



Thai Journal of Pharmacology

www.phartherst.org

วารสารเภสัชวิทยา

Official Publication of
Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand

Contents

RESEARCH ARTICLES

Contents, Pharmacokinetics and Cardiovascular Effects of Caffeine in
Leading Caffeinated Drinks Sold in Thailand

A Bio-Analytical Method for the Determination of Nelfinavir in Plasma

Antinociceptive Activity of the Methanolic Extract of *Kaempferia galanga*
and Its Possible Mechanisms in Experimental Animals

DRUG EVALUATION

Perindopril Arginine: Advantages over the Currently Available
Perindopril-*tert*-butylamine

SHORT COMMUNICATION

การใช้ยาเพื่อลดความดันโลหิตเป็นกิจวัตรในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2: บทเรียนจาก

การศึกษา ADVANCE -trial

2008, Vol.30, No. 2

ISSN 01253832

Thai Journal of Pharmacology

is owed and published every four months by the Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand.

Board of Editors

Editor Supatra Srichairat

Associate Editors Pravitt Akarasereenont Laddawal Phivthong-ngam
Somjai Nakornchai

Editorial Board

Adisak Wongkajornsilp
Amnuay Thithapandha
Borpit Klangkalya
Bunkerd Kongyingyoes
Chaichan Sangdee
Chandhanee Itthipanichpong
Chongkol Thiengda
Krongtong Yoovathaworn
Nongluk Sookvanichsilp
Nisamanee Satyapan

Pornpen Pramyothin
Prasan Dhumma-Upakorn
Sirintorn Yipchokanand
Somsong Lawanprasert
Sopit Thamaree
Sumana Chompootawee
Supeecha Wittayalertpanya
Srichan Phornchirasilp
Wittaya Janthasoot
Yupin Sanvarinda

Manager Supeecha Wittayalertpanya

Office Department of Pharmacology
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University,
Chulalongkorn Hospital, Rama 4 Road, Bangkok 10330,
Thailand. Tel/Fax 2511965

Notice The opinions expressed here in are those of the authors and do not necessarily reflect the views of the editors or the publisher.

Printed at Ruen Kaew Press, 947 Arun-Amarin Road, Bangkok 10700. Tel: 02-4126552

วารสารเภสัชวิทยา (Thai Journal of Pharmacology) นี้เป็นลิขสิทธิ์ของสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ไม่อนุญาตให้นำส่วนใดส่วนหนึ่งของเอกสารฉบับนี้ไปถ่ายเอกสาร ผลิตหรือพิมพ์ซ้ำ หรือนำไปใช้เพื่อประโยชน์ทางการค้าโดยปราศจากการยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากบรรณาธิการ

Thai Journal of Pharmacology

Vol. 30, No. 2, 2008

Contents

2 EDITORIAL

RESEARCH ARTICLES

3 Contents, Pharmacokinetics and Cardiovascular Effects of Caffeine in Leading Caffeinated Drinks Sold in Thailand

Chaichan Sangdee, Jaroensri Khounvong, Supanimit Teekachunhatean, Noppamas Rojanasthien

13 A Bio-Analytical Method for the Determination of Nelfinavir in Plasma

Jinda Wangboonskul, Julrat Konsil and Raymond Gordon Reid

26 Antinociceptive Activity of the Methanolic Extract of *Kaempferia galanga* and Its Possible Mechanisms in Experimental Animals

Chutha Sae-wong, Wibool Ridditid, Wantana Reanmongkol, Malinee Wongnawa

DRUG EVALUATION

36 Perindopril Arginine: Advantages over the Currently Available Perindopril-*tert*-butylamine

Supanimit Teekachunhatean

SHORT COMMUNICATION

49 การใช้ยาเพื่อลดความดันโลหิตเป็นกิจวัตรในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2: บทเรียนจากการศึกษา ADVANCE -trial

ณัฐพงศ์ โฆษขุนพันธ์

บทบรรณาธิการ

เรียน ชาวเภสัชวิทยาและท่านผู้อ่านที่รัก

เวลาผ่านไปเร็วมากจนทำอะไรไม่ทันเลย เผลอแป็บเดียวก็เปิดเทอม แล้วก็ปีใหม่อีกแล้ว ปีนี้วารสารก็ออกได้แค่สองฉบับ เพราะว่าเนื้อหายังมีไม่พอปิดเล่ม ต้องตัดใจว่าแค่นี้ก็คงพอแล้ว ยิ่งกับเป็นฉบับพอเพียงจริงๆ

ขอใช้โอกาสนี้ประชาสัมพันธ์การประชุมวิชาการครั้งที่ 31 ของสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ที่กำหนดจะจัดขึ้นในวันที่ 18-20 มีนาคม 2552 ที่จะถึงนี้ โดยที่ทางคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่นยินดีรับเป็นเจ้าภาพให้อีกครั้ง เพื่อนๆที่เคยไปประชุมวิชาการของสมาคมฯที่ขอนแก่นเมื่อหลายปีก่อนจะยังคงไม่ลืมความประทับใจที่ทางเจ้าภาพได้แสดงพลังสามัคคีจัดงานได้อย่างดีเยี่ยม สร้างความรู้สึกสนุกสนาน และอบอุ่นในโมติจิตรของทางเจ้าภาพ หัวข้อของการจัดงานในปีนี้น่าจะกระตุ้นต่อมความสนใจของท่านไม่มากนักน้อย **“From Basic to New Therapeutic Approaches”** ดูเข้ากับยุคสมัยนี้จริงๆที่มีการค้นพบอะไรใหม่ๆและมีผลให้วิธีการรักษาปรับเปลี่ยนไปบ้างจนเราต้องคอยวิ่งไล่ตาม จะได้ไม่ตกยุค

ขอเชิญชวนสมาชิกนักเภสัชวิทยา และผู้สนใจการประชุมวิชาการประจำปีของสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทยไปร่วมเสนอผลงานทางวิชาการและพบปะสังสรรค์กันที่ขอนแก่นกันเยอะๆนะคะ เผลอๆอาจได้มีส่วนช่วยกระตุ้นเศรษฐกิจท้องถิ่น มีผ้าพื้นเมืองสวยติดไม้ติดมือกันมาแถมด้วยขนมอร่อยๆมาฝากเพื่อนฝูง มีข่าวแว่วๆว่าจะมีสมาชิกบางท่านวางแผนจะรวมตัวจัดทริปไปเที่ยวหลวงพระบางกัน อันนี้ยิ่งน่าสนใจขึ้นไปอีก แล้วไปเจอกันให้ได้นะคะ

สุพัตรา ศรีไชยรัตน์

บรรณาธิการวารสาร

RESEARCH ARTICLES

Contents, Pharmacokinetics and Cardiovascular Effects of Caffeine in Leading Caffeinated Drinks Sold in Thailand

Chaichan Sangdee¹, Jaroensri Khounvong², Supanimit Teekachunhatean¹,
Noppamas Rojanasthien¹

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. ²Department of Medical Science Chiang Mai Branch, Ministry of Public Health, Thailand.

Abstract

The objectives of this study were to measure the caffeine contents and to investigate the pharmacokinetic profile of caffeine after consumption of three leading caffeinated drinks in 12 Thai healthy young men. In addition, blood pressure and heart rate after consumption of caffeinated drinks were also measured. Each caffeinated drink (M-150, Krating Daeng, or Carabao Daeng) was administered to 12 volunteers according to a randomized three-phase crossover design with one week washout period. Blood samples were collected immediately before and at 10, 20, 30, 40, 50, 60 min, 1.50, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0, 15.0 h after ingestion. Blood pressure and heart rate were measured concurrently with each blood sample collection. Caffeine contents in caffeinated drinks and plasma caffeine concentrations were determined by using high performance liquid chromatography. Pharmacokinetic parameters were analyzed by using repeated measures ANOVA. The mean caffeine contents in the three caffeinated drinks were in the range of 51.59-54.44 mg/bottle which were in accordance with the specification of the Thai FDA. There were no significant differences in the mean values of C_{\max} , $AUC_{0-\infty}$, and $t_{1/2}$ of the three caffeinated drinks but T_{\max} of Krating Daeng and Carabao Daeng were slightly and significantly shorter than that of M-150. These caffeinated drinks did not produce significant effects on blood pressure and heart rate in healthy young men.

Keywords: caffeine, pharmacokinetics, cardiovascular effects

ปริมาณ เกสัชจลนศาสตร์ และผลต่อหัวใจและหลอดเลือดของกาแฟเย็นในเครื่องดื่มผสมกาแฟเย็นที่จำหน่ายในประเทศไทย

ชัยชาญ แสงดี¹ เจริญศรี ขวัญวงศ์² สุกนิมิตร ทิมชุนหะเถียร¹ นพมาศ โรจนเสถียร¹

¹ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

² ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เชียงใหม่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อวัดปริมาณของกาแฟเย็นและศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของกาแฟเย็นหลังจากดื่มเครื่องดื่มผสมกาแฟเย็นในอาสาสมัครชายไทยสุขภาพดี 12 ราย นอกจากนั้น ยังวัดความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจหลังจากดื่มเครื่องดื่มผสมกาแฟเย็นเหล่านี้ด้วย การศึกษานี้เป็นแบบข้ามสลับ 3 ระยะ โดยอาสาสมัครทั้ง 12 รายจะได้รับการสุ่มให้ดื่มเครื่องดื่มผสมกาแฟเย็นแต่ละชนิด (เอ็ม-150 หรือกระทิงแดง หรือคาราบาวแดง) และมีการเว้นช่วงระยะการให้เครื่องดื่มแต่ละชนิด 1 สัปดาห์ เก็บเลือดอาสาสมัครก่อนดื่มและที่เวลา 10, 20, 30, 40, 50, 60 นาที, 1.50, 2, 4, 8, 12 และ 15 ชั่วโมงหลังดื่มเครื่องดื่มแต่ละชนิด วัดความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจในเวลาเดียวกับที่เก็บตัวอย่างเลือด วัดปริมาณกาแฟเย็นในเครื่องดื่มแต่ละชนิดและความเข้มข้นของกาแฟเย็นในพลาสมาโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง วิเคราะห์ค่าตัววัดทางเภสัชจลนศาสตร์โดยวิธี repeated measures ANOVA ค่าเฉลี่ยของปริมาณกาแฟเย็นในเครื่องดื่มผสมกาแฟเย็นทั้งสามชนิดอยู่ในพิสัย 51.59-54.44 มก./ขวด ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดไว้โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ไม่พบความแตกต่างของความเข้มข้นสูงสุดของกาแฟเย็นใน พลาสมา ปริมาณกาแฟเย็นทั้งหมดในร่างกาย และค่าครึ่งชีวิตของกาแฟเย็นระหว่างเครื่องดื่มผสมกาแฟเย็นทั้งสามชนิด แต่พบว่าระยะเวลาที่ความเข้มข้นของกาแฟเย็นสูงสุดในพลาสมาของกระทิงแดงและคาราบาวแดงจะสั้นกว่าของเอ็ม-150 อย่างมีนัยสำคัญ เครื่องดื่มผสมกาแฟเย็นทั้งสามชนิดนี้ไม่มีผลที่สำคัญต่อความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจของอาสาสมัครชายไทยสุขภาพดี

คำสำคัญ: caffeine, pharmacokinetics, cardiovascular effects

Introduction

Caffeine, the most widely used central nervous system (CNS) stimulant has been found in more than 60 plant species, the most notable ones include coffee, tea, cola, cacao and guarana. Caffeine has impact on the CNS by increasing wakefulness, alertness, flow of thought and a sense of well being. These effects lead to its popular use worldwide. In addition to its CNS effects, caffeine also exerts effects on the cardiovascular system. The mode of caffeine consumption is usually by drinking coffee, tea, cola soft drinks, or chocolate. The favorable taste of the drinks and the stimulating effects of caffeine on the CNS are the bases of the popularity of these drinks. In the last few decades, another kind of drink containing caffeine or so called caffeinated drinks or energy drinks have gained amazing popularity worldwide. This trend poses public concern on the impact of caffeine on health and has led the Food and Drug Committee, Ministry of Public Health of Thailand to amend the lowering of caffeine content in the caffeinated drinks from 100 mg per serving originally to now 50 mg per serving¹. Although the annual sale of these caffeinated drinks is enormous, reaching several hundred billion dollars globally, relatively few studies have yet addressed the effects of these drinks on the cardiovascular system. There are, however, numerous studies dealing the effects of caffeine in the form of pure compound or in coffee on the cardiovascular system. Caffeinated drinks contain not only added caffeine but also vitamins, sugar, flavoring agents and other substances and their contributions to the cardiovascular effects in addition to caffeine are largely not known. Some consumers have complained of palpitation after consumption of these caffeinated drinks and caffeine in these drinks is to be blamed. The purposes of the study were to measure the actual contents of

caffeine in various caffeinated drinks and to evaluate its pharmacokinetics and the cardiovascular effects after the consumption of these drinks in healthy Thai volunteers.

Materials and Methods

Three leading caffeinated drinks selected for this study were M-150 (Osotspa Co. Ltd.), Krating Daeng (T.C. Pharmaceuticals Co. Ltd.), and Carabao Daeng (Carabao Tawan Daeng Co. Ltd.). All these caffeinated drinks stated in the label that they contain 50 mg of caffeine in 150-ml bottle.

Determination of caffeine content in caffeinated drinks

The assay of caffeine content was modified from the high performance liquid chromatography (HPLC) method previously described by Tanaka² with UV detection at 274 nm. Chromatographic separation was performed on the 5 μ m C18, 100 x 4.6 i.d. analytical and guard columns. The mobile phase used was 100 mM NaH₂PO₄/MeOH (70/30 v/v) which was pumped through the column at a flow rate of 0.6 ml/min and at column temperature of 25 °C. The injection volume was 20 μ l. Caffeine was separated at the retention time (RT) of 5.4- 5.9 min. The calibration curve of caffeine ranging from 0.15-2.5 μ g/ml was prepared in mobile phase to establish the calibration curve for validation assay. Six bottles of each caffeinated drink were mixed and diluted with mobile phase to approximately 2.0 μ g/ml concentration of caffeine. Twenty microliter of each caffeinated sample solution was injected into HPLC system. Caffeine contents in caffeinated drinks were determined by interpolating the peak heights of caffeine in the drinks with that of the calibration curve.

Pharmacokinetics of caffeine in caffeinated drinks

Study design and subjects

The study design was a single serving administration of the assigned caffeinated drink, randomized three-phase crossover with at least one-week washout period. The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Chiang Mai University and was in compliance with the Helsinki Declaration. Male subjects, aged between 18-35 y were recruited and interviewed before the study. The body mass index (BMI) of subjects was within 18-25 kg/m². All were in good health on the bases of medical history, laboratory findings and physical examination. Subjects to be included in the study were given thorough verbal and written information regarding the nature of the study. A total of 12 men were recruited into the study. Signed informed consent of every subject was obtained prior to the study. Subjects who regularly consumed and could not avoid foods or drinks that contain caffeine were excluded as well as those with known history of chronic renal, liver, and cardiovascular diseases. Recent smokers of cigarette or other tobacco products, a history of substance abuse or addiction and use of drugs within the previous 4 weeks were also excluded.

Dosage and administration of caffeinated drinks

Subjects were admitted to the Clinical Pharmacology Unit, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University at 5.30 AM. Subjects were fasted overnight for at least 8 h. Subjects were randomized to receive 150 ml either of M-150, Krating Daeng, or Carabao Daeng with 50 ml of water at 6.00 AM. Subjects were remained upright and were fasted for 2 h after caffeinated drink consumption. Water and lunch were served at 4 h after dosing. Blood samples were collected as stated below. After the last blood sample collection at 15 h subjects were

discharged from the Clinical Pharmacology Unit. After 1-week wash-out period, subjects received the alternative drink and blood samples were collected in the same manner. Identical meal and fluid were served during the 3 study periods.

Plasma sample collection

Venous blood samples (8 ml) were taken into heparinized tubes before and at 0.17, 0.33, 0.50, 0.67, 0.83, 1, 1.5, 2, 4, 8, 12, and 15 h after the drink. Plasma was separated within 1 h by centrifugation at 2,250 rpm for 30 min. Plasma samples were stored at -20 °C until analysis.

Determination of caffeine in plasma

Caffeine in plasma was quantified by the HPLC method with UV detection at 274 nm after solid phase extraction (SPE) procedure previously described by Biaggioni et al³. Chromatographic separation of caffeine was done and mobile phase used was the same as described above. The calibration curve of caffeine ranging from 0.15-2.0 µg/µl was prepared in plasma to construct the calibration curve for validation assay. The linear regression analysis of peak-height ratio of caffeine vs caffeine concentrations consistently yielded coefficients of determination (r^2) of 0.998 or better. Plasma caffeine concentrations were derived from the standard calibration curves using linear regression. Five sets of 3 different concentrations (0.45, 0.9, 1.8 µg/ml) of quality control (QC) samples were analyzed on the same day and a single calibration curve run concurrently for validation of intra-day precision and on 5 separate days with 5 concurrent calibration curves for validation of inter-day precision. The average coefficients of variation (CV) for intra-day and inter-day assay were 1.80% and 4.15%, respectively. The lower limit of quantification (LLOQ) was 0.15 µg/ml (% CV = 3.75) and the mean recovery of

caffeine determined from 5 aliquots of each levels of the QC samples was 93.33%. The average freeze-thaw stability of caffeine in plasma after 3 freeze-thaw cycles was determined to be 101.79%.

Pharmacokinetic analysis

The maximal plasma concentration (C_{\max}) and time to the maximal concentration (T_{\max}) were obtained directly by visual inspection of each subject's plasma concentration-time profile. The area under the plasma concentration-time curve from time 0-15 h (AUC_{0-15}) and 0-infinity ($AUC_{0-\infty}$) as well as the half life ($t_{1/2}$) were determined by non-compartmental analysis. The slope of the terminal log-linear portion of the concentration-time curve was determined by least-squares regression analysis and was used as the elimination rate constant (k_e). The elimination $t_{1/2}$ was calculated as $0.693/k_e$. The AUC from time zero to the last quantifiable point (AUC_{0-15}) was calculated using the trapezoidal rule. Extrapolated AUC from time t to infinity ($AUC_{t-\infty}$) was determined as C_t/k_e . Total AUC was the sum of $AUC_{0-15} + AUC_{15-\infty}$. In this study, the sampling time was continued for more than 3 times the $t_{1/2}$ therefore, the AUC_{0-15} was sufficient to cover at least 80% of the total AUC. The calculation was performed using the TopFit software version 2.0 for personal computer.

Measurement of blood pressure and heart rate

Blood pressure and heart rate were measured by using Omron Digital Blood Pressure Monitor (Intelli Sense™, Model HEM-711, Omron Healthcare, Inc.). Systolic and diastolic blood pressure and heart rate measurements were done prior to drinking of the designated caffeinated drink and at 10, 20, 30, 40, 50, 60 min, 1.5, 2, 4, 8, 12, and 15 h after the drink. Subjects maintained a relaxed and semi-

recumbent position while the blood pressure and heart rate were monitored.

Statistical analysis

The pharmacokinetic parameters and cardiovascular parameters were presented as mean \pm SD. The differences between the mean values of C_{\max} , T_{\max} , $t_{1/2}$, $AUC_{0-\infty}$, systolic and diastolic blood pressure, and heart rate obtained after the 3 caffeinated drinks were statistically analyzed by using repeated measures ANOVA. Relationship of maximal caffeine concentration and change in systolic and diastolic blood pressure and heart rate were analyzed by using Pearson correlation

Results

Caffeine contents in caffeinated drinks

At least six bottles each of the three different caffeinated drinks were measured for caffeine contents. The mean caffeine contents per 150-ml bottle were 50.56 mg for M-150, 51.65 mg for Krating Daeng, and 52.88 mg for Carabao Daeng, represented 101.11%, 103.31%, and 105.75%, respectively of labeled amount/bottle.

Pharmacokinetics of caffeine in healthy men

A single bottle administration of the three caffeinated drinks in 12 healthy male volunteers was well tolerated and all subjects completed the study without any adverse effects. After the subjects drank the assigned caffeinated drinks, plasma concentrations of caffeine rose sharply and slowly declined to almost undetectable at 15 h. The mean plasma concentration-time profiles of the three drinks were almost identical (Fig 1). Comparison of pharmacokinetic parameters of caffeine after consumption of the three caffeinated drinks is shown in Table 1. The mean C_{\max} of the three drinks were comparable and not significantly different, being $1.30 \pm$

0.27, 1.42 ± 0.40 , and 1.42 ± 0.34 $\mu\text{g/ml}$ for M-150, Krating Daeng, and Carabao Daeng, respectively. The mean $\text{AUC}_{0-\infty}$ of the three drinks were not significantly different (9.62, 9.12, and 9.00 $\mu\text{g.h/ml}$ for M-150, Krating Daeng, and Carabao Daeng, respectively). The mean $t_{1/2}$ of the three drinks were 5.42, 5.26, and 5.09 h for M-150, Krating Daeng, and Carabao Daeng, respectively and did not differ significantly. However, the mean T_{max} of M-150 (0.87 h) was significantly longer ($p < 0.05$) than those of Krating Daeng (0.51 h) and Carabao Daeng (0.53 h).

Cardiovascular effects of caffeinated drinks in healthy men

The mean values of systolic blood pressure, diastolic blood pressure and heart rate before and after the specified time following administrations of the three caffeinated drinks are shown in Table 2. There were no differences of these parameters between baseline and after administration of each caffeinated drink, except the diastolic blood pressure at 12 h for M-150 was significantly lower than the value at baseline. In addition, when the mean changes in systolic blood pressure, diastolic blood pressure and heart rate were compared among the three caffeinated drinks, the results showed no significant difference. However, there was a tendency of decline in systolic and diastolic blood pressure and heart rate 2-8 h after consumption of caffeinated drinks. No correlation between C_{max} and changes in systolic blood pressure, diastolic blood pressure and heart rate ($r^2 = 0.0$) were found (Fig. 2).

Discussion

This is the first study of the pharmacokinetics of caffeine and the cardiovascular effects after consumption of caffeinated drinks in Thai healthy young men. The mean caffeine contents in the three caffeinated drinks were in

the range of 50.56-52.88 mg/bottle which were in accordance with the regulation of Thai FDA⁴. The pharmacokinetics of caffeine and its effects on the cardiovascular effects after ingestion of the caffeinated drinks under the present study were therefore in these dose ranges. Pharmacokinetic parameters of caffeine in our study were $\text{AUC}_{0-\infty}$, C_{max} , T_{max} , and $t_{1/2}$. We found no differences of these parameters among the three caffeinated drinks except a slightly longer T_{max} of caffeine in M-150. T_{max} was in the range of 0.51-0.87 h (approximately 30-45 min) and translates into rapid absorption. This is what to be expected since all studied drinks are in clear solution and the absorption of caffeine should therefore, be rapid. After caffeine reaches the systemic circulation, its pharmacokinetic behaviors must follow the unique characteristics of caffeine whether it is contained in M-150, Krating Daeng or Carabao Daeng. The C_{max} (1.30-1.42 $\mu\text{g/ml}$), T_{max} (0.51-0.87 h) and $t_{1/2}$ (5.09-5.42h) of caffeine in these drinks in line with those previously reported in literatures⁵⁻⁷.

Although several studies have reported caffeine effects on systolic blood pressure, diastolic blood pressure and heart rate but it is still a controversial issue whether caffeine increases, decreases or has no effects on them. This may be due to the differences in the nature of study (acute or chronic), the sources of caffeine (coffee, tea, or pure caffeine) and the doses of caffeine used. For example, Robertson *et al* found that after administering 250 mg of caffeine to 9 healthy participants produces 14 and 10 mmHg increase in systolic and diastolic blood pressure, respectively at 1 hour after caffeine ingestion.⁸ Whitsett *et al* reported that administering 2.2 mg/kg of caffeine to 54 participants increases systolic and diastolic blood pressure by 9 and 10 mm Hg, respectively and decreases heart rate by 10 beats/min⁹.

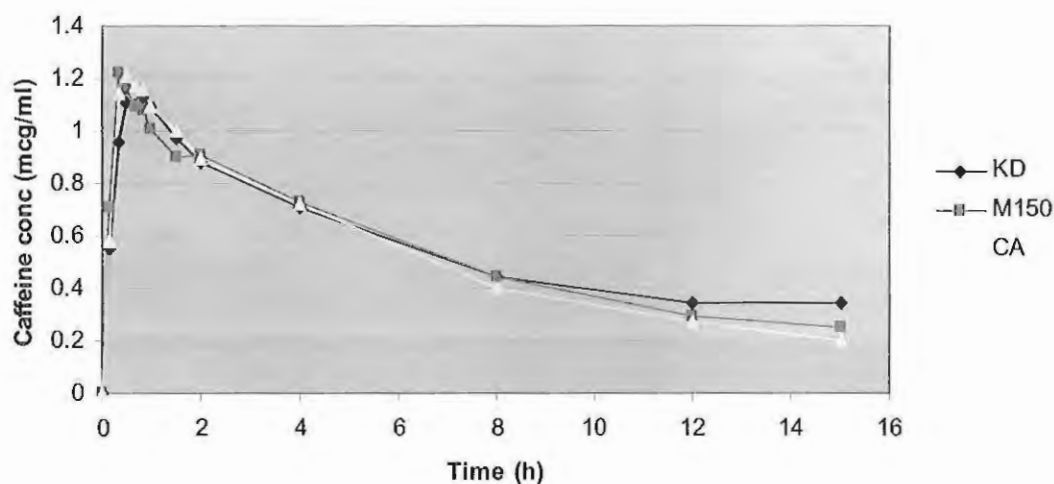


Figure 1 Mean plasma caffeine concentration-time curves after single oral administration of caffeinated drinks. M150 = M-150, KD = Krating Daeng, CA = Carabao Daeng.

Table I Pharmacokinetic parameters after single oral administration of caffeinated drinks.

Subject No.	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)			$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$)			T_{max} (h)			$t_{1/2}$ (h)		
	M150	KD	CA	M150	KD	CA	M150	KD	CA	M150	KD	CA
1	1.64	1.86	1.58	14.48	14.19	12.92	1.00	0.33	0.67	7.66	7.31	5.85
2	1.34	1.50	1.36	11.27	9.32	8.01	0.83	0.33	0.33	6.02	7.10	5.59
3	0.67	0.84	0.85	4.32	5.56	7.57	0.83	0.83	0.33	3.17	7.16	6.60
4	1.29	1.51	1.02	6.80	6.96	9.56	0.50	0.33	0.83	5.34	5.69	5.90
5	1.01	1.29	1.39	6.53	4.13	7.02	0.83	0.33	0.33	3.71	2.80	4.41
6	1.23	0.87	1.35	4.04	2.35	5.87	0.67	0.33	0.67	3.98	1.40	3.64
7	1.48	1.61	1.39	16.35	16.16	8.64	1.00	0.50	0.50	7.87	7.27	4.58
8	1.50	1.82	2.22	16.32	11.21	13.23	1.50	0.33	0.33	8.28	4.58	6.73
9	1.29	1.81	1.50	6.26	7.38	6.07	0.83	0.50	0.50	3.79	3.25	2.99
10	1.19	1.03	1.39	7.07	8.27	9.47	1.00	1.00	0.83	4.96	4.75	5.44
11	1.28	1.86	1.72	13.51	15.32	11.67	1.00	0.33	0.50	6.14	7.37	5.56
12	1.67	1.02	1.24	8.49	8.64	8.01	0.50	1.00	0.50	4.09	4.42	3.78
Mean	1.30	1.42	1.42	9.62	9.12	9.00	0.87	0.5*	0.5*	5.42	5.26	5.09
SD	0.27	0.40	0.34	4.55	4.37	2.47	0.27	0.27	0.19	1.78	2.05	1.20
Median							0.83	0.33	0.50			

* Significantly differed from M-150; M150 = M-150, KD = Krating Daeng, CA = Carabao Daeng

Haller *et al* and Pincomb *et al* administered 200 mg and 3.3 mg/kg of caffeine, respectively, and found statistically significant increase in blood pressure in both studies while there is a decrease in or no change in heart rate^{6,10}. On the contrary, some studies using smaller doses reported no changes in blood pressure and heart rate. The study

of Benowitz on 25 mg of caffeine administered intravenously reported no changes in systolic and diastolic blood pressure and heart rate¹¹. Astrup *et al* studied several doses of caffeine on cardiovascular system and reported that 100-mg and 200-mg doses of caffeine do not increase systolic and diastolic blood pressure or heart rate¹². Castiglia *et al*

caffeinated drinks has no effect on systolic and diastolic blood pressure and heart rate. However, we found significant decrease in diastolic blood pressure at 12 hours after drinking M-150 only and considered to be of no clinical significance. Although some studies reported increase in blood pressure and/or heart rate after ingestion of caffeine in the form of coffee or tablets containing caffeine, the doses of caffeine in those studies were 4-6 times higher than the present study^{6,8-10}. Even at these high doses of caffeine, the effects on heart rate is mostly bradycardia or not change in the rate^{6,9-15}. Nevertheless, the Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure by National Institute of Health, National Heart Lung, and Blood Pressure and National High Blood Pressure Education Program states that "caffeine may raise blood pressure acutely, tolerance to this pressor effect develops rapidly, and no direct relationship between caffeine intake and elevated blood pressure has been found in most epidemiological surveys"¹⁷. We also found no relationship between caffeine concentrations and changes in systolic and diastolic blood pressure and heart rate ($r^2 = 0$) which can be implied that at any or even at the maximum caffeine concentrations of 1.30-1.42 $\mu\text{g/ml}$ produced by the dose in the drinks did not actually have any appreciable effects on the cardiovascular system.

All subjects recruited in our study were refrained from consumption of beverage and food containing caffeine before and during the study period. In addition, washout period was sufficiently long to ensure to clearance of caffeine from the body. Therefore, the effects observed in this study cannot be accounted by tolerance to the effects of caffeine. There were no subjects complaining of palpitation in the present study.

Limitations of the present study are the small number of subjects and the caffeinated drinks used in this study contain not only caffeine but also other substances that are not present in coffee and tea and generalization of caffeine effects in these different beverages should be done cautiously. In conclusion, the mean caffeine contents in the three caffeinated drinks were in accordance with the specification of the Thai FDA. There were no significant differences in the mean pharmacokinetic values among the three caffeinated drinks. Our study found that 50 mg of caffeine in these caffeinated drinks has no significant effects on systolic and diastolic blood pressure and heart rate.

References

1. จรรยาบรรณในการโฆษณาเครื่องดื่มที่ผสมกาแฟอื่น: คณะอนุกรรมการวิชาการและประเมินผลในการจัดอบรมสัมมนาผู้ปฏิบัติงานคุ้มครองผู้บริโภคด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพ: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา: คู่มือพนักงานเจ้าหน้าที่ตามกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา 2540: หน้า 105.
2. Tanaka E. Simultaneous determination of caffeine and its primary demethylated metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1992; 575: 311-4.
3. Biaggioni I, Paul S, Robertson DA. Simple liquid chromatographic method applied to determine caffeine in plasma and tissue. *Clin Chem* 1988; 34(11): 2345-8
4. ที่ สธ.0803/2/9971 ลงวันที่ 6 กันยายน.2543 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ จังหวัดนนทบุรี 11000.
5. Haller CA, Jacob III P, Benowitz NL. Pharmacology of ephedra alkaloids and caffeine after single-dose dietary supplement use. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 71: 421-32.
6. Haller CA, Jacob III P, Benowitz NL. Pharmacodynamics and drug action: Enhanced stimulant and metabolic effects of combined ephedrine and caffeine. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75: 259-73.

7. Cheng WSC, Murphy TL, Smith MT, Cooksley WGE, Halliday JW, Powell LW. Dose dependent pharmacokinetics of caffeine in human: Relevance as a test of quantitative liver function. *Clin Pharmacol Ther* 1990; 47: 516-24.
8. Robertson D, Frolich JC, Carr RK. Effects of caffeine on plasma renin activity, catecholamines and blood pressure. *N Engl J Med* 1978; 298: 181-6.
9. Whitsett TL, Manion CV, Christensen HD. Cardiovascular effect of coffee and caffeine. *Am J Cardiol* 1984; 53: 918-22.
10. Pincomb GA, Lovallo WR, Passey RB, Whitsett TL, Silverstein SM, Wilson MF. Effect of caffeine on vascular resistance, cardiac output and myocardial contractility in young men. *Am J Cardiol* 1985; 56:119-22.
11. Benowitz NL, Jacob III P, Mayan H, Denaro C. Sympathomimetic effects of paraxanthine and caffeine in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 58: 684-9.
12. Astrup A, Toubro S, Cannon S, Hein P, Breum L, Madsen J. Caffeine: A double-blind, placebo-controlled study of its thermogenic, metabolic, and cardiovascular effects in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1990; 51: 759-67.
13. Casiglia E, Paleari CD, Petuccio S, Bongiovi S, Colangeli G, Baccilieri MS, Pavan L, Pernice M, Pessina AC. Haemodynamic effects of coffee and purified caffeine in normal volunteers: A placebo-controlled clinical study. *J Hum Hypertens* 1992; 6: 95-9.
14. Casiglia E, Bongiovi S, Paleari CD, Petuccio S, Boni M, Colangeli G, Penzo M, Pessina AC. Haemodynamic effects of coffee and caffeine in normal volunteers: A placebo-controlled clinical study. *J Int Med* 1991; 229: 501-4.
15. Newcombe PF, Renton KW, Rautaharju PM, Spencer A, Montague TJ. High-dose caffeine and cardiac rate and rhythm in normal subjects. *Chest* 1988; 94(1): 90-4.
16. Alford C, Cox H, Wescott R. The effects of Red Bull energy drink on human performance and mood. *Amino Acid* 2001; 21:139-50.
17. National Institute of Health, National Heart Lung, and Blood Pressure and National High Blood Pressure Education Program. The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *NIH Publication No. 98-4080*; November 1997.

RESEARCH ARTICLE

A Bio-Analytical Method for the Determination of Nelfinavir in Plasma

Jinda Wangboonskul¹, Julrat Konsil¹ and Raymond Gordon Reid²

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

² School of Pharmacy, Robert Gordon University, Aberdeen, UK.

Abstract

Nelfinavir mesylate is a non-peptidic protease inhibitor that shows activity against HIV-1 and HIV-2. It is more slowly absorbed than other HIV-1 protease inhibitors and the absorption is enhanced by administration of the drug with food. Intra-individual and inter-individual variability of nelfinavir concentration in plasma are largely as a consequence of variable absorption which reflects the unpredictable nature of nelfinavir absorption. A method has been developed which is both sensitive and selective for the determination of nelfinavir in plasma, for use in a pharmacokinetic study. Both nelfinavir and saquinavir show adequate separation from the endogenous components indicating the specificity of the pretreatment and chromatography procedure. The assay has been validated over the range 20.4 to 2,040 ng/mL using $n=5$. The extraction recoveries of nelfinavir and saquinavir (internal standard) using the solid-phase extraction method described is greater than 64.8 and 75.5%, respectively. The calibration curve was linear over the range 20.4 to 2,040 ng/mL with the coefficient of determination of 0.999. Both inter-day and intra-day coefficients of variation were less than 6% for all concentrations. The limit of detection was 6.5 ng/mL while the limit of quantitation was 20.4 ng/mL. Average accuracies at three concentrations were in the range 98.4% to 102.0%. The method is suitable for the pharmacokinetic study of nelfinavir.

Keywords: Nelfinavir, Saquinavir, Pharmacokinetic

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณ nelfinavir ในพลาสมา

จินดา หวังบุญสกุล¹, จุลรัตน์ คนศิลา¹, เรย์มอนด์ ริด²

¹ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

² โรงเรียนเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยโรเบิร์ตกอร์ดอน อเบอร์ดีน สหราชอาณาจักร

บทคัดย่อ

เนลฟีนาเวียร์ มีโซเลต (Nelfinavir mesylate) มีฤทธิ์ต้าน HIV-1 และ HIV-2 อยู่ในกลุ่ม non-peptidic protease inhibitor ยาตัวนี้ดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ช้ากว่า HIV-1 protease inhibitor ตัวอื่น การดูดซึมยาจะเพิ่มขึ้นเมื่อให้ยาพร้อมอาหาร การที่ระดับความเข้มข้นของยาในพลาสมามีความแปรปรวนในบุคคลและระหว่างบุคคลสูง จึงทำให้การทำนายการดูดซึมยาทำได้ยาก วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนามีความเฉพาะเจาะจงสังเกตได้จากโครมาโตแกรมภายหลังการสกัดด้วย solid-phase ที่ทั้งเนลฟีนาเวียร์ (nelfinavir) และ ซาควินาเวียร์ (saquinavir) ไม่ถูกรบกวนจากพลาสมา ร้อยละของการสกัดได้เกินมากกว่า 64.8 และ 75.5 ตามลำดับ วิธีวิเคราะห์ถูกประเมินความน่าเชื่อถือในช่วงความเข้มข้น 20.4–2,040 นก./มล เส้นกราฟมาตรฐานสัมพันธ์เป็นเส้นตรงด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.999 %CVของการวิเคราะห์ซ้ำภายในหนึ่งวันและระหว่างวันมีค่าน้อยกว่า 6 ในทุกความเข้มข้น ขีดจำกัดของการตรวจวัดคือ 6.5 นก./มล ขีดต่ำสุดของการหาปริมาณคือ 20.4 นก./มล ค่าเฉลี่ยของความถูกต้องหาจากสามความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 98.4% ถึง 102.0% จึงสรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้เหมาะสมสำหรับการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยา nelfinavir

คำสำคัญ: เนลฟีนาเวียร์, ซาควินาเวียร์, เภสัชจลนศาสตร์

Introduction

Nelfinavir mesylate (Figure 1), is a white or off white amorphous powder, and is formulated as a basic amine salt of methansulphonic acid. It is a nonpeptidic protease inhibitor that is active against both HIV-1 and HIV-2. Nelfinavir is recommended for the treatment of HIV infection in adults and children in combination with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Nelfinavir is given by mouth as the mesylate salt, but doses are expressed in terms of the base. An adult dose of 1.25 g twice daily or 0.75 g three times daily is normally administered with food¹. Children aged 2 to 13 years may be given 20 to 30 mg per kg body-weight, three times daily in oral powder or suspension dosage forms.

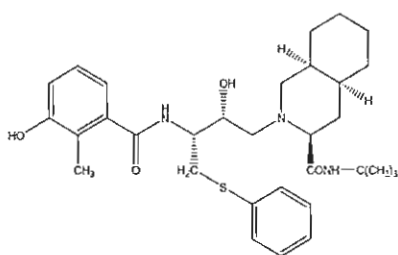


Figure1 Chemical structure of nelfinavir mesylate.

The absorption of nelfinavir is much slower than other HIV-1 protease inhibitors. The peak and trough nelfinavir concentrations after administration of 750 mg three times a day in adults are 2.9 and 1.2 µg/ml, respectively². The area under the curve (AUC) for the period from 0 to 8 hours ranged from 3.62 - 36.06 µg.hr/ml³. The time to peak concentration has been determined as 2 to 4 hours with the terminal half-life between 3.5 to 5 hours⁴. Nelfinavir absorption is enhanced by administration with food. A moderate fat meal increases the peak concentration and AUC, two to three folds when compared to fasting

condition¹. The recommended administration for nelfinavir is that it is taken with a meal or light snack⁴. Intra-individual and inter-individual plasma nelfinavir concentrations variability is considered largely due to the variable absorption which reflects on the unpredictable nature of nelfinavir absorption.

Nelfinavir undergoes oxidative metabolism in the liver primarily by CYP2C19 but also by CYP3A4 and CYP2D6. Its major hydroxyl-*t*-butylamide metabolite, M8, is formed by CYP2C19 and has *in vitro* antiviral activity equal to that of the parent drug. This is the only known active metabolite of HIV protease inhibitor. M8 concentrations are 30% to 40% those of parent drug. Nelfinavir and its metabolites are eliminated mainly in feces, with less than 2% of drug excreted unchanged in the urine. Liver disease may prolong the half-life and increase plasma concentrations of the parent drug while lowering plasma concentrations of M8. So the concomitant administration of agents that induce enzymes CYP2C19 and CYP3A4 and nelfinavir may be contraindicated. Nelfinavir is greater than 98% bound to plasma proteins, mostly to albumin and α_1 -acid glycoprotein. It is present in CSF at less than 1% of plasma concentrations⁵. The distribution into breast milk is not known⁴. The most important side effect of nelfinavir is diarrhea or loose stools. Otherwise, nelfinavir is generally well tolerated but has been associated with glucose intolerance, elevated cholesterol levels, and elevated triglycerides. Nelfinavir is well tolerated in pregnant HIV-infected women and shows no evidence of teratogenesis. The drug also has been used in HIV-infected patients with significant hepatic dysfunction without evidence of untoward toxicity despite higher drug concentrations⁶.

µg/ml of saquinavir in methanol) were added to 1.2 ml of plasma, vortexed, and then centrifuged at 13000 rpm for six minutes. A 2 ml aliquot was added to a C18 Bond Elut[®] cartridge previously wetted with 2 ml methanol and subsequently conditioned with 2 ml of 2.5% phosphoric acid. The Bond Elut[®] cartridge was washed with 2 ml of 2.5% phosphoric acid followed by 1 ml of acetone. Nelfinavir was eluted with 1 ml of 0.005% perchloric acid in methanol. The acid methanol extract was evaporated to dryness in a stream of nitrogen at 40°C and the residue reconstituted in 100 µl of 60% acetonitrile in water immediately before chromatography. A 20 µl sample was injected into the chromatographic system.

Method Validation

Specificity

Specificity (selectivity) of the analytical method was by comparison of the chromatograms obtained for plasma blank and spiked plasma sample. The blank and spiked sample showed no interference from endogenous substances.

Recovery

Plasma was spiked with an aqueous solution of nelfinavir to provide concentrations of 0.51, 1.02 and 1.53 µg/ml respectively. These samples were subjected to the pretreatment procedure described previously and 20 µl of the final extract was injected and peak heights recorded. These were compared with the peak heights obtained by injection of 20 µl of samples containing 5.1, 10.2 and 15.3 µg/ml of nelfinavir in 60% acetonitrile in water. This allows for the ten folds concentration stage incorporated during the pretreatment process.

Accuracy

Five separate sets of plasma spiked with nelfinavir at concentrations of 0.51, 1.02 and 1.53 µg/ml were prepared and subjected to the analytical method described previously. The amount of nelfinavir in each spiked sample was then determined using one calibration line obtained in the same run. Results for the mean value of nelfinavir found were compared to the true value.

Intra and Inter-day Precision

Five separate sets of plasma spiked with nelfinavir at concentrations of 0.51, 1.02 and 1.53 µg/ml were prepared. The amount of nelfinavir in each spiked sample was determined, using one calibration line obtained in the same run for intra-day precision. The inter-day precision was determined by repeated analysis over five different days. The coefficient of variation (%CV) was then calculated.

Calibration procedure

Blank plasma was spiked with nelfinavir to provide seven concentrations over the range 20.4-2040 ng/ml. A blank plasma sample was included in all calibration procedures. Peak height measurements were made at ranges between 0.005-0.02 AUFSD. Calibration equations were obtained by linear regression of peak height ratio on concentration in the plasma.

Limits of Detection (LOD) and Quantitation (LOQ)

The LOD for nelfinavir in plasma was determined by injecting successively lower concentrations until a signal/noise ratio of approximately 3 was obtained at a detector range of 0.01 AUFSD. The LOQ is defined as the lowest concentration of nelfinavir that can be determined with acceptable precision and accuracy under the stated experimental conditions. The LOQ was estimated by analyzing samples with

known amounts of nelfinavir, at progressively lower concentrations, starting at the lower end of the calibration curves. The LOQ was considered as the concentration level in which accuracy and precision were still better than 20%.

Stability

The long-term stability

In this study was designed for two months which exceeded the time between the date of first sample collection and the date of last sample analysis. Long-term stability was determined by storing three aliquots of each of the low and high concentrations at -20°C in the same freezer as the study samples. The samples are analyzed in every second week after storage. The concentrations of all the stability samples were compared to the mean of back-calculated values for the standards at the appropriate concentrations from the first day of long-term stability testing.

Freeze and thaw stability

The nelfinavir stability was determined after three freeze and thaw cycles. Three aliquots of each of the low and high concentration were stored at -20°C for 24 hours and thawed unassisted at room temperature. When completely thawed, the samples are frozen again for 12-24 hours at -20°C . This was repeated twice more and the remaining nelfinavir determined.

Short term stability

Three aliquots of the low and high concentration are thawed at room temperature and kept at the room temperature for 0, 6 and 12 hours. The nelfinavir was then determined.

Post preparative stability

The remaining nelfinavir concentrations are determined at 0, 6 and 12 hours after processed samples.

The stability of nelfinavir and saquinavir (internal standard) are assessed over the anticipated run time for the batch size of the samples by determining concentrations on the basis of original calibration standards.

Clinical Protocol

The clinical protocol was approved, based on the Declaration of Helsinki, by the Ethics Committee of Khon Kaen University, Thailand. The no. is HE460725, 18 September 2003.

The inclusion criterion for healthy volunteers was as follows: The volunteers should be aged between 18-45 years. The weight and height of the volunteers should be in the normal range (i.e. body mass index between $18\text{-}24\text{ kg/m}^2$ or within $\pm 10\%$ ideal body weight). Blood analysis should be normal for liver and kidney function. Volunteers should have no medical history of cardiovascular, liver, kidney, alimentary, allergy and immune systems problems. All volunteers should be non smokers with no history of alcohol or drug abuse. The volunteers were required to sign the consent form agreeing to the study after full details of the study were explained to them.

The exclusion criterion was: Allergic reaction to nelfinavir and previous use of nelfinavir.

The criterion for withdrawal from the study was: The volunteer elected to withdraw from the study; the volunteer was suffering from some illness or was subject to adverse effects from the nelfinavir.

The study was a randomized crossover design. Twenty healthy volunteers were enrolled in the study. The subjects had fasted from 24.00 pm the previous night. On the day of the study, subjects had to be present at the investigation unit at 8.00 am. The i.v. catheter fitted with a three-way stopcock was inserted into the

antecubital vein of one arm and the patient maintained with normal saline. Blood samples (5 ml) were taken from each volunteer to provide a baseline measurement. The volunteers then had breakfast (rice boiled with chicken which was considered as high calorie food). Immediately after the meal, one 250 mg nelfinavir tablet was then taken with a glass of water. The dose administered was one-third to one-fifth of the normal clinical dose was selected to minimize dose-related adverse effects of nelfinavir in healthy volunteers. Blood (5 ml) was then sampled at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 and 24 hours after administration of the nelfinavir tablet. The volunteers were allowed to take usual food after 10.30 am. Each blood sample was centrifuged and plasma samples were stored at -20°C until chromatographic analysis at a later date.

Results and Discussion

Figure 2 show chromatograms of an aqueous standard of each and a mixture respectively, the resolution between nelfinavir and IS is greater than 1. It was decided to use solid phase extraction as the method of choice for extraction but the recovery problems had to be investigated. This was done by using different methods to reduce protein binding and to improve the washing stage to remove endogenous material. To prevent protein binding of nelfinavir, 1 ml of 2.5% phosphoric acid is added to 1.2 ml of plasma sample. This markedly improves the reproducibility of the method. To clean up the endogenous materials from the plasma, various solvents were tested. Acetone was found to be the best choice for the washing phase and markedly reduced the interference from endogenous substances. The recoveries for various concentrations of nelfinavir and one concentration of IS are shown in Table

1 along with %CV. The resolution measured in water is maintained in the biological matrix as shown in Figure 3. Both nelfinavir and IS also show complete separation from any endogenous components, indicating the specificity of the pretreatment and chromatography procedures.

Table 2 shows the concentrations found in each sample along with %CV for 5 determinations. It can be seen that in all cases the accuracy expressed as a percentage of spiked concentration found is between 98-102% with %CV between 2.12 and 4.42%.

The precision of the proposed assay method inter and intra-day is shown in Table 3. The results were obtained by repeated analysis of spiked plasma samples over a period of one day. Inter and intra-day precision for nelfinavir is expressed as the coefficient of variation (%CV). For intra-day precision the %CV was less than 4.22% while for inter-day the %CV was less than 5.93%.

Table 4 indicates the constancy of the slope of the calibration line over a period of five days. The %CV for the slope was less than 6%. A single calibration line obtained from eight concentrations of nelfinavir spiked in plasma over the range 0-2.04 $\mu\text{g/ml}$ is shown in Figure 4, the coefficient of determination (r^2) was 0.999. The LOD was determined as 6.5 ng/ml and the LOQ was determined as 20.4 ng/ml with a %CV of 13.7%.

The results of long term stability of nelfinavir spiked in plasma, stored in -20°C freezer for a period of 8 week is shown in Table 5. The decomposition of nelfinavir was negligible at concentrations of 0.5 and 1.5 $\mu\text{g/ml}$. This is in agreement with other published results²¹.

Table 6 shows the percentage of nelfinavir determined after three freeze and thaw cycles for the low and high concentration was 108.51 and

107.35 respectively when compared to the freshly prepared spiked samples. The concentration of nelfinavir was determined from three aliquots of the low and high concentrations of spiked plasma samples after thawing and storage at room temperature for 6 and 12 hours. The %CV was 3.1 and 2.5 for the low and high concentrations, respectively, which is under the required limit of $\pm 15\%$ ²². Samples of low and high concentration nelfinavir in plasma were extracted and reconstituted and stored for 6 and 12 hours at room temperature. The concentration of nelfinavir was determined and the % CV was 5.9 and 4.3% respectively, which is inside the required $\pm 15\%$.

The validated method was applied to the pharmacokinetic study. Figure 5 shows chromatogram obtained from consequence manual injection of plasma samples of a volunteer, blood collected at 0, 1 and 2 hours after administration of a single

oral dose of 250mg of nelfinavir, with internal standard.

The pharmacokinetic parameters calculated using the individual concentration-time profiles from this study are listed in Table 7. Four out of 20 subjects were not in the inclusion criteria and one elected to withdraw from the study. The results from 15 subjects show that the peak plasma level (C_{max}) ranged from 868-2666 ng/ml, the area under the curve ($AUC_{0-\infty}$) ranged from 4.9-32.4 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, the time to peak concentration (T_{max}) was between 2-5 hours and the elimination half-life ($t_{1/2}$) was between 1.9-4.9 hours. The results show high inter-individual variation among subjects (%CV > 30) for the pharmacokinetic parameters. This was significant in subject no. 19. The mean plasma concentration vs time profile in 15 subjects for nelfinavir is shown in Figure 6.

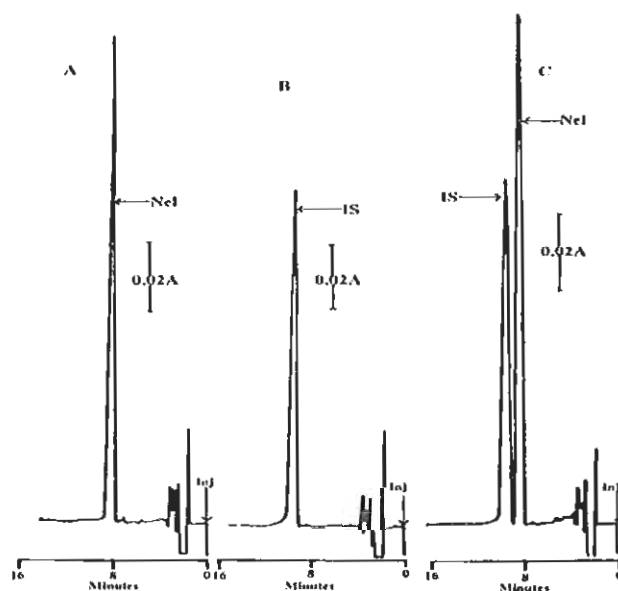


Figure 2 Chromatogram of nelfinavir (A), internal standard (saquinavir) (B) and mixture (C) at a concentration of 10.2 and 8.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 60% acetonitrile in water, respectively.

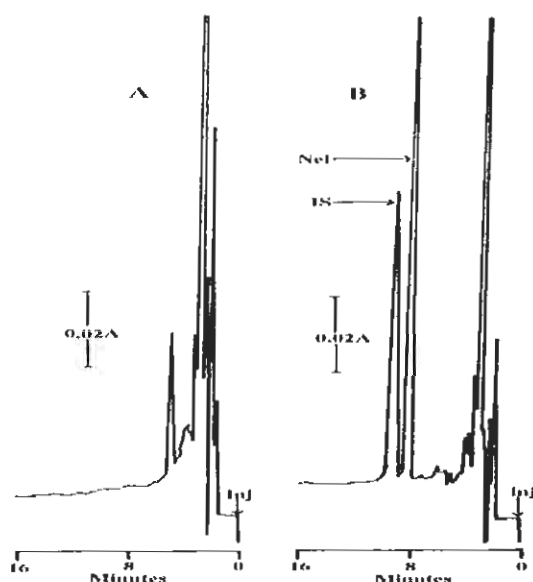


Figure 3 showing the specificity of the analytical and pre-treatment method described for (A) blank plasma and (B) nelfinavir (1.02 µg/ml) spiked in plasma and IS (5 µg/ml).

Table 1 shows the percentage recovery of nelfinavir and saquinavir (IS) after extraction from biological fluid.

Compounds	Spiked value (µg/ml)	%Recovery (n=5)		
		Mean	SD	%CV
Nelfinavir	0.51	64.87	5.88	9.07
Nelfinavir	1.02	74.81	4.38	5.86
Nelfinavir	1.53	71.50	5.18	7.24
Saquinavir	8.33	75.55	2.26	2.99

Table 2 shows the accuracy of the analytical method (n=5).

Level	Spiked value (µg/ml)	Recovered value (µg/ml)	% found	% CV
1	0.510	0.502	98.43	2.12
2	1.020	1.040	101.96	4.42
3	1.530	1.518	99.22	2.32

Table 3 shows the precision inter day and intra-day of the analytical method for the assay of nelfinavir in biological fluid.

	Spiked concentration (µg/ml)	Recovered value (µg/ml)	
		Mean	%CV
Intra-day (n=5)	0.51	0.50 ± 0.01	2.12
	1.02	1.04 ± 0.05	4.42
	1.53	1.52 ± 0.04	2.32
Inter-day (n=12)	0.51	0.50 ± 0.02	3.01
	1.02	1.05 ± 0.06	5.93
	1.53	1.53 ± 0.06	3.60

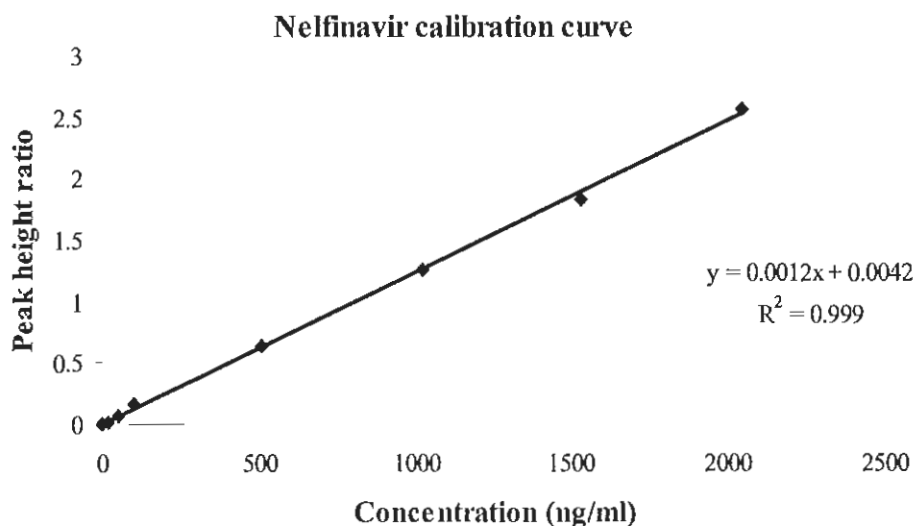


Figure 4 shows a single calibration curve demonstrating linearity between concentration (0 – 2.04 $\mu\text{g/ml}$) and peak height ratio.

Table 4 shows the constancy of linearity of nelfinavir in biological fluid (n=5) over a five day period.

	Mean	SD	%CV
Slope	1.212	0.069	5.68
Intercept	0.001	0.009	
Correlation coefficient (R^2)	0.999	0.000	0.03

Table 5 shows the long term stability of nelfinavir spiked samples in plasma for a period of 8 weeks.

Conc. $\mu\text{g/ml}$	Concentration found ($\mu\text{g/ml}$) (n=3)				
	0 week	2 weeks	4 weeks	6 weeks	8 weeks
0.5	0.47 ± 0.01	0.47 ± 0.00	0.46 ± 0.00	0.45 ± 0.01	0.46 ± 0.01
1.5	1.42 ± 0.01	1.36 ± 0.01	1.37 ± 0.03	1.37 ± 0.05	1.40 ± 0.04

Table 6 shows the 3 cycles freeze and thaw stability of nelfinavir compared to freshly prepared plasma samples.

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Concentration found ($\mu\text{g/ml}$) (n=3)		% of nelfinavir
	Freshly prepared	3 cycles	
0.5	0.47 ± 0.00	0.51 ± 0.03	108.51
1.5	1.36 ± 0.01	1.46 ± 0.01	107.35

Table 7 shows the calculated pharmacokinetic parameters for individual subjects after ingestion of a 250 mg single oral dose of nelfinavir tablet.

Subjects	T _{max} (hr)	C _{max} (ng/ml)	AUC _{0-∞} (ng.hr/ml)	AUC ₀₋₁₂ (ng.hr/ml)	% AUC extrapolated	t _{1/2} (hr)
1	3.0	1705.8	13169	11816	10.3	3.1
2	3.0	1979.4	11052	10420	5.7	2.8
3	4.0	980.8	5414	5219	3.6	2.1
6	3.0	868.2	5225	4710	9.9	4.3
8	2.0	978.9	5783	5356	7.4	3.6
9	3.0	1060.7	6218	5939	4.5	2.4
10	5.0	951.9	8202	6932	15.5	3.9
12	3.0	1303.8	5661	5499	2.9	2.0
13	3.0	1136.7	6025	5748	4.6	2.4
15	2.0	1395.0	6939	6775	2.4	1.9
16	3.0	2098.9	16024	14504	9.5	3.5
17	4.0	1094.0	5609	5145	8.3	3.4
18	3.0	1073.5	5690	5340	6.2	2.7
19	4.0	2666.0	32439	25208	22.3	4.9
20	3.0	994.3	4898	4571	6.7	3.0
Mean (n=15)	3.2	1352.5	9223	8212	8.0	3.1
S.D. (n=15)	0.8	526.6	7216	5535	5.2	0.9
%CV (n=15)	24.2	38.93	78.2	67.4	65.7	28.6
Maximum (n=15)	5.0	2666.0	32439	25207.8	22.3	4.9
Minimum (n=15)	2.0	868.2	4898	4571	2.4	1.9

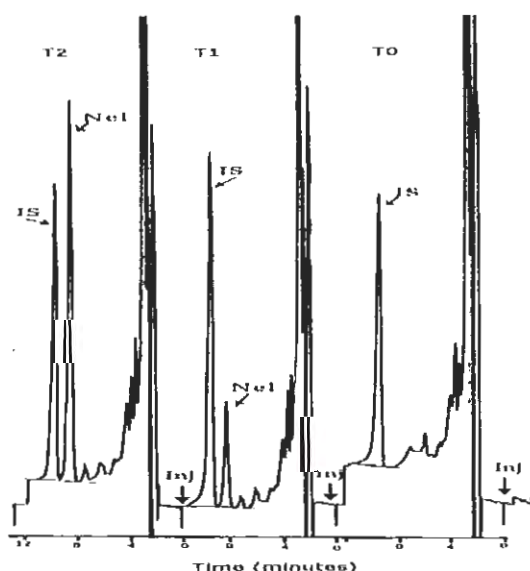


Figure 5 shows chromatogram obtained from continue manual injection the plasma samples of a volunteer, at time 0 (T0), 1 (T1), 2 (T2) hours after administration of a single oral dose of 250mg of nelfinavir, with internal standard.

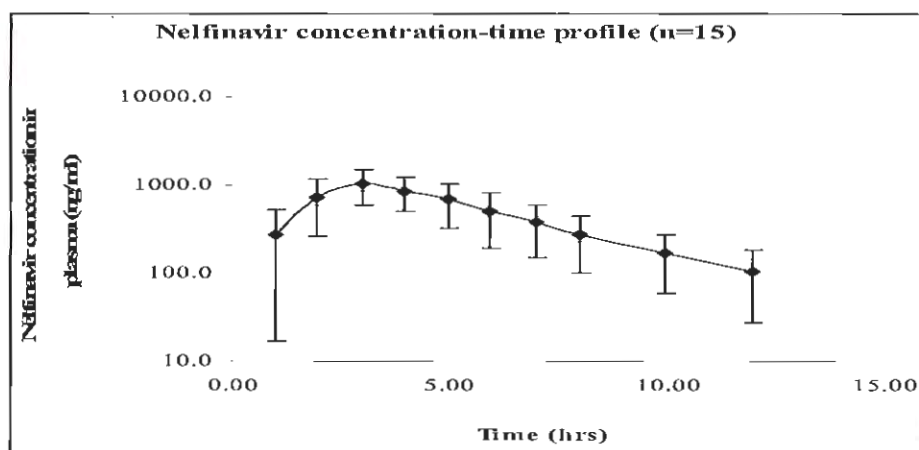


Figure 6 shows the plasma concentration-time profile (mean \pm S.D., n=15) of nelfinavir after oral administration of a 250 mg tablet.

Conclusions

A new method has been developed with a better extraction system for nelfinavir from plasma. The method is sensitive to allow determination of lower doses of the potentially toxic nelfinavir to be enabled. The results show similar values for the pharmacokinetic properties measured when compared with other time consuming methods.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support given by the Government Pharmaceutical Organization in this project and would also like to thank the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University for the use of facilities and equipments throughout this project. The authors wish to thank the nurses and doctors in the hospital for the help in collection of the blood samples.

References

1. Bardsley-Elliot A, Plosker GL. Nelfinavir: an update on its use in HIV infection. *Drugs*. 2000; 59(3): 581-620
2. Krogstad P, Wiznia A, Luzuriaga K, Dankner W, Nielsen K, Gersten M, Kerr B, Hendricks A, Boczany B, Rosenberg M, Jung D, Spector SA, Bryson Y. Treatment of human immunodeficiency virus 1-infected infants and children with the protease inhibitor nelfinavir mesylate. *Clin Infect Dis* 1999; 28(5): 1109-1118.
3. Regazzi MB, Villani P, Maserati R, Seminari E, Pan A, LoCaputo F, Gambarana E, Fiocchi C. Clinical pharmacokinetics of nelfinavir combined with efavirenz and stavudine during rescue treatment of heavily pretreated HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45(3):343-347.
4. Viracept. Available: <http://www.viracept.com/pdf/prescribinginformation.pdf;p27>. [accessed 5 Oct 2008]
5. Aweeka F, Jayewardene A, Staprans S, Bellibas SE, Kearney B, Lizak P, Novakovic-Agopian T, Price RW. Failure to detect nelfinavir in the cerebrospinal fluid of HIV-1-infected patients with and without AIDS dementia complex. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1999; 20(1): 39-43.
6. Khaliq Y, Gallicano K, Seguin I, Fyke K, Carignan G, Bulman D, Badley A, Cameron DW. Single and multiple dose pharmacokinetics of nelfinavir and CYP2C19 activity in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic liver disease. *Br J Clin Pharmacol*. 2000; 50(2):108-115.

7. Dailly E, Thomas L, Kergueris MF, Joliet P, Bourin M. High-performance liquid chromatographic assay to determine the plasma levels of HIV-protease inhibitors (amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir and saquinavir) and the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (nevirapine) after liquid-liquid extraction. *J Chromatogr B*. 2001; 758(2):129-135.
8. Rentsch, KM. Sensitive and specific determination of eight antiretroviral agents in plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2003; 788:339-350.
9. Sarasa-Nacenta M, Lopez-Pua Y, Mallolas J, Blanco JL, Gatell JM, Carne X. Simultaneous determination of the HIV-protease inhibitors indinavir, amprenavir, ritonavir, saquinavir and nelfinavir in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 2001; 757(2):325-332.
10. Hugén PW, Verweij-van Wissen CP, Burger DM, Wuis EW, Koopmans PP, Hekster YA. Simultaneous determination of the HIV-protease inhibitors indinavir, nelfinavir, saquinavir and ritonavir in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 1999; 727(1-2):139-149.
11. Wu EY, Wilkinson JM 2nd, Naret DG, Daniels VL, Williams LJ, Khalil DA, Shetty BV. High-performance liquid chromatographic method for the determination of nelfinavir, a novel HIV-1 protease inhibitor, in human plasma. *J Chromatogr B*. 1997; 695(2):373-380.
12. Yamada H, Kotaki H, Nakamura T, Iwamoto A. Simultaneous determination of the HIV protease inhibitors indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir and nelfinavir in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 2001; 755(1-2):85-89.
13. Chi J, Jayewardene AL, Stone JA, Motoya T, Aweeka FT. Simultaneous determination of five HIV protease inhibitors nelfinavir, indinavir, ritonavir, saquinavir and amprenavir in human plasma by LC/MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2002; 30:675-684.
14. van Heeswijk RP, Hoetelmans RM, Harms R, Meenhorst PL, Mulder JW, Lange JM, Beijnen JH. Simultaneous quantitative determination of the HIV protease inhibitors amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir and saquinavir in human plasma by ion-pair high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B*. 1998; 719(1-2):159-168.
15. Marzolini C, Telenti A, Buclin T, Biollaz J, Decosterd LA. Simultaneous determination of the HIV protease inhibitors indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir and the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *J Chromatogr B*. 2000; 740(1):43-58.
16. Poirier JM, Robidou P, Jaillon P. Simultaneous determination of the six HIV protease inhibitors (amprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, ritonavir, and saquinavir) plus M8 nelfinavir metabolite and the nonnucleoside reverse transcription inhibitor efavirenz in human plasma by solid-phase extraction and column liquid chromatography. *Ther Drug Monit*. 2002; 24(2):302-309.
17. Justesen US, Pedersen C, Klitgaard NA. Simultaneous quantitative determination of the HIV protease inhibitors indinavir, amprenavir, ritonavir, lopinavir, saquinavir, nelfinavir and the nelfinavir active metabolite M8 in plasma by liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 2003; 783(2):491-500.
18. Keil K, Frerichs VA, DiFrancesco R, Morse G. Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for the Analysis of Amprenavir, Efavirenz, Indinavir, Lopinavir, Nelfinavir and Its Active Metabolite (M8), Ritonavir, and Saquinavir in Heparinized Human Plasma. *Ther Drug Monit*. 2003; 25(3):340-346.
19. Lamotte C, Peytavin G, Farinotti R. Determination of nelfinavir, a potent HIV protease inhibitor, and its active metabolite M8 in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Chromatogr B*. 1999; 735(2):159-170.
20. Turner ML, Reed-Walker K, King JR, Acosta EP. Simultaneous determination of nine antiretroviral compounds in human plasma using liquid chromatography. *J Chromatogr B*. 2003; 784(2):331-341.
21. Turner ML, Acosta EP. Long-Term Stability of Nelfinavir Mesylate in Human Plasma. *Clinical Chemistry*. 2000; 46:2019-2020.
22. Nowatzke W, Woolf, E. Best practices during bioanalytical method validation for the characterization of assay reagents and the evaluation of analyte stability in assay standards, quality controls, and study samples. *The AAPS Journal*. 2007; 9(2) Article 13.

RESEARCH ARTICLE

Antinociceptive Activity of the Methanolic Extract of *Kaempferia galanga* and Its Possible Mechanisms in Experimental Animals

Chutha Sae-wong¹, Wibool Ridditid¹, Wantana Reanmongkol², Malinee Wongnawa¹

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Science, Prince of Songkla University,

² Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Prince of Songkla University

Abstract

The methanolic extract of *Kaempferia galanga* Linn. (Zingiberaceae) was investigated for its antinociceptive activity and its possible mechanisms in mice and rats using acetic acid-induced writhing, formalin, hot plate and tail-flick tests. The extract at test doses of 50, 100 and 200 mg/kg PO clearly demonstrated antinociceptive activity in all tests. This activity was dose and time-dependent. The extract administered at 200 mg/kg PO had a stronger antinociceptive effect than aspirin (100 mg/kg PO) but less than morphine (5 mg/kg SC) in the formalin test in mice. Naloxone (2 mg/kg IP) abolished the antinociceptive activity of both morphine (5 mg/kg SC) and the extract (200 mg/kg PO) by reducing the reaction time of rat in the tail-flick test and in the mice hot plate test. The antinociceptive mechanisms appear to be both peripherally and centrally-mediated actions. The LD₅₀ value of the extract given orally was estimated to be more than 5 g/kg in mice.

Keywords: *Kaempferia galanga*, antinociceptive activity, aspirin, morphine; naloxone

ฤทธิ์ระงับปวดของสารสกัดเมธานอลต้นเปราะหอมและกลไกการออกฤทธิ์ในสัตว์ทดลอง

จุฬา แซ่ว่อง¹, วิบูลย์ ฤทธิพิศ¹, วันทนา เจริญมงคล², มาลินี วงศ์นาวา¹

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

²ภาควิชาเภสัชกรรมคลินิก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ระงับปวดและกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเมธานอลต้นเปราะหอมในหนูถีบจักรและหนูขาวโดยใช้การทดสอบ acetic-induced writhing, formalin, hot plate และ tail-flick พบว่า เมื่อป้อนสารสกัดเมธานอลต้นเปราะหอมในขนาด 50, 100 และ 200 มก./กก. จะแสดงฤทธิ์ระงับปวดอย่างชัดเจนและฤทธิ์ระงับปวดนี้ขึ้นกับขนาดและเวลาในการออกฤทธิ์ของสารสกัด สารสกัดเมธานอลต้นเปราะหอมในขนาด 200 มก./กก. เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ระงับปวดของแอสไพรินและมอร์ฟีน พบว่ามีฤทธิ์ระงับปวดมากกว่าฤทธิ์ระงับปวดของแอสไพรินในขนาด 100 มก./กก. ที่บริหารทางปาก แต่น้อยกว่าฤทธิ์ระงับปวดของมอร์ฟีนในขนาด 5 มก./กก. ที่บริหารยาโดยการฉีดเข้าชั้นไขมันใต้ผิวหนังใน formalin test ยานาล็อกโซนในขนาด 2 มก./กก. เมื่อฉีดเข้าช่องท้อง สัตว์ทดลองจะสามารถต้านฤทธิ์ระงับปวดของทั้งมอร์ฟีนในขนาด 5 มก./กก. ที่บริหารยาโดยการฉีดเข้าชั้นไขมันใต้ผิวหนัง และสารสกัดเมธานอลต้นเปราะหอมในขนาด 200 มก./กก. ที่บริหารทางปาก ใน hot plate และ tail-flick test กลไกการออกฤทธิ์ในการระงับปวดของสารสกัดเมธานอลต้นเปราะหอมดูเหมือนว่าจะออกฤทธิ์ระงับปวดผ่านการทำงานของระบบประสาทส่วนปลายและระบบประสาทส่วนกลาง ในการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นในหนูถีบจักร พบว่าค่าประมาณของ LD₅₀ ของสารสกัดเมธานอลต้นเปราะหอมมีค่ามากกว่า 5 ก./กก. เมื่อบริหารทางปาก

คำสำคัญ: เปราะหอม ฤทธิ์ระงับปวด แอสไพริน มอร์ฟีน นาล็อกโซน

Introduction

Medicinal plants are important sources of new chemical substances that potentially have strong therapeutic effects. *Kaempferia galanga* Linn. (Zingiberaceae), commonly called "Proh Hom" in Thai, is an acaulescent perennial growing in Southern China, Indochina, Malaysia, India and Thailand. This medicinal plant has been extensively used for treatment of various disorders including hypertension, rheumatism and asthma¹. In Thailand, the rhizome of *K. galanga* is used by people in many regions for relieving toothache, abdominal pain, muscular swelling and rheumatism². The most common indications for its use, besides hypertension, include rheumatism, asthma, headaches, cough, toothaches and as a poultice for applying to bruises and wounds³. In Malaysia and Indonesia, this plant is used to make a gargle, the leaves and rhizomes are chewed to treat coughs, or pounded and used in poultices or lotions applied to relieve many ailments. The juice of the rhizome is used as an expectorant and carminative, and is often a part of children's medicine and tonics. The rhizome is also used to treat abdominal pain, and as an embrocation or sudorific to treat swelling and muscular rheumatism⁴. In China, this plant is used as a remedy for toothache, as a stimulant, carminative to treat cholera, and to treat contusions, chest pains, headache and constipation^{5,6}. Additionally, the rhizomes of the plant that contains essential oils have been used in a decoction or powder for indigestion, cold, pectoral and abdominal pains, headache and toothache⁷. Its alcoholic maceration has also been applied as a liniment for rheumatism^{8,9}. Some pharmacological activities of *K. galanga* have been reported, for example, as a smooth muscle relaxant¹⁰ and vasorelaxant^{4,11}.

In summary, *K. galanga* possesses several bioactivities and is widely used in Thai and other Asian

traditional medicine but so far its antinociceptive activity has not been investigated. The major chemical constituents of the volatile oil extracted from dried rhizome were ethyl-*p*-methoxycinnamate (31.77%), methylcinnamate (23.23%), carvone (11.13%), eucalyptol (9.59%) and pentadecane (6.41%), respectively¹². Other constituents of the rhizome include cineol, borneol, 3-carene, camphene, kaempferal, cinnamaldehyde, *p*-methoxycinnamic acid, ethyl cinnamate and ethyl *p*-methoxycinnamate¹³. A methanolic extract of the rhizome contains ethyl *p*-methoxy *trans*-cinnamate, which is highly cytotoxic to HeLa cells¹⁴.

In the present study, *K. galanga* was selected because it is one of the medicinal plants commonly used in remedies to treat abdominal pain, toothache, swelling and rheumatism in Thai traditional medicine and other countries in Southeast Asia. However, no pharmacological data have previously been systematically conducted to evaluate the antinociceptive activity of this plant. In this work we evaluate the "Proh Hom" antinociceptive activity in experimental animals.

Materials and Methods

1. Plant material

K. galanga were collected in January, 2006 from the Chana District, Songkhla Province, Thailand. The plant was identified by Professor Puangpen Sirirugsa, Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University. A voucher specimen NO. 200601 of the plant material has been deposited in the Prince of Songkla University Herbarium, Department of Biology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand.

2. Experimental animals

Male Swiss albino mice and Wistar rats were used in the

experiments. All animals obtained from the Southern Laboratory Animal Facility, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand, were kept in a room maintained under standard environmentally controlled conditions of $24 \pm 1^\circ\text{C}$ and 12 h light-12 h dark cycle. They were supplied *ad libitum* with standard rodent diets and water. All experiments were approved by Animal Ethics Committees, Prince of Songkla University, Thailand.

3. Preparation of the plant extract and reference drugs

20 kg of the fresh plant *K. galanga*, including rhizomes, stems and leaves, was cleaned with tap water and air-dried at room temperature ($28\text{--}30^\circ\text{C}$). The dried plant material was pulverized by an electric blender to give 5 kg of a coarse powder. The powder obtained was macerated with 10 L of methanol and left for 7 days at room temperature. The maceration process was repeated twice and the combined extracts were filtered by suction through a Buchner funnel fitted with a Whatman No. 40 filter paper. The filtrate was evaporated at $40\text{--}60^\circ\text{C}$ under reduced pressure by a rotary evaporator and lyophilized by freeze-drying to give a total semi-solid residue of 119.2 g (yield 0.6 %w/w) which was stored in a closed bottle and kept in a refrigerator at temperature below 4°C until tested. The methanolic extract of *K. galanga* (MEKG) at doses of 50, 100 and 200 mg/kg was prepared by suspending this residue in the cosolvent (propylene glycol : tween 80 : distilled water; 4:1:5). This solution and cosolvent controls were given to the animals orally. The reference drugs used in this study were aspirin (100 mg/kg), morphine sulphate (5 mg/kg) and naloxone (2 mg/kg). All of reference drugs were prepared by dissolving in 0.9% normal saline.

4. Investigation of antinociceptive activity

4.1 Acetic acid-induced writhings in mice

The method of Koster, et al.¹⁵ was used to evaluate the antinociceptive activity. The extract at doses of 50, 100 or 200 mg/kg was administered orally to each mouse 30 min before intraperitoneal injection with 0.6% acetic acid in 0.9% normal saline (10 ml/kg body weight) to induce the characteristic writhings. Cosolvent (10 ml/kg PO) and aspirin (100 mg/kg PO) were given to mice in the control and reference groups, respectively. The mice were observed and counted for the number of abdominal constrictions and stretchings in a period of 0-20 min. The responses in the treated groups were compared with those of animals in the control group. The percentage of inhibition of the number of writhings was calculated.

4.2 Formalin test in mice

The method described by Hunskaar, et al.¹⁶ was used. The control group received cosolvent (10 ml/kg PO) and reference groups received aspirin (100 mg/kg PO) and morphine sulphate (5 mg/kg SC). MEKG at doses of 50, 100 and 200 mg/kg were administered orally to the animals. After 30 min of treatment (except only 15 min for morphine), 20 μL of 2.5% formalin in saline was injected subcutaneously into a hind paw of each mouse. The time spent in licking the injected paw was recorded and expressed as the total licking time in early phase (0-5 min) and late phase (15-30 min) after formalin injection.

4.3 Hot plate test in mice

The method of Woolfe and MacDonald¹⁷ was followed. The animals in the control group received cosolvent (10 ml/kg PO) while the reference groups were treated with morphine sulphate (5 mg/kg PO) and naloxone (2 mg/kg IP). The animals in

the test groups were treated with different doses (50, 100 and 200 mg/kg PO) of *K. galanga*. In the remaining groups, the animals received naloxone (2 mg/kg IP) 10 min before morphine (5 mg/kg SC) or the extract (200 mg/kg PO). After 30 min of treatment with all test drugs (except only 15 min for morphine and 10 min for naloxone), mice were placed on a hot plate maintained at $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. The latency of nociceptive response (reaction time) of each mouse that was identified by the time for licking and flicking of a hind limb or jumping was recorded. The reaction time was measured every 15 min in a 90 min-period at intervals of 30, 45, 60 and 90 min. The cut-off time of observation was 45 sec. Only mice that showed a nociceptive responses within 15 sec was used in the experiments.

4.4 Tail-flick test in rats

The experiment was carried out by the method of D'Amour and Smith.¹⁸ The experiment was carried out in the same manner as the hot plate test. After 30 min of treatment with all test drugs (except only 15 min for morphine and 10 min for naloxone), the tail-flick response of the rat was measured by gently placing the rat tail at a central position of a light beam. The time taken by the animals to withdraw (flick) its tail from heat induced by the light beam was recorded as the reaction time. The cut-off time was 20 sec to prevent injury to the rat tail.

5. Evaluation of acute toxicity

The up-and-down method for acute toxicity testing previously described by Bruce¹⁹ has been developed and statistically evaluated and the number of animals used reduced. In this procedure, animals are dosed one at time. If an animal died the dose for the next is decreased while if it survives, the dose for the next is increased. Each animal is then observed

for 1 or 2 days before dosing the next animal. In this study, the first dose was begun at 300 mg/kg and adjusted by a constant multiplicative factor of 1.5 up to 5 g/kg. The MEKG was orally administered to a group of mice and rat both male and female. Behavior parameters observed after administration were convulsion, hyperactivity, sedation, grooming, loss of righting reflex and increased or decreased respiration during a period of 8 h and 7 days. Food and water were provided *ad libitum*.

6. Statistical analysis

The data obtained were analysed using SPSS software program version 11.5 and expressed as a mean \pm SE. Statistically significant differences between groups was calculated by the application of analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test. The independent *t*-test was used for comparison between 2 groups. *P* values less than 0.05 ($p < 0.05$) were used as the significance level.

Results

1. Antinociceptive activity

1.1 Acetic acid-induced writhings in mice

The methanolic extract of *K. galanga* (MEKG) administered orally at different doses (50, 100 and 200 mg/kg) caused a significant inhibition (42.75%, 59.57% and 70.60%, respectively) compared to the control ($p < 0.01$) of the writhing responses induced by acetic acid (0.6% v/v IP). The decrease in the number of writhings was dose-dependent. Aspirin (100 mg/kg PO) produced a 51.06 % reduction compared to the control. The results are provided in Table 1.

1.2 Formalin test in mice

MEKG at doses of 50, 100 and 200 mg/kg PO had a significant dose-dependent antinociceptive activity ($p < 0.01$) compared to the control in

both the early and late phase. The reference drugs, morphine (5 mg/kg SC) and aspirin (100 mg/kg PO) also caused significant ($p < 0.01$) inhibition of both the early and late phases of the pain stimulus (Table 2).

1.3 Hot plate test in mice

MEKG considerably increased the animal's reaction time to the heat stimulus. The increase was significant in all cases beginning from 90 min but the dose of 200 mg/kg significantly increased the reaction time beginning from 45 min compared to the control. Morphine sulfate (5 mg/kg SC) markedly increased pain latency ($p < 0.01$) in all cases from 30 min with its maximum effect at approximately 1 h after treatment. All results are shown in Table 3. Naloxone (2 mg/kg IP) given before the morphine (5 mg/kg SC) or MEKG (200 mg/kg PO) abolished the latency of the nociceptive responses (Table 3).

1.4 Tail-flick test in rats

The tail-flick latency response was significantly increased at 45 min after administration of 200 mg/kg PO of MEKG compared to the control ($p < 0.01$) and MEKG at doses of both 50 and 200 mg/kg PO significantly increased the tail-flick latency response

($p < 0.05$) at 60 min. At 75 min all doses of MEKG (50, 100 and 200 mg/kg PO) significantly increased the tail-flick latency response ($p < 0.01$, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). Morphine sulfate (5 mg/kg SC) significantly increased ($p < 0.01$) the tail-flick latency at 45 min after treatment. However, after naloxone pretreatment, the nociceptive effect of morphine or MEKG at a dose of 200 mg/kg PO on the tail-flick latency response was significantly decreased ($p < 0.01$) from 45 to 90 min after their addition (Table 4).

2. Acute toxicity

MEKG at the dose of 5 g/kg PO given to two groups (10 males and 10 females) of mice had no effect on their behavioral responses during the observation periods of 8 h and 7 days after administration. No mortality was observed up to 7 days of monitoring. The LD₅₀ value of the extract in mice was therefore estimated to more than 5 g/kg PO. As the highest dose used in the present study (200 mg/kg PO) was 25 fold less than the dose used in this acute toxicity test, it was safe to assume that the normal doses of 50, 100 and 200 mg/kg PO given to mice or rats in this study were safe.

Table 1 Effect of MEKG and aspirin on the writhing response in mice induced by acetic acid injection.

Treatment	Dose(mg/kg)	Number of writhings	Inhibition (%)
Cosolvent	10 ml/kg, PO	51.7 ± 2.54	-
Aspirin	100, PO	25.3 ± 1.25 ^a	51.06
MEKG	50, PO	29.6 ± 0.95 ^a	42.75
	100, PO	20.9 ± 1.53 ^a	59.57
	200, PO	15.2 ± 1.13 ^a	70.60

Values are presented as the mean ± SE ($n = 10$).

^a $p < 0.01$, significant difference from control.

Table 2 Effect of MEKG on the reaction time of mice in the formalin test.

Treatment	Dose(mg/kg)	Licking of the hind paw (sec)			
		Early phase (0 - 5 min)	Inhibition (%)	Late phase (15 - 30 min)	Inhibition (%)
Cosolvent	10 ml/kg, PO	77.17 ± 3.62	-	94.03 ± 3.22	-
Morphine	5, SC	25.61 ± 1.36 ^a	66.81	17.63 ± 1.01 ^a	81.25
Aspirin	100, PO	41.72 ± 2.24 ^a	45.94	76.94 ± 2.71 ^a	18.18
MEKG	50, PO	54.97 ± 2.58 ^a	28.77	29.21 ± 1.93 ^a	68.94
	100, PO	52.04 ± 2.42 ^a	32.56	19.97 ± 2.06 ^a	78.76
	200, PO	35.90 ± 2.97 ^a	53.48	20.22 ± 0.96 ^a	78.50

Values are presented as the mean ± SE (*n* = 10)

^a*p* < 0.01, significant difference from control.

Table 3 Effect of MEKG, morphine and naloxone on the reaction time of mice in the hot plate test.

Treatment	Dose (mg/kg)	Reaction time (sec)				
		30 min	45 min	60 min	75 min	90 min
Cosolvent	10 ml/kg, PO	8.56 ± 0.22	8.71 ± 0.28	9.19 ± 0.21	9.42 ± 0.23	8.74 ± 0.37
Morphine	5, SC	10.61 ± 0.39 ^b	14.37 ± 0.68 ^b	17.74 ± 0.59 ^b	17.49 ± 0.48 ^b	14.71 ± 0.73 ^b
Naloxone	2, IP	8.98 ± 0.18	8.97 ± 0.27	8.77 ± 0.21	8.81 ± 0.15	8.90 ± 0.19
MEKG	50, PO	8.84 ± 0.25	9.10 ± 0.33	9.35 ± 0.27	10.74 ± 0.42	10.77 ± 0.37 ^a
	100, PO	9.48 ± 0.42	9.77 ± 0.22	10.15 ± 0.14	10.36 ± 0.30	11.45 ± 0.30 ^b
	200, PO	9.71 ± 0.34	10.57 ± 0.27 ^a	12.43 ± 0.43 ^b	13.38 ± 0.37 ^b	12.87 ± 0.41 ^b
Naloxone + Morphine	2, IP; 5, SC	9.57 ± 0.49	9.61 ± 0.40 ^c	9.63 ± 0.36 ^c	10.11 ± 0.40 ^c	10.43 ± 0.51 ^c
Naloxone + MEKG	2, IP; 200, PO	10.28 ± 0.57	10.65 ± 0.45	11.27 ± 0.63	11.22 ± 0.54 ^d	10.13 ± 0.62 ^d

Values are presented as the mean ± SE (*n* = 10)

^a*p* < 0.05, ^b*p* < 0.01, significant difference from control.

^c*p* < 0.01, significant difference compared with morphine 5 mg/kg.

^d*p* < 0.01, significant difference compared with MEKG 200 mg/kg.

Discussion

The results demonstrated that MEKG possesses significant antinociceptive activity as evaluated in the acetic acid-induced writhings, formalin test, hot plate test and tail-flick test. The acetic acid-induced writhing model is a chemical stimulus widely used for the evaluation of peripheral antinociceptive activity²⁰. In this model,

pain is generated indirectly via endogenous mediators like bradykinin, serotonin, histamine, substance *P* and prostaglandins, all acting by stimulating peripheral nociceptive neurons. These fibers are sensitive to narcotics such as morphine and nonsteroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs)²¹. Intra-peritoneal injection of acetic acid can produce the peritoneal inflammation

(acute peritonitis) which causes the response characterized by contraction of the abdominal muscle accompanied by an extension of the forelimbs and elongation of the body. This writhing response is considered as a visceral inflammatory pain model¹⁵. This method has been associated with the increased levels of prostaglandins in the

peritoneal fluids²². The results in this study revealed that MEKG significantly reduced the acetic acid-induced writhing responses, indicating that the mechanism of action of antinociceptive activity of the extract may be linked partly to the cyclo-oxygenase enzymes (COX) via the inhibition of prostaglandin synthesis.

Table 4 Effect of MEKG, morphine and naloxone on the reaction time of rats in the tail-flick test.

Treatment	Dose (mg/kg)	Reaction time (sec)				
		30 min	45 min	60 min	75 min	90 min
Cosolvent	5 ml/kg, PO	1.33 ± 0.03	1.31 ± 0.03	1.27 ± 0.05	1.21 ± 0.10	1.20 ± 0.03
Morphine	5, SC	1.38 ± 0.03	2.43 ± 0.05 ^b	3.55 ± 0.01 ^b	3.58 ± 0.07 ^b	3.23 ± 0.05 ^b
Naloxone	2, IP	1.33 ± 0.03	1.27 ± 0.03	1.30 ± 0.02	1.32 ± 0.02	1.35 ± 0.02
MEKG	50, PO	1.28 ± 0.03	1.32 ± 0.03	1.42 ± 0.02^a	1.41 ± 0.02^b	1.34 ± 0.02
	100, PO	1.28 ± 0.02	1.33 ± 0.03	1.33 ± 0.02	1.37 ± 0.02^a	1.31 ± 0.02
	200, PO	1.27 ± 0.02	1.39 ± 0.03 ^b	1.46 ± 0.02 ^a	1.41 ± 0.02 ^b	1.32 ± 0.02
Naloxone + Morphine	2, IP.; 5, SC	1.36 ± 0.03	1.59 ± 0.05 ^c	1.50 ± 0.03 ^c	1.41 ± 0.02 ^c	1.35 ± 0.04 ^c
Naloxone + MEKG	2, IP; 200, PO	1.34 ± 0.03	1.28 ± 0.03 ^d	1.29 ± 0.03 ^d	1.29 ± 0.02 ^d	1.26 ± 0.02 ^d

Values are presented as the mean ± SE (*n* = 10)

^a*p* < 0.05, ^b*p* < 0.01, significant increase from the control.

^c*p* < 0.01, significant decrease compared with morphine alone

^d*p* < 0.01, significant decrease compared with 200 mg/kg MEKG alone

MEKG also possesses antinociceptive activity in the formalin test. The advantage of using the formalin model of nociception is that it can discriminate between central and peripheral pain components²⁴. The test consists of 2 different phases. The first one (neurogenic phase) is generated in the periphery through the activation of nociceptive neurons by the direct action of formalin, and the second phase (inflammatory phase) occurs through the activation of the ventral horn

neurons at the spinal cord level. Morphine, a typical narcotic analgesic drug, can inhibit nociception in both phases²⁵, whereas NSAIDs, acting supraspinally in the central nervous system, also reduce the pain in both phases²⁶. Inhibition of the late phase may be involved in inhibition of the release of serotonin, histamine, bradykinin and prostaglandins which at least can cause some degree of the sensitization of the central nociceptive neurons²⁷. In the present study, MEKG

inhibited the nociceptive effect in both phases. It is widely agreed that the nociceptive behaviors manifested during the acute first phase may be caused by direct stimulation of the sensory nerve fibers by formalin. The second phase is probably resulted from chronic inflammatory nociception responses due to inflammatory mediators like histamine, prostaglandins, serotonin and bradykinin.²⁸ Because MEKG is effective against the formalin test, the antinociceptive property is likely to be mediated peripherally. To evaluate for a possible central antinociceptive effect of the MEKG, the hot plate and tail flick tests are used for evaluation of the central pain²⁹ at the supraspinal and spinal levels³⁰, respectively, possibly acting on a descending inhibitory pain pathway³¹. In this study, our results indicated that the extract of *K. galanga* has antinociceptive effect against both the hot-plate and tail-flick tests, therefore the antinociceptive effect is likely to be mediated centrally (spinally and supraspinally). Moreover, the antinociceptive action of morphine and MEKG in this study was abolished by naloxone, an opioid antagonist.

The μ receptor has generally been regarded as the receptor type associated with pain relief and has been shown to be potent in regulating thermal pain. Nonanalgesic effects mediated by the μ receptors include respiratory depression, inhibition of intestinal motility and most importantly for therapeutic considerations is its induction of physical dependence. Activation of μ_2 opioid subtype leads to spinal analgesia and commonly through constipation adverse effect³². Therefore, taking all these data together we believe that the antinociceptive activity of MEKG is most likely to be mediated peripherally and centrally and indicates a morphine-like mechanisms by binding with μ opioid receptors. The

LD₅₀ value of the extract given orally was estimated to be more than 5 g/kg in mice

Conclusion

The methanolic extract of *K. galanga* (MEKG) exhibits antinociceptive activity. The proposed mechanisms of antinociceptive activity based on the pain models used in this study show that they are likely to be mediated peripherally and centrally (spinally and supraspinally) on the nervous system. In addition, the antinociceptive effect of the extract was abolished by naloxone in the same manner as for morphine both in the hot plate and tail flick tests, indicating that the extract acts partly through opioid-mediated mechanisms. The μ opioid receptor would probably be a binding site of MEKG. These results on the antinociceptive activity of MEKG support the potential traditional use of this medicinal plant in folk medicine. Further investigations are anticipated to identify the active components and lead to their further clinical use.

Acknowledgements

This research project was supported by grant from Prince of Songkla University Contract No. SCI50200200180S), Graduate School of Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand. Special thanks are extended to Dr. Brian Hodgson for his excellent reading and corrections to this manuscript.

References

1. Zakaria M, Mustafa AM. Traditional Malay Medical Plants. Fajar Bakti, Kuala Lumpur, 1994, pp. 129.
2. Sirirugsa P. Thai Zingiberaceae: species diversity and their uses. The International Conference on Biodiversity and Bioresources: conservation and utilization. 23-27 November, Phuket, Thailand, 1997.
3. Perry M, Metzger J. Medicinal Plants of East and Southeast Asia. Attributed

- Properties and Uses. Cambridge, MIT Press, 1980, pp. 442.
4. Othman R, Ibrahim H, Mohd MA, et al. Bioassay-guided isolation of a vasorelaxant active compound from *Kaempferia galanga* L. *Phytomedicine* 2006; 13:61-66.
5. Ibrahim H, Rahman AA. Several ginger plants (Zingiberaceae) of potential value. *Proceedings of the seminar on Malaysian Traditional Medicine*. University of Malaya, Kuala Lumpur, 1988.
6. Mustafa AM, Shahuddin H, Ibrahim H, et al. Mechanism of the vasorelaxant effect of the chloroform extract of *Kaempferia galanga* L. rhizomes on rat thoracic aorta. 11th Annual Scientific Conference on the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology, 1995.
7. Kanjanapothi D, Panthong A, Lertprasertsuke N, et al. Toxicity of crude rhizome extract of *Kaempferia galanga* L. (Proh Hom). *J Ethnopharmacol* 2004; 90:359-365.
8. Keys JD. Chinese Herbs (Their Botany, Chemistry and Pharmacodynamics). Tokyo, Charles E. Tuttle Company, Inc., 1976.
9. Lieu VD. Medicinal Plants in Vietnam. Ha- noi, 1990, pp. 239.
10. Hidir SM, Ibrahim H. Anti-inflammatory activity of the aqueous extract of the rhizome of *K. galanga* L. Eighth National Seminar and UNESCO Regional Workshop on Natural Products, University of Malaya, Kuala Lumpur, 1991.
11. Mustafa MR, Mustafa AM, Hashim S. Vasorelaxant effects of the chloroform extract of *Kaempferia galanga* on smooth muscles of the rat aorta. *Asia Pac J Pharmacol* 1996; 11:97-101.
12. Trewtrakul S, Yuenyongsawad S, Kummee S, et al. Chemical components and biological activities of volatile oil of *Kaempferia galanga* Linn. *Songklanakarin J Sci Technol* 2005; 27 (suppl 2):503-507.
13. Nakao M, Shibu C. *Yakugaku Zasshi* 1924; 44: 913.
14. Kosuge T, Yokota M, Sugiyama K, et al. Studies of anticancer principles in Chinese medicines. II. Cytotoxic principles in *Biota orientalis* (L.) ENDL and *Kaempferia galanga* L. *Chem Pharm Bull* 1985; 33: 5565-5567.
15. Koster R, Anderson M, Bee EJ. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* 1959; 18: 412.
16. Hunskaar S, Fasmer OB, Hole K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Meth* 1985; 4:69-76.
17. Woolfe G, MacDonald AD. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (DEMEROL). *J Pharmacol Exp Ther* 1944; 80:300-307.
18. D'Amour FE, Smith DL. A methods for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 1941; 72:74-79.
19. Bruce RD. An up-and down procedure for acute toxicity testing. *Fundam Appl Toxicol* 1985; 5:151-157.
20. Gene RM, Segura L, Adzet T, et al. Heterothecaimuloides: anti-inflammatory and analgesic effect. *J Ethnopharmacol* 1998; 60:157-162.
21. Collier HO, Dunneen LC, Johnson CA, et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br J Pharmacol* 1968; 32: 295-310.
22. Derardt R, Jouguey S, Benzoni J, et al. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *Eur J Pharmacol* 1980; 61:17-24.
23. Othman R, Ibrahim H, Modh MA, et al. Vasorelaxant effect of ethyl cinnamate isolated from *Kaempferia galanga* on smooth muscles of the rat aorta. *Planta Med* 2002; 68:655-657.
24. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, et al. The formalin test: An evaluation of the method. *Pain* 1992; 51:5-17.
25. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989; 38:347-352.
26. Martindale J, Bland-Ward PA, Chessell IP. Inhibition of C-fibre mediated sensory transmission in the rat following intraplantar formalin. *Neurosci Letters* 2001; 316:33-36.
27. Prashant RV, Amit AJ, Vivekanand AC, et al. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R.Br. in mice. *J Ethnopharmacol* 2005; 102: 298-301.
28. Choi SS, Han KJ, Lee JK, et al. Antinociceptive mechanisms of orally administered decueinol in the mouse. *Life sciences* 2003; 73:471-485.
29. Marchioro M, Blank Mde F, Mourao RH, et al. Antinociceptive activity of aqueous extract of *Erythrina velutina* leaves. *Fitoterapia* 2005; 76:637-642.
30. Wong CH, Day P, Yarmush J, et al. Nifedipine-induced analgesia after epidural injections in rats. *Anesthes Analges* 1994; 79:303-306.
31. Richardson JD, Aanonsen L, Hargreaves KM. Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids. *Eur J Pharmacol* 1998; 345:145-153.
32. Lipinan AG, Jackson RC. Principles and Practice of Pain Medicine. 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 2004, pp. 585-588.

DRUG EVALUATION

Perindopril Arginine: Advantages over the Currently Available Perindopril-*tert*-butylamine

Supanimit Teekachunhatean

*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University,
Chiang Mai 50200, Thailand*

Abstract

The angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor perindopril has been demonstrated to be an effective treatment in all stages of the cardiovascular continuum. The currently available perindopril is a salt of *tert*-butylamine which has a shelf life of approximately 2 years in countries with a temperate climate. Because of instability of perindopril-*tert*-butylamine in countries with high temperature and relative humidity, this salt requires special PVC/aluminum blister packs overwrapped with a watertight bag containing a desiccant. Substitution of perindopril-*tert*-butylamine with perindopril arginine causes the increase in drug stability and shelf life (from 2 to 3 years) of the new arginine salt, therefore facilitates the use of a simplified packaging in the form of a high density polyethylene (HDPE) canister all over the world irrespective of the climate zones. Because the molecular weight of perindopril arginine is approximately 25% greater than that of perindopril-*tert*-butylamine, thus the dosage of perindopril arginine need to be changed accordingly. To achieve equivalent plasma concentrations of perindoprilat, a dosage of perindopril-*ter*-butylamine 4-8 mg is substituted by perindopril arginine 5-10 mg. Perindopril arginine is bioequivalent and produces the similar antihypertensive efficacy to perindopril-*tert*-butylamine, but causes fewer treatment-related adverse events. Therefore, perindopril arginine should exert better benefits in the same way as demonstrated in clinical trials performed by using perindopril-*tert*-butylamine. Consequently, perindopril arginine has been accepted to be an effective treatment in the same indications as those of the *tert*-butylamine salt. Furthermore, in the study comparing an overall preference for the canister containing perindopril arginine versus that for the blister pack containing perindopril-*tert*-butylamine, the canister receives a higher preference than the blister pack. In conclusion, the new perindopril arginine is more beneficial than perindopril-*tert*-butylamine in terms of better drug stability, longer shelf life, fewer treatment-related adverse events, and higher patients' preference.

Keywords : Perindopril, perindopril arginine, perindopril-*tert*-butylamine

Address correspondence and reprint requests to: Supanimit Teekachunhatean M.D., Ph.D., Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

Perindopril Arginine: ข้อได้เปรียบที่เหนือกว่า Perindopril-*tert*-butylamine ชนิดที่ใช้กันในปัจจุบัน

ศุภนิมิต ทิมขุนทดเถียร

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

บทคัดย่อ

Perindopril เป็น angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor ที่มีประสิทธิภาพต่อการรักษา และการป้องกันอุบัติการณ์ของโรคหัวใจและหลอดเลือดในทุกขั้นตอนของ cardiovascular continuum โดย perindopril ที่มีจำหน่ายตั้งแต่ปี ค.ศ.1988 เป็นต้นมานั้น อยู่ในรูปของเกลือ *tert*-butylamine ซึ่งเมื่อเก็บรักษาในประเทศที่มีภูมิอากาศแบบพอเหมาะจะมี shelf life ประมาณ 2 ปี แต่การเก็บรักษาในประเทศที่มีอุณหภูมิและความชื้นสูง จำเป็นต้องใช้ watertight bag ห่อหุ้ม PVC/aluminum blister packs และใส่สารกันชื้น ยาจึงจะมีความคงตัวที่ดี อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนจาก perindopril-*tert*-butylamine มาใช้ perindopril arginine ซึ่งเป็นยาในรูปแบบเกลือที่มีความคงตัวที่ดีกว่า ส่งผลให้ shelf life เพิ่มขึ้นจาก 2 เป็น 3 ปี และทำให้สามารถเก็บรักษายาวนานในบรรจุภัณฑ์ธรรมดาแบบ high density polyethylene (HDPE) canister ได้ในทุกสภาพภูมิอากาศทั่วโลก อันเนื่องมาจาก perindopril arginine มีน้ำหนักโมเลกุลที่มากกว่า perindopril-*tert*-butylamine ถึงเกือบ 25% ดังนั้นเพื่อให้ยาทั้งสองชนิดมีปริมาณเนื้อหาของ perindopril (ต่อเม็ด) และได้ความเข้มข้นของ perindoprilat ในเลือดที่เท่าเทียมกัน จึงต้องมีการปรับขนาดยาโดยใช้ perindopril arginine ขนาด 5-10 mg ทดแทน perindopril-*tert*-butylamine ขนาด 4-8 mg ตามลำดับ ทั้งนี้ มีการศึกษาที่แสดงว่า perindopril arginine มี bioequivalence และฤทธิ์ลดความดันเลือดที่เท่าเทียมกับ perindopril-*tert*-butylamine แต่พบเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ที่สัมพันธ์กับการรักษาได้น้อยกว่า ดังนั้น ประโยชน์อันหนึ่งได้จากการรักษาด้วย perindopril arginine จึงน่าจะเป็นไปในทิศทางเดียวกับผลดีจากการศึกษาทางคลินิกที่ใช้ perindopril-*tert*-butylamine ด้วยเหตุนี้ perindopril arginine จึงได้รับการยอมรับว่าเป็นยาที่มีข้อบ่งชี้ที่เหมือนกับ perindopril-*tert*-butylamine นอกจากนี้ จากการศึกษาความพึงพอใจของผู้ใช้ perindopril arginine ที่บรรจุใน canister เปรียบเทียบกับ perindopril-*tert*-butylamine ที่บรรจุใน blister pack พบว่า บรรจุภัณฑ์แบบ canister ได้รับความพึงพอใจที่สูงกว่า blister pack โดยสรุป perindopril arginine มีข้อได้เปรียบที่เหนือกว่า perindopril-*tert*-butylamine โดยมีความคงตัวของยาที่ดีกว่า มี shelf life ที่ยาวนานกว่า มีเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ที่สัมพันธ์กับการรักษาที่น้อยกว่า และได้รับความพึงพอใจจากผู้ใช้ยาที่สูงกว่า

คำสำคัญ : Perindopril, perindopril arginine, perindopril-*tert*-butylamine

บทนำ

Perindopril เป็น angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor ชนิดที่มี dicarboxyl group เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างโมเลกุล ยาชนิดนี้มีประสิทธิภาพที่ดีต่อการรักษาและการป้องกันอุบัติการณ์ของโรคหัวใจและหลอดเลือด¹⁻⁶ จึงทำให้มีการใช้ยาชนิดนี้อย่างแพร่หลายในหลายประเทศ ทั้งนี้ perindopril ที่ใช้กันในปัจจุบันอยู่ในรูปของเกลือ *tert*-butylamine ซึ่งเมื่อเก็บรักษาในประเทศที่มีภูมิอากาศแบบพอเหมาะ (temperate climate) จะมี shelf life ประมาณ 2 ปี แต่การเก็บรักษาในประเทศเขตร้อนที่มีความชื้นสัมพัทธ์ (relative humidity, RH) สูง อาจมีปัญหาด้านความคงตัวของยา (drug stability) ด้วยเหตุนี้ทำให้บริษัทผู้ผลิตพยายามพัฒนาผลิตภัณฑ์โดยเปลี่ยนจาก perindopril *tert*-butylamine มาเป็น perindopril arginine ซึ่งมี shelf life และความคงตัวของยาที่ดีขึ้น เพื่อความสะดวกในการขนส่งและการเก็บรักษา

กลไกการออกฤทธิ์ของ perindopril

ในทางสรีรวิทยาของ renin-angiotensin system นั้น^{7,8} renin ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลง angiotensinogen ให้เป็น angiotensin I หลังจากนั้น angiotensin converting enzyme (ACE) จะเปลี่ยน angiotensin I ให้เป็น angiotensin II ซึ่งเป็น mediator ที่อาจก่อให้เกิดผลเสียต่อร่างกายได้หลายประการ เช่น vasoconstriction, เพิ่ม aldosterone secretion, เพิ่ม oxidative stress, ก่อให้เกิด endothelial dysfunction, เพิ่ม cardio-

vascular remodeling, เพิ่มระดับ plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), ส่งเสริมการเกิด thrombosis และเร่งการเกิด atherosclerosis เป็นต้น

Perindopril⁷⁻¹⁰ เป็นยาในกลุ่ม ACE inhibitors ที่มีผลยับยั้งการทำงานของ ACE ทำให้ระดับ angiotensin II ในเลือดลดลง ส่งผลให้ arterioles และ venules ขยายตัว รวมทั้งลดการหลั่ง aldosterone จาก adrenal cortex นอกจากนี้ perindopril ยังมีผลยับยั้งการสลายตัวของ bradykinin ทำให้ระดับ bradykinin ในร่างกายเพิ่มขึ้น นำไปสู่การปลดปล่อย nitric oxide และ prostacyclin ซึ่งเป็น mediators ที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัว อนึ่ง การปรับสมดุลของ angiotensin-bradykinin จากการใช้ perindopril ยังมีผลแก้ไขผลเสียอันเนื่องมาจาก angiotensin II ดังกล่าวไว้ข้างต้น

เภสัชจลนศาสตร์ของ perindopril

Perindopril⁸⁻¹⁰ เป็น prodrug ที่ถูกดูดซึมได้อย่างรวดเร็วและมีค่า bioavailability เท่ากับ 75-95% อย่างไรก็ตาม หลังถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารและผ่านเข้าสู่ตับ พบว่า perindopril ประมาณ 20-50% จะถูก hepatic esterase ในตับเปลี่ยนแปลงเป็น perindoprilat ซึ่งเป็น active metabolite ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (ค่าครึ่งชีวิตเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงเท่ากับ 1-2 ชั่วโมง) ทั้งนี้ สามารถตรวจพบ perindoprilat ได้ภายใน 30 นาทีหลังรับประทานยา และถึงระดับสูงสุดในเลือดได้ภายใน 3-7 ชั่วโมง อาหารไม่มีผลกระทบต่อค่า oral bioavailability

ของ perindopril แต่มีผลลด oral bioavailability ของ perindoprilat ได้ประมาณ 35% ดังนั้น ในทางทฤษฎีจึงแนะนำให้รับประทานยาในช่วง ก่อนอาหาร ทั้ง perindopril และ perindoprilat รวมทั้ง metabolites ของมันถูกกำจัดทางไตเป็นหลัก โดยการขจัดของ perindoprilat มีลักษณะ เป็น biphasic elimination pharmacokinetics กล่าวคือช่วงแรกมีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 3-10 ชั่วโมง และช่วงหลังมีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 30-120 ชั่วโมง (เนื่องจากมี dissociation จาก ACE ที่อยู่ในเนื้อเยื่อได้ค่อนข้างช้า) การใช้ยาในผู้ที่มีการทำงานของไตบกพร่องควรปรับลดขนาดยา ลง นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลง (metabolic clearance) ของ perindopril ยังลดลงได้ใน ผู้ป่วยที่ตับทำงานบกพร่องอย่างรุนแรง

Perindopril มี onset of action ที่ ก่อนข้างช้าเมื่อเทียบกับ ACE inhibitors ชนิดอื่น กล่าวคือ ต้องใช้เวลาประมาณ 8 ชั่วโมงจึง จะเห็นฤทธิ์ยับยั้ง ACE ที่สูงสุดหลังการ รับประทาน perindopril-*tert*-butylamine ใน ขนาด 8 mg ครั้งเดียว (single oral dose) อย่างไรก็ตาม ยังสามารถพบการยับยั้งได้ถึง 70% ณ เวลา 24 ชั่วโมงหลังรับประทานยา⁹ ส่งผลให้ perindopril มีค่า trough to peak ratio ที่สูงสุด (ประมาณ 75-100%) เมื่อเปรียบเทียบกับ ACE inhibitors ทุกชนิด¹¹ ดังนั้น การ รับประทานยารวันละครั้ง จึงให้ประสิทธิภาพที่ดี ต่อการควบคุมความดันเลือดตลอด 24 ชั่วโมง

บทบาทของ perindopril ใน cardiovascular continuum

Cardiovascular disease continuum¹² หมายถึง การดำเนินของโรคระบบหัวใจและ หลอดเลือดที่เริ่มจากการมีปัจจัยเสี่ยง (เช่น เบาหวาน, ความดันเลือดสูง) และพัฒนาไป เป็น coronary artery disease, myocardial infarction (MI) หรือ stroke, cardiac remodeling, congestive heart failure (CHF), และเสียชีวิต ตามลำดับ

จวบจนถึงปัจจุบัน มีการศึกษาทางคลินิก ที่สนับสนุนว่า perindopril เป็นยาที่มีประสิทธิผล ต่อทุกขั้นตอนของ cardiovascular continuum ยกตัวอย่างเช่น

The Action in Diabetes and Vascular disease: preterAx and diamicroN MR Controlled Evaluation (ADVANCE) - BP lowering intervention¹ เป็นการศึกษาประสิทธิผล ของ fixed combination ของ perindopril/ indapamide (Per/Ind) ต่อการป้องกันอุบัติการณ์ ของ macrovascular และ microvascular events ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 โดยไม่คำนึงถึง ระดับความดันเลือดก่อนใช้ยา และชนิดของยา ลดความดันเลือดที่ผู้ป่วยกำลังได้รับอยู่ ทั้งนี้ ADVANCE trial¹ ได้แสดงว่าการเสริม Per/Ind แก่ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 มีผลลดความเสี่ยง ต่อการเกิด major vascular events (9%) รวมทั้ง all-cause death (14%) และ cardiovascular death (18%) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการ ใช้ยาหลัก

The Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial - Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA)² เป็นการศึกษาในผู้ป่วย

ความดันเลือดสูงที่แสดงว่าการใช้ amlodipine/perindopril ร่วมกัน มีผลลดความเสี่ยงต่อ endpoints ต่างๆ อย่างมีนัยสำคัญ (เช่น fatal และ non-fatal stroke, total cardiovascular events และ procedures, all-cause mortality, และ new-onset diabetes) เมื่อเทียบกับการใช้ atenolol/bendroflumethiazide ร่วมกัน

The EUropean trial On reduction of cardiac events with Perindopril in stable coronary Artery disease (EUROPA)³ เป็นการศึกษาที่แสดงว่า การเสริม perindopril ร่วมกับการรักษามาตรฐานในผู้ป่วย chronic stable coronary artery disease มีผลลดความเสี่ยงต่อการเกิดผลรวมของ cardiovascular death, nonfatal MI, และ resuscitated cardiac arrest ได้อย่างมีนัยสำคัญถึง 20% เมื่อเทียบกับการใช้ยาหลอก

The Perindopril pROtection aGainst REcurent Stroke Study (PROGRESS)⁴ เป็นการศึกษาที่แสดงว่า การใช้ perindopril-based regimen เป็นระยะเวลานาน 4 ปี ในผู้ป่วยที่เคยมีประวัติ stroke มาก่อน มีผลลดความเสี่ยงต่อการเกิด recurrent stroke ได้อย่างมีนัยสำคัญถึง 28% และยังสามารถลดความเสี่ยงต่อการเกิด major vascular events (ซึ่งได้แก่ ผลรวมของ stroke, heart attack, และ cardiovascular death) ได้ถึง 26% เมื่อเทียบกับการใช้ยาหลอก

The Perindopril and Remodeling in Elderly with Acute Myocardial Infarction (PREAMI) study⁵ เป็นการศึกษาที่แสดงว่า การใช้ perindopril เป็นระยะเวลานาน 1 ปี ใน

ผู้ป่วยสูงอายุซึ่งรอดชีวิตจากภาวะ AMI (แต่มี left ventricular function ปกติ) มีผลลดความเสี่ยงต่อผลรวมของ death, hospitalization จาก heart failure, และ cardiac remodeling ได้อย่างมีนัยสำคัญถึง 22% เมื่อเทียบกับการใช้ยาหลอก

The Perindopril in Elderly People with Chronic Heart Failure (PEP-CHF)⁶ เป็นการศึกษาในผู้ป่วย heart failure ที่มีอายุ ≥ 70 ปี ซึ่งการตรวจด้วย echocardiogram บ่งชี้ว่ามี diastolic dysfunction แต่ปราศจาก substantial LV systolic dysfunction หรือ valve disease ผลการศึกษาในช่วงปีแรกแสดงว่า perindopril มีผลลดอุบัติการณ์การเข้าโรงพยาบาลแบบไม่ได้วางแผนล่วงหน้าอันเนื่องมาจาก heart failure (unplanned heart failure related hospitalization) ได้อย่างมีนัยสำคัญถึง 37% เมื่อเทียบกับการใช้ยาหลอก

ผู้ป่วยส่วนใหญ่สามารถยอมรับและทนต่อ perindopril ได้ดี ทั้งนี้ เป็นที่ทราบกันดีว่า อาการไม่พึงประสงค์ที่พบได้บ่อยจากการใช้ยาในกลุ่ม ACE inhibitors ได้แก่ อาการไอแห้ง ซึ่งโดยมากเป็นอาการที่ไม่รุนแรงและหายได้เอง หลังหยุดใช้ยา อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาทางคลินิกระยะยาวพบว่า perindopril มีอุบัติการณ์ของอาการไอ, ความดันเลือดต่ำ, และการถอนตัวออกจากการศึกษาที่ค่อนข้างต่ำ^{9,13}

ปัญหาเกี่ยวกับความคงตัวของ perindopril-*tert*-butylamine

ความคงตัวของยา หมายถึงความคงทนของยาต่อกระบวนการทางเคมี กายภาพ

ชีววิทยา และจุลชีววิทยา ที่เกิดขึ้นระหว่างการผลิตและการเก็บรักษา ส่วน shelf life ของยา หมายถึงระยะเวลาในการเก็บรักษายาซึ่งฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามีได้ลดลงต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดโดยทั่วไป ถือว่า ปริมาณของ active substance ในยาไม่ควรเปลี่ยนแปลงไปมากกว่า 5% และการเปลี่ยนแปลงนั้นต้องไม่เกิดสารพิษ¹⁴ อนึ่ง สภาพภูมิอากาศ ยกตัวอย่างเช่น ความชื้น oxygen แสงสว่าง และอุณหภูมิ ล้วนเป็นปัจจัยที่ส่งอิทธิพลต่อความคงตัวของยาได้

การประเมินความคงตัวของยาเป็นสิ่งที่กำหนดไว้ในข้อบังคับของหน่วยงานของรัฐที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการจำหน่ายยา ทั้งนี้ The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) ได้จัดทำ ICH guidelines สำหรับการตรวจสอบความคงตัวของยา^{15,16} โดยได้กำหนดสภาพอุณหภูมิและ RH ที่ใช้สำหรับการประเมินที่เรียกว่า climatic zones ไว้ 4 สภาพ ซึ่งได้สรุปรายละเอียดพร้อมยกตัวอย่างประเทศที่มีสภาพภูมิอากาศที่เข้าได้กับแต่ละ zone¹⁶ ไว้ในตารางที่ 1 อนึ่ง climatic zone IV เป็นสภาพที่ใช้สำหรับการศึกษาความคงตัวของยาในสภาวะเร่ง (accelerated aging studies)

เนื่องจาก active substance อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บรักษาภายใต้สภาพที่มีอุณหภูมิและ RH สูง (climatic zones III และ IV)¹⁷⁻²⁰ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง active substance กับ

excipients ซึ่งส่งผลต่อปริมาณรวมของ active substance หรือทำให้คุณลักษณะบางประการ (เช่น อัตราการปลดปล่อย active substance และการละลายตัว) เปลี่ยนแปลงไป²¹ ยิ่งไปกว่านั้น degradation products ที่เกิดขึ้นภายใต้สภาพดังกล่าว อาจเป็นสาเหตุของอาการไม่พึงประสงค์ ยกตัวอย่างเช่น การเปลี่ยนแปลงของ tetracycline ภายใต้สภาพที่มีอุณหภูมิและ RH สูง ไม่เพียงทำให้ยาเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและกายภาพเท่านั้น (สีของยาเปลี่ยนจากเหลืองอ่อนเป็นน้ำตาลเข้ม) แต่ degradation product(s) ยังทำให้เกิดความเป็นพิษต่อไตอีกด้วย^{22,23}

ที่ผ่านมา การศึกษาความคงตัวของยาได้ทวีความสำคัญเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก ทั้งนี้ เป็นผลสืบเนื่องมาจากโลกาภิวัตน์ของตลาดยา พบว่าปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรมที่ได้รับการผลิตในประเทศต่างๆ และถูกส่งกระจายไปทั่วโลก อีกทั้งมีการเก็บรักษาภายใต้สภาพที่แตกต่างกัน ดังนั้น World Health Organization (WHO) ซึ่งเล็งเห็นความสำคัญดังกล่าว จึงแนะนำให้มีการศึกษาความคงตัวของยาภายใต้สภาพ climate zone IV สำหรับยาที่มีการใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลก²⁴

Pirindopril ที่มีจำหน่ายตั้งแต่ปี ค.ศ. 1988 อยู่ในรูปของเกลือ *tert*-butylamine²⁵ เนื่องจากในขั้นตอนการผลิต (crystallization phase) สามารถแยกสิ่งปลอมปนออกได้ง่าย อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาด้านความคงตัวใน climatic zones III และ IV พบว่า pirindopril-

tert-butylamine จำเป็นต้องเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ชนิดพิเศษ เพื่อป้องกันมิให้ยาเกิดการเปลี่ยนแปลงภายใต้สภาพดังกล่าว ทั้งนี้ ในประเทศที่มีสภาพภูมิอากาศที่เทียบเท่ากับ climatic zones I และ II มีการจำหน่าย perindopril-*tert*-butylamine ที่บรรจุอยู่ใน PVC/aluminum blister packs ส่วนในประเทศที่มีสภาพเทียบเท่ากับ climatic zones III และ IV จำเป็นต้องใช้ watertight bag ห่อหุ้ม PVC/aluminum blister packs และใส่สารกันชื้น ซึ่งจะเป็นการเพิ่มความคงตัวของยาที่ดี

การศึกษาความคงตัวของยาตาม ICH guidelines แสดงว่า การเปลี่ยนแปลงของ perindopril ในระหว่างการเก็บรักษาเป็นผลเนื่องมาจากกลไก 2 ประการ¹⁷ คือ

1. สภาพที่มี RH สูง ทำให้เกิด hydrolysis ของ ester ส่งผลให้เกิด diacid metabolite ซึ่งเป็นสารที่ถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารได้น้อย

2. สภาพที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูง ทำให้โครงสร้างทางโมเลกุลของยาเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปวงแหวน (cyclization) ส่งผลให้เกิด

ตารางที่ 1: ปริมาณของ climatic zones และตัวอย่างของประเทศที่มี climatic zones แบบต่างๆ (คัดแปลงจาก Teleiko E¹⁷)

Zone	อุณหภูมิ	RH	ตัวอย่างของประเทศ
Zone I	อุณหภูมิ < 20.5°C	45%	Canada, Poland, Russia, และ UK
Zone II	อุณหภูมิ 20.5-24°C	60%	Australia, China, France, Spain, และ USA
Zone III	อุณหภูมิ > 24°C	35%	Botswana และ Jordan
Zone IV	อุณหภูมิ > 24°C	75%	Brazil, India, Singapore, Taiwan, ประเทศไทย

RH หมายถึง ความชื้นสัมพัทธ์ (relative humidity)

ตารางที่ 2: การเปรียบเทียบความคงตัวของ non-salted perindopril, perindopril-*tert*-butylamine และ perindopril arginine ที่เก็บรักษาในขวดเปิดหรือปิด ณ อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 2 วัน (คัดแปลงจาก Teleiko E¹⁷)

บรรจุภัณฑ์	Non-salted perindopril	ปริมาณยาที่เหลืออยู่หลังการเก็บรักษา (%)	
		Perindopril- <i>tert</i> -butylamine	Perindopril arginine
ขวดปิด, 100°C, 2 วัน	> 99%	100%	100%
ขวดเปิด, 100°C, 2 วัน	< 1%	< 1%	100%

lactam-type compounds และท้ายที่สุดได้ degradation product ที่เรียกว่า Y31

อนึ่ง การเปลี่ยนแปลงเชิงโครงสร้างไปอยู่ในรูปวงแหวน สามารถป้องกันได้โดยการผลิดยาในรูปของเกลือ (salification) ทั้งนี้เมื่อทำการทดสอบ โดยนำ nonsalified perindopril และ perindopril ที่อยู่ในรูปเกลือ *tert*-butylamine มาเก็บรักษาไว้ในภาชนะปิด ณ อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 2 วัน พบว่า nonsalified perindopril ทั้งหมดมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น Y31 อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ perindopril-*tert*-butylamine ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ อย่างไรก็ตาม หากทำการศึกษาในภาชนะเปิด พบว่า perindopril-*tert*-butylamine ก็สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็น Y31 ได้เช่นกัน (ตารางที่ 2) ทั้งนี้ อธิบายได้ว่าอุณหภูมิที่สูงทำให้เกลือ *tert*-butylamine เกิดการระเหย จึงเหลือแต่ perindopril ซึ่งพร้อมที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น Y31 ได้ ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงว่า perindopril ที่อยู่ในรูปของเกลือ *tert*-butylamine อาจเสี่ยงต่อการสูญเสียความคงตัว หากมีการเปิดบรรจุภัณฑ์¹⁷

จากข้อมูลดังกล่าวมาข้างต้น จะเห็นว่าปัญหาเรื่องความคงตัวของ perindopril-*tert*-butylamine อาจส่งผลเสียต่อ bioavailability ของทั้ง perindopril และ perindoprilat นอกจากนี้ยังอาจมีผลกระทบที่ทำให้ประสิทธิภาพทางคลินิกลดลงตามไปด้วย ดังนั้นจึงได้มีความพยายามในการพัฒนาเกลือของ perindopril ในรูปแบบใหม่ ซึ่งมีความคงตัวที่ดีขึ้น ซึ่งจะได้นำโดยละเอียดในหัวข้อต่อไป

ความคงตัวของ perindopril arginine

จากการค้นคว้าเพื่อพัฒนาในรูปแบบของเกลือ โดยการนำสารที่ไม่สามารถระเหย (nonvolatile alternatives) มารวมตัวกับ perindopril พบว่า ยาในรูปแบบของเกลือ arginine มีความคงตัวที่ดีกว่าเกลือ *tert*-butylamine กล่าวคือ มีความคงตัวถึง 100% เมื่อทดสอบทั้งในภาชนะปิดและภาชนะเปิด ณ อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 2 วัน¹⁷ (ตารางที่ 2)

นอกจากนี้ การแทนที่ perindopril-*tert*-butylamine ด้วย perindopril arginine ยังเป็นวิธีการแก้ปัญหาบรรจุภัณฑ์ที่ยั่งยืนและซับซ้อนสำหรับการใช้ในประเทศที่มีสภาพภูมิอากาศที่เทียบได้กับ climatic zones III และ IV ทั้งนี้ จากการศึกษาความคงตัวของยาเม็ด perindopril arginine ที่บรรจุใน high density polyethylene (HDPE) canister ที่มีสารกันชื้น เปรียบเทียบกับยาเม็ด perindopril-*tert*-butylamine ที่บรรจุใน aluminum/PVC blister packs ภายใต้ climatic zone IV (40°C/75% RH) เป็นระยะเวลานาน 6 เดือน พบว่า perindopril arginine มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น degradation products เพียง 0.82% แต่ perindopril-*tert*-butylamine มีการเปลี่ยนแปลงถึง 8.74% ผลการศึกษาดังกล่าวนับฐานว่า perindopril arginine ที่บรรจุใน HDPE canister มีความคงตัวที่ดีกว่า perindopril-*tert*-butylamine ที่บรรจุใน blister packs¹⁷ นอกจากนี้ การเปลี่ยนมาใช้ perindopril arginine ยังมีผลเพิ่ม shelf life ได้ถึง 50% กล่าวคือ เพิ่มจาก 2 ปี เป็น 3 ปี โดยไม่ขึ้นอยู่กับ

ตารางที่ 3 สัดส่วน (ratio) ของ pharmacokinetic parameters สำหรับ perindopril และ perindoprilat (ปรับค่าเริ่มต้นแล้ว) หลังจากการรับประทานยา perindopril arginine (10 mg) หรือ perindopril-*tert*-butylamine (8 mg) (ครั้งเดียว) ที่ทดสอบในอาสาสมัครเพศชายสุขภาพดีจำนวน 36 ราย (ดัดแปลงจาก Telejko E¹⁷)

Parameter	สัดส่วนของ perindopril arginine / perindopril- <i>tert</i> -butylamine (90% CI)	
	Perindopril	Perindoprilat
AUC _t	96.00% (92%, 100%)	96.55% (92%, 108%)
C _{max}	98.23% (88%, 109%)	92.17% (87%, 97%)

CI, confidence intervals; AUC_t, area under the plasma concentration-time curve; C_{max}, maximum plasma concentration

อุณหภูมิที่เก็บรักษา¹⁷

Bioequivalence ของ perindopril arginine เปรียบเทียบกับ perindopril-*tert*-butylamine

เนื่องจาก perindopril arginine มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า perindopril-*tert*-butylamine ถึงเกือบ 25% (542.680 เปรียบเทียบกับ 441.615) ดังนั้นเพื่อให้ยาทั้งสองชนิดมีปริมาณเนื้อยาของ perindopril (ต่อเม็ด) ที่เท่าเทียมกัน จึงต้องมีการปรับขนาดยาโดยใช้ perindopril arginine 5 mg ทดแทน perindopril-*tert*-butylamine 4 mg และ perindopril arginine 10 mg ทดแทน perindopril-*tert*-butylamine 8 mg^{17,26}

ได้มีการศึกษา bioequivalence ของ perindopril ทั้งสองชนิด^{17,26} ในอาสาสมัครชายสุขภาพดีจำนวน 36 ราย ที่มีอายุเฉลี่ย 31.3 ± 9.6 ปี และมี body mass index เฉลี่ย 23.3 ± 1.7 kg/m² การศึกษานี้เป็นแบบ open-label, randomized, two-period, crossover, pharmacokinetic study โดยสุ่มตัวอย่างอาสาสมัครออกเป็น 2 กลุ่ม แต่ละ

กลุ่มได้รับประทาน immediate-release perindopril (ครั้งเดียว) ในรูปเกลือ arginine (10 mg) หรือ *tert*-butylamine (2 × 4 mg) อย่างใดอย่างหนึ่ง หลังจากนั้นอีก 8 วัน (washout period) แต่ละกลุ่มจะถูกสลับให้รับประทานยาในรูปเกลือที่ต่างจากการทดสอบครั้งแรก ทั้งนี้อาสาสมัครจะได้รับการติดตาม pharmacokinetic parameters ซึ่งได้แก่ maximum plasma concentration (C_{max}), time at maximum plasma concentration (t_{max}), area under the plasma concentration-time curve (AUC_t), และ half-life (t_{1/2}) นอกจากนี้ยังมีการติดตาม cardiovascular parameters ซึ่งได้แก่ blood pressure (BP) และ heart rate, รวมทั้งผลข้างเคียงในช่วงก่อน และเป็นระยะๆ ตลอดช่วง 120 ชั่วโมงหลังให้ยา การศึกษานี้ยังมีการนัดตรวจอาสาสมัครในวันที่ 3-5 หลังได้รับการเจาะเลือดครั้งสุดท้ายเพื่อตรวจร่างกาย และตรวจ electrocardiogram (ECG), BP, heart rate, และ laboratory parameters

Bioequivalence ของ perindopril ในรูปเกลือทั้งสองชนิดได้รับการเปรียบเทียบโดยพิจารณาจาก perindopril arginine/ perindopril-*tert*-butylamine AUC_t ratios ซึ่งมีค่าเท่ากับ 96% (95% confidence interval (CI), 92–100%) สำหรับ AUC ของ perindopril และ 96.55% (95% CI, 92–108%) สำหรับ AUC ของ perindoprilat (ตารางที่ 3) โดยพบว่า CIs อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ว่ายาทั้งสองชนิดมี bioequivalence ที่เท่าเทียมกัน (80–125%)^{17,26} หนึ่ง ยาในรูปเกลือทั้งสองชนิดยังมี pharmacokinetic parameters อื่นๆ ที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการลดความดันเลือดไม่แตกต่างกัน และไม่พบนัยสำคัญทางคลินิกต่อการเปลี่ยนแปลง laboratory parameters และ ECG parameters

เหตุการณ์ไม่พึงประสงค์จากการใช้ perindopril arginine

การศึกษา bioequivalence ที่กล่าวข้างต้นได้มีการบันทึกการยอมรับ (acceptability profile) ของยาทั้งสองชนิดไว้ด้วย พบว่า 2/36 ราย (5.56%) เกิดเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ที่สัมพันธ์กับการรักษาในช่วงที่ได้รับ perindopril arginine ในขณะที่ 6/36 ราย (16.67%) เกิดเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ที่สัมพันธ์กับการรักษาในช่วงที่ได้รับ perindopril-*tert*-butylamine ข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า acceptability profile ของ perindopril arginine มีได้ดียิ่งไปกว่า perindopril-*tert*-butylamine¹⁷ หนึ่ง เหตุการณ์ไม่พึงประสงค์

ที่พบ (เช่น ปวดศีรษะ, อ่อนเพลีย, Influenza-like illness, ไอ เป็นต้น) ก็คล้ายคลึงกับที่มีผู้รายงานไว้ในการศึกษาทางคลินิกของ perindopril^{3,4} นอกจากนี้ โอกาสเกิดอาการไอจากการใช้ perindopril arginine ที่ค่อนข้างต่ำ (2.8%)¹⁷ ก็เป็นไปในลักษณะเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานว่า perindopril ก่อให้เกิดอาการไอน้อยกว่า ACE inhibitors ชนิดอื่น¹³

ความพึงพอใจต่อการใช้ perindopril arginine

ได้มีการศึกษาความพึงพอใจของผู้ใช้ยาจำนวน 120 ราย โดยเปรียบเทียบการใช้ perindopril ที่บรรจุใน simplified HDPE canister กับ blister pack¹⁷ กลุ่มตัวอย่างเป็นเพศชายและหญิงที่มีอายุ 60–70 ปี (50%) และมีอายุมากกว่า 70 ปี (50%) ซึ่งได้รับการประเมินผลจากศูนย์เภสัชกรรม 3 ศูนย์ ในประเทศ Australia ทั้งนี้ ผู้ใช้ยาทุกคนล้วนได้รับยาระยะยาวมาก่อนอย่างน้อยหนึ่งชนิด จากการศึกษาพบว่า 69% มีความพึงพอใจโดยรวม (overall preference) ต่อบรรจุภัณฑ์แบบ canister (perindopril arginine 5 และ 10 mg) เปรียบเทียบกับ 31% ($p < 0.01$) ต่อบรรจุภัณฑ์แบบ blister pack (perindopril-*tert*-butyl-amine 4 และ 8 mg) ส่วนการประเมินในแง่มุมต่างๆ พบว่า canister มีคะแนนความพึงพอใจที่สูงกว่าแบบ blister pack โดยมีจุดเด่นที่พกพาสะดวก (78% เทียบกับ 13%), ใช้ได้อย่างสะดวกสบาย (68% เทียบกับ 24%), เก็บรักษาง่าย (62% เทียบกับ 17%) และเปิดง่าย (50% เทียบกับ

27%) เป็นต้น ประเด็นดังกล่าวอาจจะส่งผลต่อ (compliance) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในผู้ป่วย ความร่วมมือในการใช้ยาอย่างสม่ำเสมอ สูงอายุ

ตารางที่ 4 ความแตกต่างระหว่าง perindopril arginine เปรียบเทียบกับ perindopril-tert-butylamine (ดัดแปลงจาก Telejko E¹⁷)

หัวข้อเปรียบเทียบ	Perindopril arginine	Perindopril-tert-butylamine
น้ำหนักโมเลกุล	542.680	441.615
ขนาดยาที่ใช้	5–10 mg/วัน	4–8 mg/วัน
ความคงตัวของยา (ปริมาณยาที่คงเหลือหลังการเก็บรักษาในภาชนะเปิด ณ อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 2 วัน)	100%	<1%
ความคงตัวของยา (สัดส่วนของ degradation product ที่เกิดขึ้นเมื่อทดสอบภายใต้ climatic zone IV เป็นระยะเวลานาน 6 เดือน)	0.82%	8.74%
โอกาสเกิดเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ที่สัมพันธ์กับการรักษา ($n = 36$)	5.56%	16.67%
Shelf life	3 ปี	2 ปี

บทสรุป

ความแตกต่างระหว่าง perindopril ในรูปเกลือทั้งสองชนิดแสดงไว้ในตารางที่ 4 ทั้งนี้สรุปได้ว่า ACE inhibitor perindopril ในรูปเกลือ arginine มีความคงตัวที่ดี และมี shelf life ที่ยาวนานขึ้น อย่างไรก็ตาม น้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันระหว่าง perindopril ในรูปเกลือทั้งสองชนิด ทำให้จำเป็นต้องเปลี่ยนขนาดยา (ต่อเม็ด) โดยนำ perindopril arginine 5 mg มาทดแทน perindopril-tert-butylamine 4 mg และนำ perindopril arginine 10 mg มาทดแทน perindopril-tert-butylamine 8 mg ทั้งนี้มี

การศึกษาทาง pharmacokinetics ที่แสดงว่า perindopril arginine มี bioequivalence ที่เท่าเทียมกับ perindopril-tert-butylamine ดังนั้นประโยชน์อันพึงได้จาก perindopril-tert-butylamine ที่มีการศึกษาทางคลินิกขนาดใหญ่สนับสนุน จึงสามารถนำมาปรับใช้กับ perindopril arginine ได้ ด้วยเหตุนี้ ข้อบ่งชี้ของ perindopril arginine ในประเทศที่มีการขึ้นทะเบียนยาไว้จึงครอบคลุมถึงความดันเลือดสูง, heart failure, และ stable coronary artery disease^{17,27} นอกจากนี้ ความคงตัวที่ดีขึ้นของ perindopril arginine ยังทำให้สามารถใช้ใน

บรรจุภัณฑ์แบบ HDPE canister ได้ในทุกสภาพภูมิอากาศ ซึ่งความพึงพอใจของผู้ป่วยต่อบรรจุภัณฑ์แบบ canister น่าจะส่งผลให้มีความร่วมมือในการใช้ยาอย่างสม่ำเสมอมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. ADVANCE Collaborative Group. Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide on macrovascular and microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (the ADVANCE trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;370:829-40.
2. The ASCOT Investigators. Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazine as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2005;366:895-906.
3. Fox KM, European trial on reduction of cardiac events with perindopril in stable coronary artery disease investigators. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet* 2003;362:782-8.
4. PROGRESS Collaborative Group. Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. *Lancet* 2001;358:1033-41.
5. The PREAMI Investigators. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition with perindopril on left ventricular remodeling and clinical outcomes. *Arch Intern Med* 2006;166:659-66.
6. Cleland JG, Tendera M, Adamus J, Freemantle N, Polonski L, Taylor J; PEP-CHF Investigators. The perindopril in elderly people with chronic heart failure (PEP-CHF) study. *Eur Heart J* 2006; 27:2338-45.
7. Benowitz NL. Antihypertensive agents. In: Katzung BG, editor. *Basic & clinical pharmacology*. 8th ed. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2001. p.155-80.
8. Jackson EK. Renin and angiotensin. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. *Goodman & Gilman's The Pharmacological basis of therapeutics*. 10th ed. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2001. p.809-42.
9. Ferrari R. Angiotensin-converting enzyme inhibition in cardiovascular disease: evidence with perindopril. *Expert Rev Cardiovascular Ther* 2005;3(1):15-29.
10. Alfakih K, Hall AS. Perindopril. *Expert Opin Pharmacother* 2006;7(1):63-71.
11. Physicians' Desk Reference, 55th ed. Montvale, NJ: Medical Economics Company, 2001.
12. Dzau V, Braunwald E. Resolved and unresolved issues in the prevention and treatment of coronary artery disease: a workshop consensus statement. *Am Heart J* 1991;121:1244-63.
13. Yoshinaga K, Saruta T, Abe K, et al. Clinical evaluation of monotherapy with perindopril, an ACE inhibitor, in the treatment of essential hypertension: double-blind parallel comparison with enalapril. *J Clin Ther Medicines* 1997;13:4259-97.
14. Telejko E. Stability of tablets and efficiency and safety of drug use in various situations. *Farmacja Polska* 2006;62:381-88.
15. ICH Steering Committee. Quality guidelines. Available from <http://www.ich.org/cache/compo/363-272-1.html>. [accessed 14 June 2008]
16. Dietz R, Feilner K, Gerst F, Grimm W. Drug stability testing. Classification of countries according to climatic zone. *Drugs made in Germany* 1993;36:99-103.
17. Telejko E. Perindopril arginine: benefits of a new salt of the ACE inhibitor perindopril. *Current Medical Research and Opinion* 2007; 23: 953-60.
18. Al Omari MM, Abdelah MK, Badwan AA, Jaber AM. Effect of the drug-matrix on the stability of enalapril maleate in tablet formulations. *J Pharm Biomed Anal* 2001;25:893-902.
19. Reynolds JM, Rogers DH. Adjusting dissolution specifications for the variability induced by storage conditions. *J Biopharm Stat* 2000;10:425-31.
20. Stanis B. Kinetics of degradation of quinapril hydrochloride in tablets. *Pharmazie* 2003;58:249-51.
21. Risha PG, Vervaet C, Vergote G, et al. Drug formulations intended for the global market should be tested for stability under tropical climatic conditions. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;59:135-41.
22. Wu Y, Fassihi R. Stability of metronidazole, tetracycline HCl and famotidine alone and in combination. *Int J Pharm* 2005; 290:1-13.

23. Mohamad H, Aiache JM, Renoux R, et al. Study on the biopharmaceutical stability of medicines IV. Application to tetracycline hydrochloride capsules. In vivo study. *STP Pharm* 1987;3:407-11.
24. Nazerali H, Muchemwa T, Hogerzeil HV. Stability of Essential Medicines in Tropical Climates: Zimbabwe. WHO/ DAP/94.16. Geneva, Switzerland: WHO 1996.
25. Medenica M, Ivanovic D, Maskovic M, Jancic B, Malenovic A. Evaluation of impurities level of perindopril tert-butylamine in tablets. *J Pharm Biomed Anal* 2007;44:1087-94.
26. Health Canada 's Summary Basis of Decision. COVERSYL®. Available from http://www.hc-sc.gc.ca/dhp_mpps/prodpharma/sbd-smd/phase1-decision/drug_med/sbd_smd_2006_coversyl_092251-eng.php#1. [accessed 14 June 2008]
27. Servier Canada Inc. COVERSYL®: perindopril arginine 2.5 mg, 5 mg, and 10 mg tablets (Product Monograph Part III). Available from http://www.hc-sc.gc.ca/dhp_mpps/alt_formats/hpfbdgpsa/pdf/prodpharma/pm_mp_2005_coversyl_092251_partiii-eng.pdf. [accessed 14 June 2008]

SHORT COMMUNICATION

การใช้ยาเพื่อลดความดันโลหิตเป็นกิจวัตรในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2:บทเรียน จากการศึกษา ADVANCE -trial

ข้อคิดเห็นจากบทบรรณาธิการของ Carl Erik Mogensen www.incirculation.net

ณัฐพงศ์ โฆษณานันท์

หน่วยต่อมไร้ท่อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

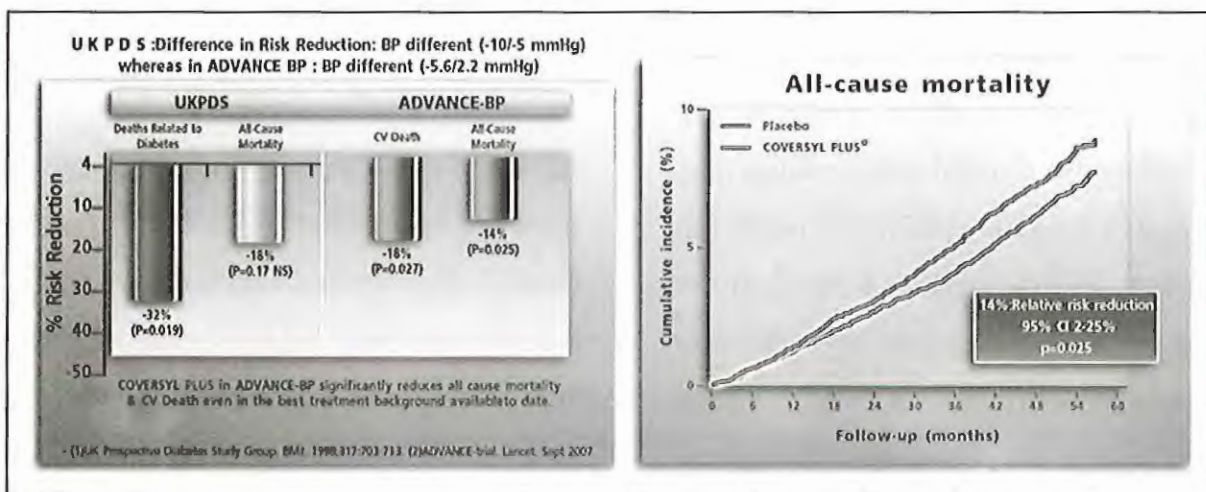
การศึกษา ADVANCE (Action in Diabetes and Vascular disease: preterAx and diamicroN-MR Controlled Evaluation) มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ข้อมูลเกี่ยวกับประโยชน์และความเสี่ยงของการลดความดันโลหิตเป็นกิจวัตร (โดยไม่คำนึงถึงระดับความดันโลหิตตั้งต้นก่อนการรักษา) และ ผลของการควบคุมระดับน้ำตาลแบบเข้มงวดในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่สองที่มีความเสี่ยงสูงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (ถึงแม้การศึกษาไม่ได้ระบุว่าจะระดับที่ต่ำมากเพียงใดในการรักษาจึงเป็นไปได้ว่าผู้วิจัยน่าจะมีความลังเลที่จะเลือกผู้ป่วยที่มีระดับของการควบคุมตั้งต้นอยู่ในเกณฑ์ต่ำอยู่แล้วมาเข้าร่วมการศึกษา ดังนั้นควรระมัดระวังอย่างยิ่งในการแปลผลที่ได้ในผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าว) การศึกษาเป็นการทดสอบสองการรักษาคือ: ยา perindopril ร่วมกับ indapamide (Coversyl Plus) ในขนาดคงที่; และยาซัลโฟไนลล์เรีย gliclazide MR (Diamicon MR)

ความน่าสนใจของการรักษาดังกล่าวได้มาจากผลที่ขัดแย้งระหว่างการศึกษา

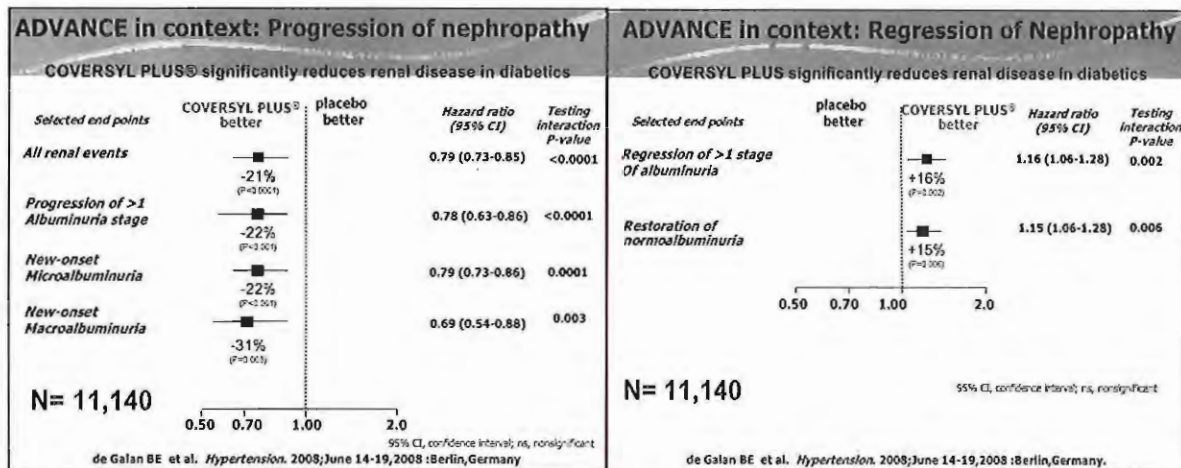
University Group Diabetes Program (UGDP) study¹ ในสหรัฐอเมริกาและการศึกษา United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)² รายงานการศึกษา UGDP ซึ่งตีพิมพ์ในปี 1970 นอกจากจะให้ผลลบแล้ว ยังพบแนวโน้มว่าการใช้ยาซัลโฟไนลล์เรียอาจทำให้เกิดปัญหาโรคหัวใจและหลอดเลือด ข้อมูลดังกล่าวทำให้เกิดความกังวลอย่างมาก แต่วิธีการศึกษาและการวิเคราะห์ข้อมูลในการศึกษาดังกล่าวยังมีปัญหาอย่างมากในความเห็นของกลุ่มผู้วิจัยและแพทย์ในประเทศสหรัฐอเมริกา และยุโรป โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร. Robert Turner แห่งมหาวิทยาลัยออกฟอร์ดซึ่งไม่ยอมรับในผลการศึกษา UGDP จึงได้เริ่มทำการศึกษา UKPDS โดยเชื่อว่าการควบคุมระดับน้ำตาลอย่างเดียวยังไม่ได้เป็นปัจจัยเดียวที่มีผลในการดำเนินโรคของเบาหวาน การศึกษาดังกล่าวยังได้ทำการทดสอบผลของการควบคุมความดันโลหิต ดูเหมือนเป็นการตัดสินใจที่ถูกต้องอย่างยิ่ง โดยผลของการศึกษาที่ตีพิมพ์ในปี 1998 แสดงให้เห็นว่าผลดีของการลดความดันโลหิตมีความชัดเจนกว่าการลดระดับน้ำตาล

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการศึกษ UKPDS และ ADVANCE (ดูรูปที่ 1) แล้ว พบว่ามีความรู้ใหม่ที่ควรตระหนักถึงผลการรักษาที่ต่างกันอย่างมากโดยเฉพาะอัตราการเสียชีวิตโดยรวม (All cause mortality) ที่ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งพบได้เฉพาะจากการศึกษา ADVANCE เท่านั้น ที่สำคัญมีสาเหตุหลักมาจากการเสียชีวิตจากระบบหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular mortality) (-18% $P < 0.027$) ถึงแม้ว่าผลจากการศึกษา UKPDS ระบุว่า การลดความดันโลหิตสามารถลดการเสียชีวิตทั้งหมดลงได้ แต่ยังไม่มีความสำคัญทางสถิติ (-18% $P < 0.17$) และที่สำคัญและเห็นผลชัดเจนมากที่สุดจากการรักษาโดยค่อยๆลดความดันโลหิตของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 น่าจะมาจากการช่วยลดและชะลอการเสื่อมของไตที่เห็นได้ชัดเจนมาก จากการประกาศผลเมื่อไม่นานนี้

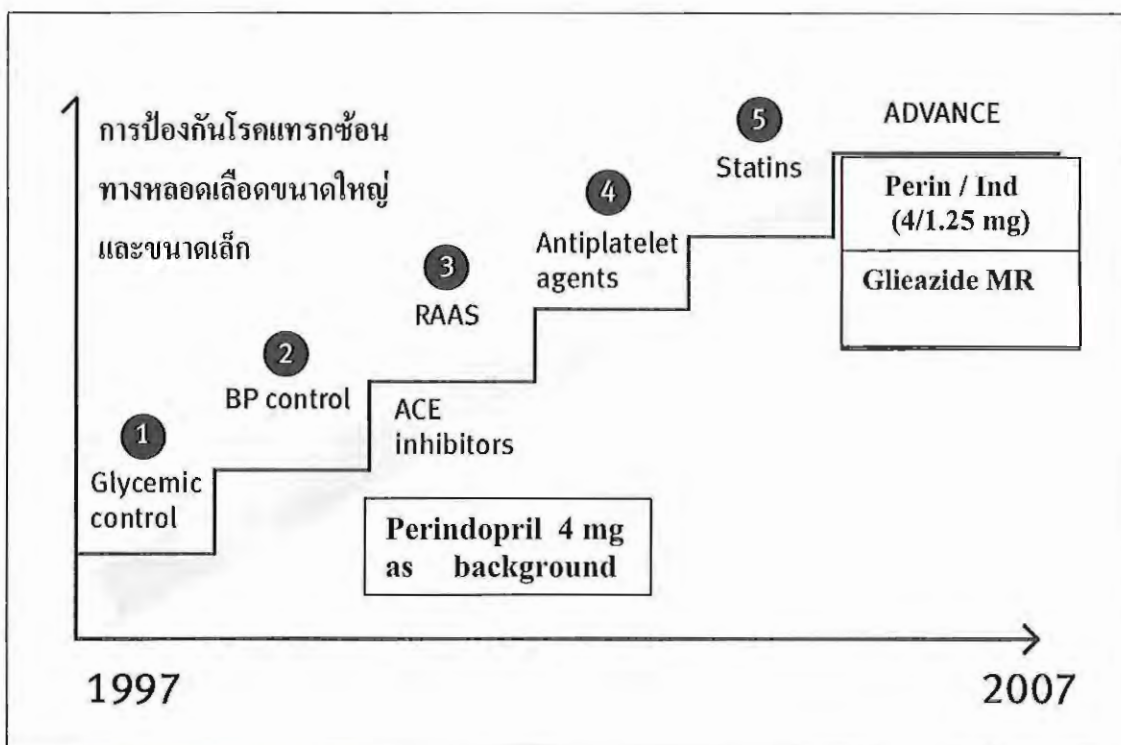
ในการศึกษา ที่เรียกว่า ADVANCE-Renal Disease³ (ดูรูปที่ 2) โดยสรุป ผลในด้านการลดความดันโลหิตของการศึกษา ADVANCE เพิ่งได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร Lancet เมื่อเร็ว ๆ นี้³ หลายๆด้านของการศึกษานี้มีความจำเพาะที่แตกต่างจากการศึกษาอื่น ๆ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3 ที่แสดงช่วงเวลาของหลักฐานการรักษาต่างๆ จนถึงการเริ่มต้นของการศึกษานี้ ข้อแรกคือ การศึกษานี้ น่าจะเป็นการศึกษาที่ใหญ่ที่สุดที่ทำการศึกษาเฉพาะในผู้ป่วยเบาหวานในที่นี่คือ เบาหวานชนิดที่สอง อันดับต่อมาคือจำนวนของประเทศที่ร่วมทำการศึกษา โดยมีศูนย์วิจัยร่วมที่มากกว่า 200 แห่งจากประเทศต่างๆที่มากกว่า 20 ประเทศ ที่สำคัญคือข้อมูลที่ได้แสดงถึงข้อมูลทั่วโลก โดยมีประชากรที่เข้าร่วมการศึกษาทั้งใน จีน อินเดีย ยุโรปกลางและยุโรปเหนือ รวมทั้งแคนาดา



รูปที่ 1 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการศึกษ UKPDS และ การศึกษ ADVANCE-Trial ที่มา UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group *Lancet* 1998; 352: 837-853². ADVANCE Collaborative Group (ADVANCE) *Lancet* 2007; 370: 829-840³.



รูปที่ 2 การชะลอ การเสื่อมของไตจากการศึกษา ADVANCE-Trial ที่มา de Galan BE et al. *Hypertension*. 2008; June 14-19, 2008 :Berlin, Germany⁵



รูปที่ 3. ลำดับของหลักฐานในการรักษาโรคเบาหวาน (1997-2007)

ที่มา Borer JS, *Eur Heart J Suppl* 2007;9 (Suppl E):E2-E9⁶. Bock G, Dalla Man C, Campioni M, et al. *Diabetes* 2006;55:3536-3549⁸. American Diabetes Association. Clinical Practice Recommendations. *Diabetes Care* 2008;31(Suppl 1):s12-s54¹⁰.

ผลในด้านลดความดันโลหิตในการศึกษา ADVANCE ได้นำเสนอใน European Society of Cardiology Congress ในเดือน กันยายน 2007 โดยทั่วไปยังมีข้อสงสัยว่าความดันโลหิตในผู้ป่วยเบาหวานควรลดลงต่ำมาให้ต่ำกว่าเกณฑ์ในการรักษาผู้ป่วยความดันโลหิตสูงทั่วไปหรือไม่ ระยะเวลาก่อนหน้านี้ยังไม่มีการศึกษาที่ตอบปัญหานี้ได้โดยตรง แต่ในการศึกษา ADVANCE มีผู้ป่วยจำนวนมากที่มีระดับความดันโลหิตปกติ ทั้งนี้ การศึกษาของยา Perindopril/Indapamide ก่อนหน้านี้มีผลคืออย่างเห็นได้ชัดในผู้ป่วยเบาหวานที่ไม่โครแอลบูมินในปัสสาวะ⁴

ผู้ป่วยจะได้รับการสุ่มเพื่อรับการรักษาหนึ่งในสองชนิดคือ กลุ่มที่ได้ยา perindopril ร่วมกับ indapamide หรือ ยาหลอก โดยที่ทั้งสองกลุ่มจะ

ได้รับการรักษาโดยวิธีที่ดีที่สุดอื่นๆเหมือนกัน ผลลัพธ์ของการรักษาหลักที่วัดคืออัตราการเกิดโดยรวมของโรคหลอดเลือดขนาดใหญ่และขนาดเล็กได้แก่ การเสียชีวิตจากโรคหัวใจและหลอดเลือด โรคหลอดเลือดสมองที่ไม่เสียชีวิต โรคกล้ามเนื้อหัวใจตายที่ไม่เสียชีวิต และที่สำคัญคือการดำเนินโรคของโรคตาและโรคไตจากการเป็นเบาหวาน ผู้ป่วยได้รับการติดตามโดยเฉลี่ย 4.3 ปี และมีจำนวนผู้ป่วยจำนวนมากยังอยู่ในการศึกษาที่ระยะเวลาดังกล่าว ผลสำคัญที่พบคือการลดลงของความดันขณะหัวใจบีบตัว (systolic blood pressure) ลดลงได้ 5.3 มม.ปรอท และมีภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดขนาดใหญ่และขนาดเล็กลดลง 9% ผลของการลดดังกล่าวมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.041$)

ผลลัพธ์ที่เห็นได้อย่างเด่นชัดที่สุดคือการลดลงของอัตราการเสียชีวิตโดยรวมลง 14% ($p=0.025$) กล่าวในทางสถิติได้ว่าผลลัพธ์ที่เห็นได้อย่างเด่นชัดที่สุดนี้เป็นผลจากการลดการดำเนินโรคของไตเป็นหลักโดยมีการลดอัตราเกิดใหม่ของไมโครแอลบูมินในปัสสาวะได้ถึง 21% ($p<0.001$)

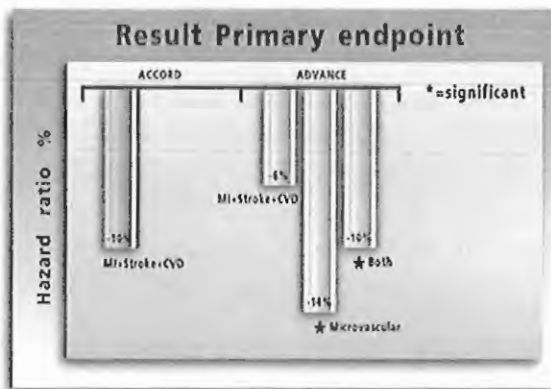
มีการศึกษามากขึ้นที่แสดงให้เห็นถึงผลของการลดการเกิดไมโครแอลบูมินในปัสสาวะหรือการลดการดำเนินโรคของไตว่าเป็นตัวบ่งชี้ที่ดีสำหรับการพยากรณ์โรค โดยถ้าสามารถหยุดการดำเนินโรคหรือทำให้ไมโครแอลบูมินในปัสสาวะลดลงผู้ป่วยจะมีการพยากรณ์โรคของหลอดเลือดขนาดใหญ่ดีขึ้น ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลาหลายปีจะสามารถคาดการณ์จากผลดังกล่าวได้ว่าการพยากรณ์โรคผู้ป่วยในกลุ่มนี้น่าจะดีขึ้นไปอีกถ้าติดตามไปอีก

ในระยะยาวขึ้น แม้ว่าจะมีผลที่ค่อนข้างประหลาดใจของการที่ไม่สามารถลดการเกิดโรคหลอดเลือดสมอง ผลดังกล่าวยากที่จะอธิบาย แต่อาจเป็นจากการที่เกือบครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยได้รับยากลุ่มสเตตินส์และการควบคุมเบาหวานโดยรวมอยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างดีแม้ว่าจะไม่ถึงกับเข้มงวดเกินไป โดยมีระดับ HbA1c ที่ 6.9%

ในแง่ของความดันโลหิตสูง มีผู้ป่วยจำนวนมากมีระดับความดันปกติและผลที่ได้ไม่ได้ขึ้นกับว่ามีระดับความดันต่ำกว่า 140 มม.

ปรอท ในตอนเริ่มทำการรักษาหรือไม่ ดังนั้นผลของการศึกษา ADVANCE จึงมีความหนักแน่นเมื่อมีการคำนึงถึงปัจจัยเสี่ยงร่วมกันหลายๆข้อ ผลการศึกษาสามารถใช้ได้ในวงกว้างในการรักษาผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่สองโดยการใช้ยาร่วมกันระหว่าง perindopril และ indapamide กลุ่มที่ได้รับการรักษาโดยได้ยาที่ร่วมกันสองชนิดนี้ในขนาดคงที่ พบว่าสามารถรับยาได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีอาการข้างเคียงที่มีนัยสำคัญ มีผู้ป่วยน้อย

รายมากที่มีอาการไอ ทั้ง indapamide และ perindopril มีประสิทธิภาพดีในแง่ระยะเวลาการออกฤทธิ์และอาการข้างเคียง ระยะเวลาหลัง 3 เดือนที่ขนาด 4 มก.ของ perindopril (ขนาดเริ่มต้น 2 มก.) และ 1.25 มก.ของ indapamide (ขนาดเริ่มต้น 0.625 มก.) ทั้งนี้ขนาดของยาสามารถเพิ่มได้อีกโดยผู้ป่วยสามารถรับยา perindopril ได้ในขนาดสูงสุดคือ 8 มก.



รูปที่ 4 เปรียบเทียบผลการลดระดับน้ำตาลอย่างเคร่งครัดจากการศึกษา ACCORD และ ADVANCE

ที่มา : The ADVANCE Collaborative group. N.Eng. J. Med. 2008;358:2560-72¹¹ The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group (ACCORD) N.Eng. J. Med. 2008; 358: 2545-2559¹²

โดยทั่วไป การศึกษาของยาด้าน ACE แสดงให้เห็นถึงผลลัพธ์ที่ดีอย่างต่อเนื่องดังที่แสดงโดย Borer⁶ ล่าสุดนี้ผลการศึกษาในแง่การลดความดันโลหิตของการศึกษา ADVANCE พบว่ามีผลดียิ่งขึ้น ขณะที่การศึกษาในแง่ผลการลดระดับน้ำตาลระหว่าง ACCORD /ADVANCE แตกต่างกัน ที่สำคัญคือการศึกษาในแง่ลดระดับน้ำตาลของการศึกษา ACCORD ต้องทำการหยุด

ลงก่อนกำหนดเนื่องจากพบอัตราการเสียชีวิตที่สูงกว่าในกลุ่มที่ได้รับการควบคุมน้ำตาลอย่างเข้มงวด ทั้งนี้ในการศึกษา ADVANCE ไม่พบข้อมูลดังกล่าว ผลดีของการลดน้ำตาลลงจากการศึกษา ADVANCE BG ก็ได้ยืนยันความแตกต่างอีกเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ความแตกต่างจากการลดระดับน้ำตาลในการศึกษา ACCORD trial ที่ใช้ยา กลุ่ม glitazone เป็นหลักที่

ไม่ได้เกิดผลดีต่อการลดการเสียชีวิต โดยเฉพาะที่มีสาเหตุจากโรคระบบหัวใจและหลอดเลือด^{11,12}

บทสรุป ที่น่าจะนำไปปรับปรุงในการนำไปใช้ในเวชปฏิบัติ

อาจจะกล่าวได้ใกล้เคียงว่า “การค่อยๆ ลดความดันโลหิตผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ด้วยยา Perindopril/Indapamide จะได้ประโยชน์อย่างแน่นอนในการลดการเสียชีวิต ซึ่งพบว่าลดได้ 14%, ลดการเสียชีวิตจากสาเหตุโรคระบบหัวใจ

และหลอดเลือด ได้ 18%, ลดการเกิดอุบัติเหตุการที่ เกิดจากหลอดเลือดรวมทั้งการที่ต้องเข้ารับการ รักษาต่อเกี่ยวกับโรคหัวใจและหลอดเลือด ได้ 9% และ 14% ตามลำดับ และที่สำคัญที่สุดสามารถ ลดการสูญเสียจากการพิการและเสื่อมของไตได้ สูงถึง 21% และผลอันนี้เป็นผลที่เกิดจากการใช้ยา Perindopril/ Indapamide ที่สำคัญผู้ป่วยทนต่อยา ดังกล่าวได้ดี และ แนนอนที่สุดเป็นปัจจัยหลักที่ นำไปสู่การรักษาผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ทุกราย

เอกสารอ้างอิง

1. Meinert CL, Knatterud GL, Prout TE, Klimt CR. A study of the effects of hypoglycemic agents on vascular complications in patients with adult-onset diabetes. Mortality results. *Diabetes* 1970; 19(Suppl 2): 789-830.
2. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352: 837-853.
3. Patel A; ADVANCE Collaborative Group, MacMahon S, *et al.* Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide on macrovascular and microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (the ADVANCE trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 370: 829-840.
4. Mogensen CE, Viberti G, Halimi S, *et al.* Effect of low-dose perindopril/indapamide on albuminuria in diabetes. Preterax in albuminuria regression: PREMIER. *Hypertension* 2003; 41: 1063-1071.
5. de Galan BE *et al.* Hypertension. 2008; June 14-19, 2008 : Berlin, Germany. Abstract PS 12/Mon/08
6. Borer JS. Angiotensin-converting enzyme inhibition: a landmark advance in treatment for cardiovascular diseases. *Eur Heart J Suppl* 2007; 9 (Suppl E): E2-E9.
7. International Diabetes Federation. Guideline for Management of Postmeal Glucose. (Available: http://www.incirculation.net/redirecturl.asp?ext=1&url=http://www.idf.org/webdata/docs/Guideline_PMG_final.pdf); [accesses 10 April 2008].
8. Bock G, Dalla Man C, Campioni M, *et al.* Pathogenesis of pre-diabetes: mechanisms of fasting and postprandial hyperglycemia in people with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance. *Diabetes* 2006; 55: 3536-3549.
9. Statement from the American Diabetes Association Related to ACCORD Trial Announcement. [http://www.incirculation.net/redirecturl.asp?ext=1&url=http://www.diabetes.org/\(Available:http://www.incirculation.net/redirecturl.asp?ext=1&url=http://www.diabetes.org/diabetesnewsarticle.jsp?storyID=16926553&filename=20080206/comtex20080206pr00000825adaaccordtrialsEDIT.xml](http://www.incirculation.net/redirecturl.asp?ext=1&url=http://www.diabetes.org/(Available:http://www.incirculation.net/redirecturl.asp?ext=1&url=http://www.diabetes.org/diabetesnewsarticle.jsp?storyID=16926553&filename=20080206/comtex20080206pr00000825adaaccordtrialsEDIT.xml); [accessed 10 April 2008].
10. American Diabetes Association. Clinical Practice Recommendations. *Diabetes Care* 2008; 31 (Suppl 1): s12-s54.
11. The ADVANCE Collaborative group. *N.Eng. J. Med.* 2008; 358: 2560-72.
12. The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group (ACCORD) *N Eng. J. Med.* 2008; 358: 2545-2559.

Thai Journal of Pharmacology

Instruction for Authors

The Thai Journal of Pharmacology serves as the official journal of the Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand. The journal is designed to contribute to the publication of researches and information exchanges in the field of pharmacology and related fields. The manuscripts should not have been published before. Original full length scientific research papers, short communication, case report, letter to editor, minireviews, pharmacological digest and new drugs profile will be included in this journal.

Manuscripts

Three copies of manuscripts, diskette(s) and illustration(s) are required. Manuscript of research articles should be written in English, the others can be either English or Thai. The preparation of the manuscript should be in the form of Microsoft Word (font: Times New Roman size 10). Pages should be numbered consecutively, including the title page.

Table and illustration should be numbered with Arabic figures consecutively in the order of first citation in the text and supply a brief title for each. Explain in footnotes all non-standard abbreviation that are used. Illustrations should be professionally drawn and photographed or produced on a laser printer. Nomenclature should follow the recommendations of the International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC), and the International Union for Biochemistry (IUB). All measurements must be in System International (SI) units.

Research articles

The research papers should contain a) title, b) abstract, c) keywords, d) introduction, e) material and methods, f) result, g) discussion, h) references.

The title page: Should contain the title of the article, author(s) name and affiliation (s) laboratory or institute of origin and address. Name and complete address of author responsible for correspondence about the manuscript should be also placed at the foot of the title page. **An abstract** limited to approximately 250 words should be carried in this page. It should be informative and state concisely what was done, results obtained and conclusion. Three to ten **keywords** or short phrases appropriate for subject indexing should be typed at the bottom of abstract.

Introduction: State clearly the purpose of article, the rationale for the study or observation. Relevant previous study should be cited and do not review the subject extensively.

Materials and Methods: Describe the sufficient detail of the method, experimental subjects (patients or experimental animals, including controls) clearly. Identify the method, apparatus (manufacturer's name and address in parenthesis). Give references to established method, study design and statistical method.

Results: Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. Only important observations should be summarized and emphasized. Do not repeat in the text all the data in the table or illustrations.

Discussion: Comment on the results and integrate them with the existing knowledge and point out the field. Recommendation may also be included.

Acknowledgment: Persons, financial or technical helps which have contributed to the paper should be acknowledged in a paragraph.

References: Place the number references consecutively in the order in which they are first mention in the text. Use the style of the examples below:

Examples

Articles in journals

- (1) Standard journal article (List all authors, but if the number exceeds three give three followed by et al)

You CH, Lee KY, Chen RY, et al. Electrogastrographic study of patients with unexplained nausea, blotting and vomiting. *Gastroenterology* 1980; 79:311-4.

- (2) Organisation as author

The Royal Marsden Hospital Bone-marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in post-hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977;2:742-4.

- (3) No author given

Coffee drinking and cancer of the pancreas (editorial). *BMJ* 1981;283-628.

- (4) Volume with supplement

Magni F, Borghi S, Berti F. BN-52021 protects guinea-pig from heart anaphylaxis. *Pharmacol Res Commun* 1988;20 suppl 5:75-8.

- (5) Books and other monographs

5.1 Personal author(s)

Colson JH, Armour WJ. *Sports injuries and their treatment*. 2nd rev ed. London: S Paul, 1986.

5.2 Editor(s), compiler as author

Diener HC, Wilkinson M, editors. *Drug-induced headache*. New York Springer-Verlag, 1988.

5.3 Chapter in a book

Jaffe JH, Martin WR. Opioid analgesics and antagonists. In: Gilman AG, Goodman LS, Gilman A, editors. *The Pharmacological basis of therapeutics*. 6th ed. New York: MacMillan Publishing, 1980:494-543.

5.4 Conference proceedings

Vivian VL, editor. Child abuse and neglect: a medical community response. *Proceeding of the first AMA National Conference on Child Abuse and Neglect*; 1984; Mar 30-31; Chicago. Chicago: American Medical Association, 1985.

- (6) Dissertation

Youseff NM. *School adjustment of children with congenital heart disease* (dissertation). Pittsburg (PA): Univ of Pittsburg, 1988.

(7) In press

Lillywhite HB, Donald JA. Pulmonary blood flow regulation in an aquatic snake. *Science*. In press.

(8) Website

Washington, DC: American Chemical Society. Available:
<http://oasy2.confex.com/acs/227nm/techprogram/P721792.HTM> [accessed 10 April 2008].

Reviews

All reviews are usually peer-reviewed. If the manuscript is written in Thai, English title and abstract are also required.

Short communication

Short communication should contain new and unpublished results in a short form. It should not exceed 2 print pages and may contain one table and one illustration.

Manuscript submission

All manuscripts are to be submitted to editor or associate editors, Thai Journal of Pharmacology, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Chulalongkorn Hospital, Rama IV Road, Bangkok 10330, Thailand. All paper are critically reviewed by the invited referees. Reviewers' comments are usually returned to the authors. The editorial board will decide upon the time of publication and retain the right to modify the style of contribution. However, major changes will be agreed with the authors. Authors will receive 25 reprints free.

Copyright

The Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand holds the copyright on all material appearing in the journal.

แบบฟอร์มลงทะเบียนการประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 31

สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย

วันที่ 18-20 มีนาคม 2552

ชื่อ – นามสกุล (นาย/นาง/นางสาว).....

ตำแหน่ง.....

- ☐ แพทย์ ☐ ทันตแพทย์ ☐ พยาบาล
☐ เกษตรกร ☐ นักวิจัย ☐ สัตวแพทย์
☐ นิสิต/นักศึกษา ☐ อาจารย์ สาขา.....
☐ อื่นๆ(ระบุ).....

ที่ทำงาน/สถาบัน.....

สถานที่ติดต่อได้สะดวก.....

โทร.....E-mail address:.....

โปรดทำเครื่องหมาย ✓ ในช่องที่ต้องการ (ค่าลงทะเบียนรวมค่าอาหารกลางวัน อาหารว่างและเอกสาร)

สมาชิก (1200 บาท)	นักศึกษา/ นักวิจัยรุ่นเยาว์* (600 บาท)	นักศึกษานำเสนอ ผลงาน (ชกเว้น)	บุคคลทั่วไป (1500 บาท)	(....) Workshop 1 หรือ (....) Workshop 2 (300 บาท)
หลังวันที่ 20 กุมภาพันธ์ 2552				
สมาชิก (1500 บาท)	นักศึกษา/ นักวิจัยรุ่นเยาว์* (800 บาท)	นักศึกษานำเสนอ ผลงาน (500 บาท)	บุคคลทั่วไป (1800 บาท)	(...) Workshop 1 หรือ (...) Workshop 2 (300 บาท)

*: อาจารย์และนักวิจัยจากสถาบันส่วนภูมิภาคที่จบการศึกษามาไม่เกิน 5 ปี

การชำระค่าลงทะเบียน

- ☐ โอนเงินเข้าบัญชี ออมทรัพย์ นางพัชรวิทย์ ปิ่นแห่งเพชร
เลขที่ 551-409747-6 ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน) สาขามหาวิทยาลัยขอนแก่น
***กรุณาส่ง Fax ใบสมัครและใบโอนเงินที่เบอร์ 043 348397

☐ เงินสด (เฉพาะหน่วยงานเท่านั้น)

(การลงทะเบียนจะสมบูรณ์เมื่อชำระเงินแล้ว และไม่สามารถขอเงินค่าลงทะเบียนคืน)

ท่านสามารถส่งใบลงทะเบียนได้ที่ e-mail: patc_pan@kku.ac.th

สมาคมเภสัชวิทยาฯ มีความยินดีที่จะมอบเสื้อยืด ให้แก่ท่านที่ลงทะเบียนร่วมประชุม จำนวน 1 ตัว

ขนาดของเสื้อที่ต้องการ ☐..เล็ก.....☐..กลาง.....☐..ใหญ่

ที่פקโปรดติดต่อกับโรงแรมโดยตรงตามหมายเลขโทรศัพท์นี้

โรงแรมโซฟิเทล...โทร 043 322155

โรงแรมเจริญธานี.....โทร 043 220400-14

โรงแรมโฆษะ.....โทร 043 320320

โรงแรมขอนแก่นโฮเต็ล....โทร 043 333222

คำแนะนำในการจัดทำบทความ Proceeding

1. บทความเป็นอังกฤษพิมพ์โดยใช้ Microsoft Word ใช้ type face เป็น Time New Roman ขนาด 12, line spacing 1.5, margin 2.54 cm ทั้งซ้าย ขวา และบน ล่าง
2. ชื่อบทความ ควรสั้นแต่ได้ใจความ ใช้อักษรใหญ่ Capital letter ในตัวนำหน้าทุกคำ ดังตัวอย่าง
Antidiabetic Effect of Ethanolic Extract of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) in Chronic Streptozotocin-induced Diabetic Rats
3. ชื่อผู้วิจัยเป็นภาษาอังกฤษ ใช้ตัวเต็ม ชื่อ และสกุล โดยไม่มีคำนำหน้าหรือต่อท้าย ให้ใส่ตัวเลขยกกำลังระบุถึงสถานที่ทำงาน และเครื่องหมาย* ระบุถึงผู้รับผิดชอบบทความ พร้อม e-mail ดังตัวอย่างต่อไปนี้

Eamruthai Wisetmuen¹, Patchareewan Pannangpetch^{1*}, Bunkerd Kongyingyoes¹, Upa Kukongviriyapan²

¹Department of Pharmacology and ²Department of Physiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand, 40002

E-mail: patc_pan@kku.ac.th (PP)

4. บทความประกอบด้วย บทคัดย่อ และตัวเนื้อความ (Text)
5. บทคัดย่อเป็นแบบ single paragraph จำนวนคำไม่เกิน 250 คำ และ Keywords จำนวน 3 คำ
6. ตัวเนื้อความ ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ได้แก่ Introduction; Materials and methods; Results; Conclusion; และ Acknowledgement (ถ้ามี) ตาราง และ รูปภาพ รวมกันไม่เกิน 3 ชิ้น และเอกสารอ้างอิง (Reference) ทั้งหมดไม่เกิน 8 รายการ
7. การอ้างอิงเอกสารอ้างอิงในเนื้อความใช้ระบบตัวเลข แสดงในวงเล็บ เช่น (1-3) เรียงจากก่อนไปหลัง และในรายการเอกสารอ้างอิงให้เรียงไปตามลำดับก่อนหลัง ใช้ระบบ Vancouver ดังตัวอย่างข้างล่าง

1. Offel M, Lattmann P, Singh H, Billington DC, Bunprakob Y, Sattayasai J, et al. Synthesis of substituted 3-anilino-5-phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepine-2-ones and their evaluation as cholecystokinin-ligands. Arch Pharm (Weinheim) 2006;339:163-173.
2. Wittayalertpanya S, Mahachai V. Caffeine clearance in patients with chronic viral hepatitis: before and after interferon therapy. J Med Assoc Thai 2001;84 Suppl 1:S189-S196.
8. จำนวนหน้าทั้งหมดต้องไม่เกิน 4 หน้าเอ 4

Tentative Schedule
the 31st Annual Meeting of the Pharmacological and Therapeutic Society of
Thailand
March 18-20, 2009

Faculty of Medicine, Khon Kaen University

Theme: From basic to new therapeutic approaches

Time	Wednesday 18 March 2009
8:00-8:45	Registration
8:45-9:00	Opening Ceremony
9:00-9:45	Chiravat Sadavongvivad Memorial Lecture ABC transporter: from drug resistance to drug response Prof. Edmund Jon Deoon Lee, Ph.D. Department of Pharmacology, National University of Singapore, Singapore
9:45-10:00	Refreshment
10:00-11:30	Session I: Targeted Drugs in Cancer Therapy Assoc. Prof. Chawalit Pairojkul, MD. Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University Assist Prof. Auemkhae Sookprasert MD. Department of Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University Dr. Auemduan Prawan, Ph.D. Modulator Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University
	Lunch
13:00-14:30	Session II: From Neuroendocrine Control in Obesity to current Therapy Assoc Prof. Pranithi Hongsprabhas, MD. Department of Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University Assoc Prof. Chuthamane Suthisisang, Ph.D. Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University Assoc Prof. Pachareewan Pannangpetch, Ph.D. Modulator Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University
14:30-14:45	Refreshment
14:45-16:15	Session III: Genetic Aspects of Immune-Mediated Adverse Drug Reactions Assoc. Prof. Kearkiat Praditpornsilpa, MD. Department of Medicine, Chulalongkorn University Assoc. Prof. Charnvit Leelayuwat, Ph.D. Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University Assoc. Prof. Suda Vannapasath, MD. Modulator Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University
16:15-17:00	General Assembly Meeting
19:00-21:00	Northeast Thai traditional Palang Dinner

Time	Thursday 19 March 2009
8.30-9.15	Invited Lecture : Adolescent depression: Adrenergic mechanisms and behavioral correlates Prof. David B. Bylund, Ph.D. Department of Pharmacology and Experimental Neuroscience, University of Nebraska Medical Center, USA
9.15-10.45	Session IV: From Biology of Stem Cells to Clinical Application Assoc. Prof. Pisamai Laupattarakasem, Ph.D. Modulator Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University
10.45-11.00	Refreshment
11.00-12.00	Session V: From Circadian Rhythms Impairment to Psychiatric Symptoms and Therapy Prof. Anan Srikiatkachorn, MD. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University Assoc. Prof. Jintana Sattayasai, Ph.D. Modulator Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University
12.00-13.00	Lunch Symposium Breakthrough in Neuropsychiatry: Focus of Agomelatine, the New Melatonergic Agonist Selective Serotonin Antagonist-MASSA. Prof. Ronnachai Kongsakorn, MD. Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University Assoc. Prof. Jintana Sattayasai, Ph.D. Modulator Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University
13.00-15.00	Poster presentation:
15.00-15.15	Refreshment
15.15-16.45	Session VI::Pharmacology of Emotional Disorders Major Gen. Dr. Borpit Klangkalya, Ph.D. Dr. Tawisilp Wissanu-yothin, MD. Bureau of Social Mental Health, Department of Mental Health. Assoc. Prof. Suwanna Arunpongpaisal, MD. Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University Assist. Prof. Danu Gaysornsiri, MD. Modulator Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University
16.45- 17.15	Young Investigator Awards Closing Ceremony

Time	Friday 20 March 2009
8.30-12.00	Work Shop group I: Lecture: Principle of pharmacogenomics Laboratory hand on: Pharmacogenomic of TPMT Assoc.Prof Suda Vannapasath MD. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University
8.30-12.00	Work Shop group 2 Lecture: Prof. David B. Bylund (30 min) Laboratory hand on : Integrative organ system pharmacology 1. Blood pressure & heart rate, antianxiety (elevated plus maze & dark and light box), antidepressant (forced swim model), antipsychotic (climbing) and Morris water maze (learning & memory) Assoc. Prof. Muckda Chitchareonthum, Ph.D. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University 2. The <i>in vitro</i> : rat diaphragm & chick biventer cervicis muscles Assist. Prof. Tarinee Arkaravichien, Ph.D. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University
12.00-13.00	Lunch & city tour
8:30-16:00	Post-Conference Tour: Infamous dinosaur museum & indigenous praiwa fabric at Kalasin



สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย

ใบสมัครเข้าเป็นสมาชิก

เขียนที่

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

นาย

ข้าพเจ้า นาง ชื่อสกุล.....

นางสาว

อาชีพ ขอสมัครเข้าเป็นสมาชิกสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย

และขอรับรองว่า จะปฏิบัติตามระเบียบข้อบังคับของสมาคมทุกประการ

ข้าพเจ้ายินดีจะชำระค่าบำรุงสมาคมโดย

- ☐ เป็นรายปี ปีละ 200 บาทถ้วน
- ☐ ครั้งเดียว 1,000 บาทถ้วนสำหรับสมาชิกตลอดชีพ

ลงชื่อ

()

เรียน

รศ.สมใจ นครชัย

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

ถนนศรีอยุธยา

กทม. 1040

ทะเบียนประวัติ

นาย

1. ชื่อ ชื่อสกุล

นางสาว

ชื่อภาษาอังกฤษ (ตัวพิมพ์ใหญ่).....

2. เกิดวันที่ เดือน พศ.....

3. ตำแหน่งหน้าที่หรือตำแหน่งทางวิชาการในปัจจุบัน

4. สถานที่ทำงาน

.....

.....

..... โทรศัพท์/ แฟกซ์

e-mail address

5. ที่อยู่ปัจจุบัน

.....

.....

6. ประวัติการศึกษาชั้นอุดมศึกษา (เรียงลำดับจากวุฒิสูงสุด)

ปี พ.ศ.

ชื่อสถานศึกษา

วุฒิที่ได้รับ

.....

.....

.....

7. สาขาหรือแขนงวิชาที่สนใจหรือเชี่ยวชาญเป็นพิเศษ

.....

.....

.....

.....

รายนามคณะกรรมการที่ปรึกษาและบริหารสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย

วาระประจำปี พ.ศ. 2551-2552

คณะกรรมการที่ปรึกษา

ภก.พลตรี สุรินทร์ โรจนวิภาต

ศ.ดร.อำนวย ถิฐาพันธ์

รศ. พลตรี ดร.ทัศนัย สุริยจันทร์

ดร.อุดม จันทราภิรักษ์ศรี

คณะกรรมการบริหาร

นายกสมาคม

รศ.ภญ.ดร.จินตนา สัตยาชัย

ผู้รั้งตำแหน่งนายกสมาคม

รศ.ภญ.ดร.มยุรี ดันตีสระ

อุปนายก

ผศ.นพ.ดร.วีรวัฒน์ มหัทธนตระกูล

เลขาธิการ

ผศ.ดร.พัชรวิทย์ ปั่นหนึ่งเพชร

ฝ่ายวิชาการ

รศ.ภก.ดร.วงศ์วิวัฒน์ ทัศนียกุล

เหรียญกษาปณ์

รศ.ภญ.ดร.บุญเกิด คงยิ่งยศ

ปฎิคม

ร้อยโท ชัยธนาภา วุฒิธรณฤทธิ์

นายทะเบียน

รศ.ภญ.สมใจ นครชัย

บรรณาธิการวารสาร

รศ.ภญ.ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์

กรรมการกลาง

ผศ.ดร.พยงค์ วณิกเกียรติ

พลตรี รศ.ดร.บพิตร กลางกัลยา

ผศ.ภก.ปณต ดั่งสุจริต

การประชุมวิชาการประจำปี

ครั้งที่ 31



ของสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย

The 31st Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting

วันที่ 18-20 มีนาคม 2552

ณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Theme: From Basic to New Therapeutic Approaches

หัวข้อการประชุม

- ปาฐกถา : ABC transporter : From drug resistance to drug response
- อภิปราย I : From tumor evasion to targeted drugs in cancer therapy
- อภิปราย II : From neuroendocrine and endocannabinoids in obesity to current therapy in obesity
- อภิปราย III : Genetic aspects of immune-mediated adverse drug reactions
- อภิปราย IV : From biology of stem cells to clinical applications
- อภิปราย V : From circadian rhythms impairment to psychiatric symptoms
- อภิปราย VI : รัก โลภ โกรธ หลง : Pharmacology of emotional disorders
- WorkShop I : Pharmacogenomics of TPMT : Principle and hand-on allele-specific detection by real-time PCR
- WorkShop II : Integrative organ system pharmacology
 - In vivo* : Learning memory & anxiety models
 - Cardiovascular models
 - In vitro* : Neumuscular junction models

ทัศนศึกษา :

พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาโนนสรวง
พิพิธภัณฑ์ ละครม ชื่อดังภาคอีสาน

สอบถามรายละเอียดได้ที่ :

รศ.ดร.พัชรวิทย์ ปันเพ่งเพียร E-mail: pasc_pan@kku.ac.th

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โทรศัพท์/โทรสาร 043-348397

Web สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย <http://www.phartherst.org>

Web ภาควิชาเภสัชวิทยา <http://pharmacol.md.kku.ac.th/>

บทความหรือ Proceeding จะตีพิมพ์ใน

Thai Journal of Pharmacology

กำหนดส่งตั้งแต่ วันที่ถึง 15 กุมภาพันธ์ 2552

ค่าลงทะเบียน

สมาชิก	นักศึกษา	นักศึกษานำเสนอผลงาน	บุคคลทั่วไป	Workshop**
1,200 บาท	600 บาท	ยกเว้น	1,500 บาท	300 บาท
หลังวันที่ 20 กุมภาพันธ์ 2552				
1,500 บาท	800 บาท	500 บาท	1,800 บาท	500 บาท



จัดโดย :

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย

* จำนวนจำกัด ลงทะเบียนก่อนได้ก่อน

** จำนวนจำกัด workshop ละ 30 คน ลงทะเบียนก่อนได้ก่อน

สอบถามเพิ่มเติม : โทร. 043-348397