉพาะที่ มุ่งหวังให้ยาแพร่ผ่านผิวหนังชั้นหนังกำพร้า (epidermis) เข้าสะสมในชั้นผิวหนังแท้ (dermis) ซึ่งเป็นบริเวณที่ต้องการให้ยาออกฤทธิ์ โดยที่ยาถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้น้อย ในการศึกษาด้านเภสัชจลนศาสตร์ของยาทาผิวหนังเพื่อออกฤทธิ์เฉพาะที่ในสัตว์ทดลอง จึงจำเป็นต้องศึกษาความหนาของผิวหนังชั้นต่างๆและวิธีที่กำจัดชั้นหนังกำพร้า (epidermis) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณยาที่สะสมในชั้นผิวหนังแท้ ซึ่งผลการศึกษาในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ผิวหนังชั้นหนังกำพร้าของหนูแรทตัวผู้สายพันธุ์ Sprague- Dawley มีความหนาเฉลี่ย 37.584 ± 1.79 ไมโครเมตร ($n=3$) ซึ่งหนากว่าผิวหนังชั้นหนังกำพร้าของหนูแรทตัวผู้สายพันธุ์ hairless ที่มีความลึกเฉลี่ย 30.81 ± 2.83 ไมโครเมตร ($n=6$) (Monti et al., 2014) ทั้งนี้หนูแรทสายพันธุ์ hairless เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารที่ให้โดยการทาผิว โดยมีอัตราการดูดซึมของยาเข้าสู่ผิวหนังที่คงที่และใกล้เคียงกับมนุษย์ (Shah et al., 1991) นอกจากนี้ยังมีรายงานความลึกของผิวหนังชั้นหนังกำพร้าของคนและหุหมูที่ 43 และ 60 ไมโครเมตร ตามลำดับ (Jung and Maibach, 2018)

ขั้นตอนการแยกชั้นผิวหนังกำพร้าออกจากชั้นหนังแท้ เป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญในการวิเคราะห์ปริมาณยาที่สะสมอยู่ตามชั้นผิวหนัง ซึ่งโดยทั่วไปมีหลายวิธีอาทิ radiochemical, surface scrapping, biopsies เป็นต้น (Nair et al., 2013) ในการศึกษานี้ได้เลือกใช้วิธี tape stripping ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีข้อดี ได้แก่ สะดวก ประหยัด ลดการบาดเจ็บต่อสัตว์ทดลองและได้ผลที่ค่อนข้างแม่นยำ ทั้งนี้หลักการของเทคนิคนี้คือ การใช้เทปปิดทับบนผิวหนังหนูแล้วใช้วัสดุที่มีน้ำหนักกดทับด้านบน หลังจากนั้นดึงเทปออกเพื่อเป็นการลอกผิวหนังชั้นหนังกำพร้า (Lademann et al., 2009) ซึ่งความแตกต่างในด้านวัสดุเทปที่ใช้ชนิดของหนัง ความหนาของชั้นหนังกำพร้า น้ำหนักที่กดทับบนหนังและแรงขณะดึงเทปออกออกจากผิวหนัง เป็นตัวแปรสำคัญที่มีผลต่อการแยกชั้นหนังกำพร้ากับชั้นหนังแท้ออกจากกัน (Bashir et al., 2001, Praça et al., 2018) ดังนั้นในการศึกษานี้จำเป็นต้องพัฒนาเทคนิค tape stripping ขึ้นโดยได้ประยุกต์ใช้ตุ้มน้ำหนัก 700 กรัม ที่ประดิษฐ์ขึ้นเองให้มีการกระจายของน้ำหนักต่อพื้นที่ผิวเท่ากันและครอบคลุมขนาดพื้นที่ ของตัวอย่างในการศึกษา ชนิดของเทปที่ใช้คือ transpore tape (3M™ Transpore™, 3M health care company, MN, USA) ซึ่งผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการใช้ตุ้มน้ำหนักวาง

บนเทปเป็นเวลานานครั้งละ 30 วินาที พบว่าจำนวน 4 ครั้ง เป็นสภาวะที่เหมาะสมมากที่สุดในการขจัด
 ผิวหนังชั้นหนังกำพร้าได้หมด โดยไม่ก่อความเสียหายต่อชั้นผิวหนังแท้ซึ่งเป็นชั้นผิวหนังที่ต้องการวัด
 ปริมาณยา จึงช่วยป้องกันความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ระดับยาในผิวหนังของหนูแรทได้

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาระดับยาฟิแนสเทอไรด์ในเลือดและผิวหนังของหนูแรทตัวผู้สายพันธุ์
 Sprague-Dawley อายุ 9-10 สัปดาห์ 350-450 กรัม โดยแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่
 1 ได้ยาทางปากและทางผิวหนังเพียงครั้งเดียว และกลุ่มที่ได้ยาทางผิวหนังรูปแบบทาค้า ซึ่งการเลือกใช้หนู
 แรทตัวผู้เนื่องจากยาฟิแนสเทอไรด์เป็นยาที่ออกฤทธิ์ต้านฮอร์โมนเพศชาย androgen ผ่านกลไกยับยั้ง
 เอนไซม์ 5-alpha reductase type 2 ที่ชั้นผิวหนังแท้ ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ได้ยาทางปากขนาด 5
 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เพียงครั้งเดียว มีระดับยาฟิแนสเทอไรด์ในพลาสมาสูงสุดที่เวลา 6
 ชั่วโมง (Tmax) หลังรับยา และมีความเข้มข้นสูงสุด 414.263 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Cmax) สำหรับกลุ่ม
 ที่ได้ยาทางผิวหนัง ความแรงยา 0.5% เพียงครั้งเดียวในปริมาตรแตกต่างกันคือ 75, 150, 300 ไมโครลิตร
 (ปริมาณยา 0.375, 0.75 และ 1.5 มิลลิกรัม ต่อพื้นที่ 4 ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ) นั้น ผลการศึกษา
 แสดงให้เห็นว่า ยาถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดได้น้อย อย่างไรก็ตามแนวโน้มการดูดซึมเข้ากระแสเลือด
 เพิ่มขึ้นตามปริมาตรยาที่ทา ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Monti และคณะ
 (2014) ที่พบการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้น้อยโดยอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถ
 วิเคราะห์จากการทายาฟิแนสเทอไรด์ความแรงยา 0.25% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บนหลังหนูแรทเพศผู้
 (Monti et al., 2014) นอกจากนี้กลุ่มที่ได้รับยาในรูปแบบทาผิวหนัง ความแรงยา 0.5% โดยทาซ้ำทุก 24
 ชั่วโมงหรือทุก 12 ชั่วโมง ติดต่อกัน 7 วัน พบว่า ยามีการสะสมในกระแสเลือดน้อยและไม่พบความ
 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระดับยาในพลาสมาที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังทายาครั้งสุดท้ายของทั้ง
 2 กลุ่ม อาจเป็นเพราะระดับยาที่ได้รับในพลาสมาจากการให้ยาซ้ำทั้ง 2 แบบ อยู่ในสภาวะ steady state
 ไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้ข้อสันนิษฐานดังกล่าวคาดประมาณจากค่าครึ่งชีวิต (half-life) ของยาที่ 10 ชั่วโมง
 ดังนั้นระดับยาในพลาสมา น่าจะเข้าสู่สภาวะ steady state ในช่วง 2 วันแรกของการศึกษา (ประมาณ
 30-40 ชั่วโมงหลังให้ยา) ผลการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการทาซ้ำ 1 ครั้ง หรือ 2 ครั้งต่อวัน แสดงให้
 เห็นว่าจำนวนครั้งดังกล่าวไม่มีผลต่อการดูดซึมยาเข้าสู่กระแสเลือด

ในส่วนของการศึกษาระดับยาในชั้นผิวหนังนั้น พบว่าระดับยาสะสมอยู่ในผิวหนังที่ 24 ชั่วโมง
 หลังจากหนูแรทได้รับยาทางปากเพียงครั้งเดียวมีปริมาณน้อย โดยสามารถประมาณอัตราส่วน
 เปรียบเทียบระหว่างระดับยาในผิวหนังและระดับยาในพลาสมาที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าประมาณ 2.6 เท่า

ทั้งนี้ข้อมูลดังกล่าวบ่งบอกถึงการแพร่ของยาจากพลาสติกเข้าสู่ผิวหนังชั้นหนังแท้ ซึ่งนำมาใช้อ้างอิงสำหรับผลการศึกษาระดับยาในผิวหนังบริเวณที่ไม่สัมผัสยา (control sites) ของกลุ่มที่ได้รับยาทางผิวหนังได้ เนื่องจากระดับยาที่พบในผิวหนัง control sites นี้สัมพันธ์กับการดูดซึมของยาจากผิวหนังเข้าสู่กระแสเลือดและแพร่ผ่านจากกระแสเลือดเข้าสู่ผิวหนังชั้นหนังแท้ ดังนั้นค่าอัตราส่วนเปรียบเทียบกับค่าที่ control sites ไม่ควรเกินกว่า 2.6 เท่า ซึ่งผลการศึกษากลุ่มทดสอบที่ได้รับยาทางผิวหนังทุกกลุ่มทั้งกลุ่มที่ทายาเพียงครั้งเดียวและกลุ่มที่ทายาซ้ำ มีค่าอัตราส่วนดังกล่าวเกินกว่า 2.6 เท่า และค่าระดับยาที่ตรวจพบในพลาสติกมีค่าสูงกว่าระดับที่คาดการณ์ไว้โดยมีค่าเกินกว่า 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ นอกจากนี้ค่าที่ตรวจพบทั้งในพลาสติกและที่ผิวหนังบริเวณที่ไม่สัมผัสยามีความแปรปรวนสูงมาก ตลอดจนการพบระดับยาบริเวณผิวหนังที่ทายาของกลุ่มทาซ้ำทุก 24 ชั่วโมง มากกว่ากลุ่มทาซ้ำทุก 12 ชั่วโมง ติดต่อกัน 7 วัน ประมาณ 2 เท่า ทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่าจำนวนครั้งการทายามีผลต่อการสะสมของยาในชั้นผิวหนัง แต่คาดการณ์ว่าไม่ควรมียาในระดับยาในผิวหนังแตกต่างกัน ทั้งนี้คุณสมบัติของยาฟิแนสเทอไรด์ที่มีโครงสร้างเป็น steroid ละลายน้ำได้ไม่ดี (Log P=3.03) ทำให้ล้างออกได้ยากด้วยน้ำหรือแอลกอฮอล์ กอปรกับการใช้วิธีการตรวจวัดด้วยเครื่อง LC-MS/MS ที่มีความไวสูง สามารถตรวจวิเคราะห์ยาในปริมาณน้อยได้ ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการทำความสะอาดเครื่องมือเพื่อป้องกันปัญหาการปนเปื้อนระหว่างการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ พบว่าขั้นตอนในการล้างที่เหมาะสมต้องใช้อะซิโตนไนไตรล์ (Acetonitrile) ร่วมกับเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) (ภาคผนวก ง) จึงตรวจไม่พบการปนเปื้อน (ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้คือ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร) ดังนั้นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความแปรปรวนของค่าที่ตรวจวิเคราะห์ได้ในการศึกษานี้ น่าจะมาจากขั้นตอนของการศึกษาในสัตว์ทดลองและการเก็บตัวอย่าง โดยอาจมีสาเหตุเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมของสัตว์ทดลองในการแต่งขน (grooming) การเลียเท้าหรือวัสดุรองนอน ซึ่งมักแสดงออกบ่อยขึ้นหลังจากการสัมผัสสารที่มีส่วนประกอบของแอลกอฮอล์ (Taylor et al., 1987) และในขั้นตอนการศึกษาที่ทายาซ้ำติดต่อกันหลายวันซึ่งได้มีการเล็มขนหนูแรทด้วยปลายกรรไกรทุกวันก่อนการทายา อาจทำให้เกิดความระคายเคืองที่ผิวหนัง หนูจึงไถลตัวไปกับวัสดุรองนอนเพื่อลดความระคายเคืองหรือในขั้นตอนที่ใช้ผ้าพันชนิดยืดหยุ่นได้ (coban) (3M™ Transpore™, 3M health care company, MN, USA) ปิดตำแหน่งที่ทายาโดยหวังผลลดการปนเปื้อนที่บริเวณที่ทา มีผลทำให้หนูเกิดความรำคาญและระคายเคืองจนเดินไปมาทำให้ผ้าพันหลุดออก และหนูอาจเลียผ้าพันบริเวณที่มียาอยู่

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าเมื่อให้ยาฟิแนสเทอไรด์ทางผิวหนังยาถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้น้อย โดยยาสะสมอยู่ในผิวหนังชั้นหนังแท้ (dermis) ซึ่งเป็นเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยาฟิแนสเทอไรด์ที่

ต้องการให้ยาออกฤทธิ์เฉพาะที่ชั้นผิวหนัง อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้วัดระดับไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน (Dihydrotestosterone, DHT) เนื่องจากระดับของฮอร์โมน DHT จะมีปริมาณน้อยมากทั้งในพลาสมาและในผิวหนังโดยระดับ DHT ในพลาสมาของอาสาสมัครสุขภาพดีที่มีรายงานนั้นอยู่ที่ระดับ 0.66 ± 0.18 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Caserini et al., 2014) ตลอดจนการให้ยาฟินเนสเทอไรด์มีผลไปยับยั้งการสร้างขึ้นของฮอร์โมน DHT (Drake et al., 1999) ทำให้ปริมาณ DHT ลดลงจนอาจไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีความเข้มข้นของ DHT มีค่าน้อยกว่า 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้จากวิธีวิเคราะห์ของเครื่อง LC-MS/MS

บรรณานุกรม

- Bashir, S.J., Chew, A.L., Anigbogu, A., Dreher, F., and Maibach, H.I. 2001. Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. *Skin research and technology* 7; 1: 40-8.
- Blumeyer, A., Tosti, A., Messenger, A., Reygagne, P., et al., 2011. Evidence-based (S3) guideline for the treatment of androgenetic alopecia in women and in men. *Journal of the German Society of Dermatology* 9; 6: 51-7.
- Carlin, J.R., Hoglund, P., Eriksson L., et al., 1992. Disposition and pharmacokinetics of [¹⁴C]finasteride after oral administration in humans. *Drug Metabolism and Disposition Journal* 20; 148-55.
- Caserini, M., Radicioni, M., Leuratti, C., Annoni, O., and Palmieri, R. 2014. A novel finasteride 0.25% topical solution for androgenetic alopecia: pharmacokinetics and effects on plasma androgen levels in healthy male volunteers. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 52; 10: 842-9.
- Drake, L., Hordinsky, M., Fiedler, V., Swinehart, J., Unger, W.P., Cotterill, P.C., Thiboutot, D.M., Lowe, N., Jacobson, C., Whiting, D., Stieglitz, S., Kraus, S.J., Griffin, E.I., Weiss, D., Carrington, P., Gencheff, C., Cole, G.W., Pariser, D.M., Epstein, E.S., Tanaka, W., et al., 1999. The effects of finasteride on scalp skin and serum androgen levels in men with androgenetic alopecia. *Journal of the American Academy of Dermatology* 41: 550-554.
- Hibino, T., Nishiyama, T. 2004. Role of TGF-beta2 in the human hair cycle. *Journal of the Dermatological Science* 35: 9-18.
- Hirshburg, J.M., Kelsey, P.A., Therrien, C.A., Gavino, C., and Reichenberg, J.S. 2016. Adverse Effects and Safety of 5-alpha Reductase Inhibitors (Finasteride, Dutasteride): A Systematic Review. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology* 9; 7: 56-62.
- Kaufman, K.D., Olsen, E.A., Whiting, D., Savin, R., Devillez, R., Bergfeld, W., Price, V.H., Neste, V.D., Roberts, J.L., et al., 1998. Finasteride in the treatment of men with androgenetic alopecia. *Journal of the American Academy of Dermatology* 39: 578-89.

- Lademann, J., Jacobi, U., Surber, C., Weigmann, H.J., Fluhr, J.W., 2009. The tape stripping procedure--evaluation of some critical parameters. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 72; 2: 317-23.
- Leyden, J., Dunlap, F., MILLER, B., et al., 1999. Finasteride in the treatment of men with frontal male pattern hair loss. Journal of the American Academy of Dermatology 40: 930-37.
- Libecco, J.F., and Bergfeld, W.F. 2004. Finasteride in the treatment of alopecia. Expert opinion on pharmacotherapy 5; 4: 933-40.
- Mazzarella, G.F., Loconsole, G.F., Cammisa, G.A., Mastrolonardo, G.M., and Vena, G.A. 2009. Topical finasteride in the treatment of androgenic alopecia. Preliminary evaluations after a 16-month therapy course. Journal of Dermatological Treatment 8; 3: 189-192.
- Merck & Co.: Propecia® (finasteride 1 mg tablet) package insert. Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, USA.
- Monti, D., Tampucci, S., Burgalassi, S., Chetoni, P., Lenzi, C., Pirone, A., et al., 2014. Topical formulations containing finasteride. Part I: in vitro permeation/penetration study and in vivo pharmacokinetics in hairless rat. Pharmaceutics, Drug Delivery and Pharmaceutical Technology 103; 8: 2307-14.
- Nair, A., Jacob, S., AlDhubiab, B., Attimarad, M., Harsha, S. 2013. Basic considerations in the dermatokinetics of topical formulations. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 49; 3: 423-34.
- Ohtawa, M., Morikawa, H., and Shimazaki, J. 1991. Pharmacokinetics and biochemical efficacy after single and multiple oral administration of N-(2-methyl-2-propyl)-3-oxo-4-aza-5 alpha-androst-1-ene-17 beta-carboxamide, a new type of specific competitive inhibitor of testosterone 5 alpha-reductase, in volunteers. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics 16: 15-21.
- Pandey, A., Mittal, A., Chauhan, N., and Alam, S. 2014. Role of Surfactants as Penetration Enhancer in Transdermal Drug Delivery System. Journal of Molecular

Pharmaceutics & Organic Process Research 2: 213.

- Praça, F.S.G., Medina, W.S.G., Eloy, J.O., Petrilli, R., Campos, P.M., Ascenso, A., Bentley, M.V.L.B., 2018. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. European Journal of Pharmaceutical Sciences 111: 121-32.
- Price, V.H., Roberts, J.L., Hordinsky, M., Olsen, E.A., Savin, R., Bergfeld, W., et al., 2000. Lack of efficacy of finasteride in postmenopausal women with androgenetic alopecia. Journal of the American Academy of Dermatology 43; 5: 768-76.
- Rittmaster, R.S., Lemay, A., Zwicker, H., Capizzi, T.P., Winch, S., Moore, E., and Gormley, G.J. 1992. Effect of finasteride, a 5 alpha-reductase inhibitor, on serum gonadotropins in normal men. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 75; 2: 484-488.
- Steiner, J.F. 1993. Finasteride: a 5 α -reductase inhibitor. Journal of Clinical Pharmacology 12: 15-23.
- Upreti, R., Naredo, G., Faqehi, A.M., Hughes, K.A., Stewart, L.H., Walker, B.R, et al., 2015. Simultaneous pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5alpha-reductase inhibitors and androgens by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Talanta 131; 728-35.
- Varothai, S., and Bergfeld, W.F. 2014. Androgenetic alopecia: an evidence-based treatment update. American journal of clinical dermatology 15; 3: 217-30.
- Zendzian, R. P. 1989. Skin Penetration Method Suggested for Environmental Protection Agency Requirements. Journal of the American College of Toxicology 8; 5: 829-835.
- Zou, Y., and Maibach, H.I. 2018. Dermal-epidermal separation methods: research implications. Archives of dermatological research 310; 1: 1-9.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
เอกสารรับรองโครงการวิจัยในสัตว์ทดลอง



ใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

รหัสโครงการ	BT- Animal 16/2561
ชื่อโครงการวิจัยหลัก	
(ภาษาไทย)	การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ในชั้นผิวหนังและในร่างกายของ finasteride เมื่อให้ในรูปแบบทาผิวหนังจากสูตรตำรับใหม่ในหนูแรท
(ภาษาอังกฤษ)	-
ชื่อโครงการที่ใช้สัตว์	
(ภาษาไทย)	การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ในชั้นผิวหนังและในร่างกายของ finasteride เมื่อให้ในรูปแบบทาผิวหนังจากสูตรตำรับใหม่ในหนูแรท
(ภาษาอังกฤษ)	-
หัวหน้าโครงการวิจัย	ภก.ดร. ทวีชัย วชิรยนเสถียร
หน่วยงานที่สังกัด	ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมโปรตีนลิแกนด์และชีววิทยาโมเลกุล หน่วยวิจัยชีววิทยาโมเลกุลทางการแพทย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ข้อเสนอโครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติแล้ว ในการประชุมครั้งที่ 5/2561 เมื่อวันที่ 27 กุมภาพันธ์ 2561 เห็นว่ามีความสอดคล้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สภาวิจัยแห่งชาติ จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ตามข้อเสนอโครงการวิจัยนี้ได้

(นางสาวลลิตา เอื้อวิไลจิตร)

ประธานคณะกรรมการ

กำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

วันที่ - 9 มิ.ย. 2561

หมายเหตุ ใบรับรองการอนุมัตินี้มีอายุการรับรอง 1 ปี นับจากวันที่ประธานคณะกรรมการฯ ลงนาม

" โปรดเก็บรักษาไว้เพื่อประโยชน์ของท่าน "



ใบรับรองโครงการวิจัยเป็นวิทยุทดลอง
คณะกรรมการกำกับดูแลการยื่นขอและดำเนินการใช้วิทยุทดลอง
ศูนย์วิทยุทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

รหัสโครงการ ... NLAC-MU Protocol No. RA 2017-49 ...

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษานโยบายและกลไกการพัฒนาระบบบริการสุขภาพของสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสมุทรสาคร ในรูปแบบ

ชื่อ-สกุล ผู้เสนอขอโครงการวิจัย มาจากหน่วยงาน ดังนี้

หน่วยงานต้นสังกัด (ขอทดลอง) ศูนย์วิทยุทดลองแห่งชาติ

(มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

(กระทรวง) กระทรวงสาธารณสุข

ข้อเสนอโครงการวิจัยนี้ได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการยื่นขอและดำเนินการใช้วิทยุทดลองแล้ว จึงมีมติอนุมัติให้ดำเนินการยื่นขอและใช้วิทยุทดลองตามข้อเสนอโครงการวิจัยนี้ไว้

ลงนาม [Signature]
(น.ส. สุรฉัตร จันทร์ทิพย์)

ตำแหน่ง ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการยื่นขอและดำเนินการใช้วิทยุ

วันที่ เดือน ปี 30/1/61

ลงนาม [Signature]
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญ จุฑามณี สุทธิวิจิตรกุล)

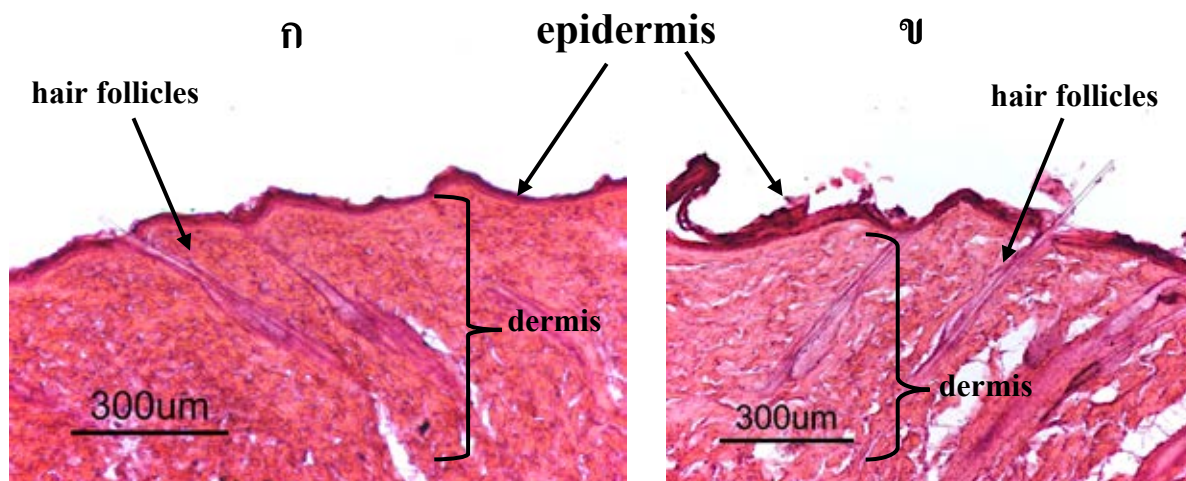
ตำแหน่ง วิศวกรควบคุมห้องปฏิบัติการที่ศูนย์วิทยุทดลอง
รักษาการณศูนย์วิทยุทดลองศูนย์วิทยุทดลองแห่งชาติ

วันที่ เดือน ปี 30 มค 2561

ภาคผนวก ข

ตัวอย่างภาพตัดขวางของหนังหนูก่อนและหลังการแช่ด้วย 70% EtOH และน้ำกลั่นก่อนทำการเก็บ

ตัวอย่างผิวหนังเพื่อป้องกันยาค้างอยู่บนผิวหนังชั้นบนสุดและการหลุดลอกของชั้นหนังกำพวด



รูปที่ 14 ลักษณะการย้อมติดสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน กำลังขยาย 10 เท่าของโครงสร้างชั้นผิวหนัง
 หนูแรทก่อน (รูป ก) และหลัง (รูป ข) การเช็ดด้วย 70% EtOH และน้ำกลั่น
 ก่อนเก็บตัวอย่างผิวหนังเพื่อป้องกันยาค้างอยู่บนผิวชั้นบนสุดและการหลุดลอกของชั้นหนังกำพร้า

ภาคผนวก ค

การตรวจรับรองความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาฟิแนสเทอโรลในพลาสมาและในผิวหนัง
หนูแรทด้วยเครื่อง LC-MS/MS

ตารางที่ 11 ค่าความถูกต้อง (Accuracy) ของการวิเคราะห์สารมาตรฐานฟินาสเทอไรด์ในพลาสมา
ในช่วงความเข้มข้น 6 ความเข้มข้นของความเป็นเส้นตรง (Linearity)

Finasteride concentration (ng/mL)	Peak area		Peak area ratio	Calculation concentration (ng/mL)	%Accuracy
	finasteride	methenolone (IS)			
0.1	2313.033	1747939.952	0.00132329	0.1	100
5	104439.360	1902423.033	0.05489807	5.073	101.46
30	617701.454	1870695.322	0.33019886	30.626	102.09
100	2106371.807	1865331.225	1.12922133	104.791	104.79
300	6130277.852	1831524.075	3.34709106	310.652	103.55
500	10032092.659	2112402.093	4.74913971	440.789	88.16

ตารางที่ 12 ค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) ของการวิเคราะห์สารมาตรฐานฟินาสเทอไรด์ในพลาสมา ภายใต้การทดสอบวันเดียวกัน (Within-run)

QC samples	Finasteride concentration (ng/mL)	Peak Area		Peak area ratio	Calculation concentration (ng/mL)	Average %Accuracy	SD	Precision (%CV)
		finasteride	methenolone (IS)					
LLOQ-01	0.1	2587.001	1875166.366	0.00137961	0.105	88	14.93	16.97
LLOQ-02	0.1	2339.816	2067451.305	0.00113174	0.082			
LLOQ-03	0.1	2088.399	1934445.58	0.00107959	0.077			
LQC-01	0.3	6085.289	2149331.103	0.00283125	0.240	89	10.82	12.15
LQC-02	0.3	6476.780	1843101.216	0.00351407	0.303			
LQC-03	0.3	5806.201	1919349.732	0.00302509	0.258			
MQC-01	250	3668137.882	1525475.015	2.40458732	223.169	96	6.63	6.91
MQC-02	250	4921231.586	1899100.258	2.59134902	240.504			
MQC-03	250	4819568.035	1745226.686	2.76157136	256.304			
HQC-01	400	7411085.378	1771267.297	4.18405815	388.338	99.26	6.96	7.01
HQC-02	400	8297968.725	1798795.903	4.61306850	428.159			
HQC-03	400	7689141.039	1905263.558	4.03573616	374.571			

ตารางที่ 13 ค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) ของการวิเคราะห์สารมาตรฐานฟินาสเทอไรด์ในพลาสมา ภายใต้การทดสอบระหว่างวัน (Between-run)

Finasteride concentration (ng/mL)	Calculation concentration (ng/mL)		Average concentration	Average %Accuracy	SD	Precision (%CV)
	Day1	Day2				
0.1	0.1	0.1	0.1	100	0	0
5	5.073	5.422	5.25	104.95	0.25	4.7
30	30.626	34.130	32.38	107.93	2.48	7.65
100	104.791	98.304	101.55	101.54	4.59	4.52
300	310.652	278.042	294.35	98.11	23.06	7.83
500	440.789	435.038	437.91	87.59	4.07	0.93

ตารางที่ 14 ค่าความถูกต้อง (Accuracy) และค่าความแม่นยำ (Precision) ของการวิเคราะห์สารมาตรฐานฟินาสเทอไรด์ในพลาสมา
ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (LLOQ)

QC samples	Finasteride concentration (ng/mL)	Calculation concentration (ng/mL)	%Accuracy	Average %Accuracy	SD	Precision (%CV)
LLOQ-01	0.1	0.105	105.00	88.00	14.933	16.97
LLOQ-02	0.1	0.082	82.00			
LLOQ-03	0.1	0.077	77.00			

ตารางที่ 15 ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันของสารรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์ (Matrix effect)
ความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟินาสเทอไรด์ในพลาสมา

QC samples	Finasteride concentration (ng/mL)	Peak area		Matrix effect of finasteride	Average	SD	%CV
		Solution	Post-spiked				
LOQ-01	0.3	6871.40	7199.52	104.78	101.01	4.384	4.34
LOQ-02	0.3	7178.98	6906.03	96.20			
LOQ-03	0.3	7005.31	7149	102.05			
HQC-01	400	9162195	8551355.6	93.33	96.73	2.958	3.06
HQC-02	400	8801407.22	8690135.1	98.74			
HQC-03	400	9167224.58	8994013.73	98.11			

ตารางที่ 16 ค่าการคืนกลับสมบูรณ์ (Recovery of extraction) ของสารมาตรฐานฟินาสเทอโรดในพลาสติกผ่านการสกัด
ด้วยวิธี Liquid-liquid extraction

QC samples	Finasteride concentration (ng/mL)	Peak Area		%Recovery	Average %Recovery
		Pre-spiked	Post-spiked		
LQC-1	0.3	6085.289	7199.524	84.52	86.51
LQC-2	0.3	6476.780	6906.032	93.78	
LQC-3	0.3	5806.201	7149.001	81.22	
MQC-1	250	3668137.882	5545475.574	66.15	83.79
MQC-2	250	4921231.586	5263296.384	93.50	
MQC-3	250	4819568.035	5254392.977	91.72	
HQC-1	400	7411085.378	8551355.590	86.67	89.21
HQC-2	400	8297968.725	8690135.056	95.49	
HQC-3	400	7689141.039	8994013.729	85.49	

ตารางที่ 17 ค่าความถูกต้อง (Accuracy) ของสารมาตรฐานฟินาสเทอไรด์ในพลาสมา
 ภายหลังจากแช่แข็ง-ละลาย 0 และ 2 รอบ (Freeze and Thaw stability)

Set number	Finasteride concentration (ng/mL)	Calculation concentration (ng/mL)		%Change
		0 cycle	2 cycles	
LQC-01	0.3	0.240	0.230	5.17
LQC-02	0.3	0.256	0.249	
LQC-03	0.3	0.258	0.314	
	Average concentration	0.251	0.264	
	Average %Accuracy	83.78	88.11	
HQC-01	400	385.227	385.93	-4.25
HQC-02	400	452.564	395.39	
HQC-03	400	367.417	372.65	
	Average concentration	401.74	384.66	
	Average %Accuracy	100.43	96.16	

ตารางที่ 18 ค่าความถูกต้อง (Accuracy) ของการวิเคราะห์สารมาตรฐานฟินาสเทอไรด์ในฉนวน
ที่ช่วงความเข้มข้น 6 ความเข้มข้นของความเป็นเส้นตรง (Linearity)

Finasteride concentration (ng/mL)	Peak area		Peak area ratio	Calculation concentration (ng/mL)	%Accuracy
	finasteride	finasteride-D9 (IS)			
0.1	1154.021	2914858.750	0.00039591	0.1	100
5	40897.074	2368119.750	0.01726985	5.331	106.62
30	243472.703	2602034.500	0.09357013	28.986	96.62
100	856177.500	2756062.000	0.31065248	96.287	96.29
300	2288780.250	2357792.000	0.97073035	300.928	100.31
500	4296268.000	2656493.250	1.61727044	501.372	100.27

ตารางที่ 19 ค่าความถูกต้อง (Accuracy) และความแม่นยำ (Precision) ของการวิเคราะห์สารมาตรฐานฟินาสเทอไรด์ในฉิวหนัง ภายใต้การทดสอบวันเดียวกัน (Within-run)

QC samples	Finasteride concentration (ng/mL)	Peak Area		Peak area ratio	Calculation concentration (ng/mL)	Average %Accuracy	SD	Precision (%CV)
		finasteride	finasteride-D9 (IS)					
LLOQ-01	0.1	809.344	2318117.75	0.00034914	0.088	0.088	1.0	1.14
LLOQ-02	0.1	829.629	2400476.75	0.00034561	0.087			
LLOQ-03	0.1	860.269	2439917	0.00035258	0.089			
LQC-01	0.3	2829.431	2597958.5	0.00108910	0.315	0.311	6.984	7.13
LQC-02	0.3	2301.570	2116774.75	0.00108730	0.314			
LQC-03	0.3	2399.761	2268884.25	0.00105768	0.305			
MQC-01	250	2060733.875	2362634.000	0.87221883	270.387	258.42	1.916	1.98
MQC-02	250	1703772.250	2176060.250	0.78296189	242.715			
MQC-03	250	1730526.875	2046342.500	0.84566825	262.156			
HQC-01	400	3381826.5	2531652.500	1.33581781	414.115	422.77	1.981	1.99
HQC-02	400	2532289.75	2013613.000	1.25758512	389.861			
HQC-03	400	2805729.75	1873258.625	1.49778024	464.327			

ตารางที่ 20 ค่าความถูกต้อง (Accuracy) และค่าความแม่นยำ (Precision) ของการวิเคราะห์สารมาตรฐานฟินาสเทอไรด์ในผิวหนัง
ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (LLOQ)

QC samples	Finasteride concentration (ng/mL)	Calculation concentration (ng/mL)	%Accuracy	Average %Accuracy	SD	Precision (%CV)
LLOQ-01	0.1	0.088	88	88	1	1.14
LLOQ-02	0.1	0.087	87			
LLOQ-03	0.1	0.089	89			

ตารางที่ 21 ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผันของสารรบกวนที่มีผลต่อการวิเคราะห์ (Matrix effect)

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานฟินาสเทอโรดในผิวหนัง

QC samples	Finasteride concentration (ng/mL)	Peak area		Matrix effect of finasteride	Average	SD	%CV
		Solution	Post-spiked				
LOQ-01	0.3	5039.69	4286.76	85.06	80.71	8.015	9.93
LOQ-02	0.3	4801.78	4110.57	85.61			
LOQ-03	0.3	4784.35	3418.94	71.46			
HQC-01	400	4618071	4592581	99.45	97.52	6.343	6.50
HQC-02	400	4456178	4575404.5	102.68			
HQC-03	400	4625612	4183603.25	90.44			

ตารางที่ 22 ค่าการคืนกลับสมบูรณ์ (Recovery of extraction) ของสารมาตรฐานฟินาสเทอไรด์
ในผิวหนังที่ผ่านการสกัดด้วยวิธี Liquid-liquid extraction

QC sample	Finasteride concentration (ng/mL)	Peak Area		%Recovery	Average %Recovery
		Pre-spiked	Post-spiked		
LQC-1	0.3	2950.729	4286.763	68.83	75.35
LQC-2	0.3	2921.927	4110.566	71.08	
LQC-3	0.3	2945.060	3418.936	86.14	
MQC-1	250	2169644.750	3147321.000	68.94	70.40
MQC-2	250	2164963.500	3033777.750	71.36	
MQC-3	250	2281725.750	3217507.000	70.92	
HQC-1	400	2305427.250	4592581.000	50.20	60.10
HQC-2	400	2759578.250	4575404.500	60.31	
HQC-3	400	2919203.500	4183603.250	69.78	

ตารางที่ 23 ค่าความถูกต้อง (Accuracy) ของสารมาตรฐานฟินาสเทอไรด์ในผิวหนัง
 ภายหลังจากแช่แข็ง-ละลาย 0 และ 2 รอบ (Freeze and Thaw stability)

Set number	Finasteride concentration (ng/mL)	Calculation concentration (ng/mL)		%Change
		0 cycle	2 cycles	
LQC-01	0.3	0.309	0.306	-3.89
LQC-02	0.3	0.306	0.299	
LQC-03	0.3	0.309	0.284	
	Average concentration	0.308	0.296	
	Average %Accuracy	102.67	98.78	
HQC-01	400	404.606	376.416	-4.63
HQC-02	400	390.847	375.054	
HQC-03	400	384.773	374.065	
	Average concentration	393.41	375.18	
	Average %Accuracy	98.35	93.79	

ภาคผนวก ง

การทดสอบการล้างอุปกรณ์ให้ปราศจากยาฟิแนสเทอไรด์

ขั้นตอนการล้างอุปกรณ์ที่สัมผัสยาฟิแนสเทอไรด์

1. นำอุปกรณ์ที่สัมผัสสารละลายยาฟิแนสเทอไรด์ความแรงยา 0.5% ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำผสมน้ำยา tepol จากนั้นวางลงในเครื่องล้างความถี่สูง (Ultrasonic cleaner, Branson, CT, USA) เป็นเวลา 40 นาที
2. แช่อุปกรณ์ด้วย 100% อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร พร้อมวางลงในเครื่องล้างความถี่สูง (Ultrasonic cleaner, Branson, CT, USA) เป็นเวลา 40 นาที และล้างทำความสะอาดด้วยน้ำผสมน้ำยา tepol
3. แช่อุปกรณ์ด้วย 100% เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที และล้างทำความสะอาดด้วยน้ำผสมน้ำยา tepol
4. ชะล้างอุปกรณ์ด้วย 70% เอทานอล (Ethanol) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
5. เก็บสารละลาย 70% เอทานอล นำไปวิเคราะห์ปริมาณยาฟิแนสเทอไรด์ที่ตกค้างบนอุปกรณ์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ซึ่งสามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการศึกษาพบว่า การล้างอุปกรณ์ที่สัมผัสสารละลายยาฟิแนสเทอไรด์ด้วยวิธีดังกล่าวพบอัตราส่วนพื้นที่ใต้โครมาโตแกรมของยาฟิแนสเทอไรด์ความแรงยา 0.5% ต่อสารมาตรฐานภายใน (Mestanolone) ที่ 157000 โดยน้อยกว่าอัตราส่วนของยาฟิแนสเทอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่อง LC-MS/MS สามารถวิเคราะห์ได้ซึ่งมีค่า 254000 ดังนั้นการล้างอุปกรณ์ด้วยวิธีนี้จึงมีประสิทธิภาพต่อการนำไปใช้สำหรับการศึกษาคั้งนี้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	สุธีรา ภูมิภักดี
วัน เดือน ปี เกิด	28 กุมภาพันธ์ 2532
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลรามธิบดี กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสาขาวิชาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ที่อยู่ปัจจุบัน	89/28 หมู่ 8 ตำบลอ้อมน้อย อำเภอกะทู้ม้าน จังหวัดสมุทรสาคร