# บทที่ 1

## บทนำ

เมื่อให้ยาเข้าสู่ร่างกาย ยาจะกระจายไปตามตัวกลางต่างๆ และเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตไปยังอวัยวะเป้าหมาย เป็นที่ยอมรับกันว่า ความเข้มข้นของยาในพลาสมาจะบอกระดับยาที่อวัยวะเป้าหมายได้ (Desgrez and Travers, 1965) การวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาจึงมีความสำคัญมากในการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยา เภสัชจลนศาสตร์ของยา ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการที่จะควบคุมระดับยาในผู้ป่วย, พัฒนาตำรับยา หรือการศึกษาการเอื้อประโยชน์สมมูลในร่างกาย (Bioequivalence) ระหว่างยาที่ผลิตในประเทศและยาที่ผลิตจากต่างประเทศ (Smith and Stewart, 1981)

ขั้นตอนที่สำคัญตอนหนึ่งในการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา คือการเตรียมตัวอย่างพลาสมาให้สะอาดมากพอที่จะทำการวิเคราะห์โดยปราศจากสิ่งรบกวนต่าง ๆ ที่มีผลต่อการตรวจวัดปริมาณยาที่ต้องการ ให้ผลการวิเคราะห์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ วิธีเตรียมตัวอย่างพลาสมาที่ดี ต้องแยกยาที่ต้องการออกจากสิ่งรบกวนต่าง ๆ ได้ดี ทำให้การวิเคราะห์หาปริมาณยา มีความรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ (Lim, 1988) ซึ่งมีด้วยกันหลายวิธี (Bye, 1977; Smith and Stewart, 1981; Lim, 1988; Mcdowall, 1989; Szepesi, 1990) โดยมีหลักการใหญ่ ๆ 2 หลักการคือ

1. <u>การใช้สารหรือตัวทำละลายที่เหมาะสมมาสกัดแยกตัวยาออกจากตัวอย่างพลาสมา วิธีที่ใช้หลักการนี้ได้แก่ Liquid-liquid phase extraction (LLE) และ Liquid-solid phase extraction (LSE)</u>

LLE เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมานาน ตัวทำละลายที่ใช้มีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวกับน้ำ (water immisible organic solvent), ยาสามารถละลายได้ดีมากเมื่อเทียบกับสารต่าง ๆ ที่อยู่ในพลาสมา และมีจุดเดือดไม่สูงมากเพื่อให้ระเหยได้ง่าย ปัญหาที่สำคัญสำหรับ LLE คือการเกิดอีมัลชั่น (emulsion) ระหว่างการสกัด เมื่อเกิดแล้วแก้ไขได้ยาก ตัวยาบางส่วนจะเข้าไปรวมอยู่ในอีมัลชั่น ทำให้เปอร์เซนต์การกลับคืนของยาต่ำ (Mcdowall, 1989) นอกจากนี้ยังต้องทำการสกัดหลายๆ ครั้ง ทำให้เสียเวลาต้องใช้ตัวทำละลายมาก สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และยังอาจเป็นพิษต่อผู้ใช้เพราะตัวทำละลายที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นพิษมีอันตรายต่อสุขภาพ บางอย่างติดไฟและระเบิดได้ง่าย จึงควรใช้ด้วยความระมัดระวัง

LSE วิธีนี้ใช้สารของแข็งหรือตัวดูดซับ (adsorbent) สกัดยาออกจากตัวอย่างพลาสมาโดยการผ่านตัวอย่างพลาสมาลงในคอลัมน์เล็ก ๆ ที่บรรจุตัวดูดซับ ยาจะถูกดูดซับไว้ที่ผิวหน้าของตัวดูดซับในขณะที่สารอื่นๆ จะผ่านออกมา จากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมดึงยาออกจากตัวดูดซับนั้น การสกัดด้วยวิธีนี้ให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ดี จึงมีการพัฒนาให้ง่ายและสะดวกต่อการใช้ โดยทำเป็นคอลัมน์สำเร็จรูปขนาดเล็ก ภายในบรรจุ solid supports ซึ่งเป็น bond phases silica เลียนแบบโครมาโทรกราฟิกคอลัมน์ เพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด แต่ยังคงมีการใช้งานน้อย เพราะคอลัมน์สำเร็จรูปนี้มีราคาแพง และข้อมูลสำหรับการใช้คอลัมน์นี้ยังมีไม่มาก

2. <u>การใช้สารแยกตะกอนพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา แล้ววิเคราะห์หาปริมาณตัวยาในตัวอย่างพลาสมานั้น</u>

พิจารณาองค์ประกอบต่างๆ ในพลาสมา ประกอบด้วยน้ำประมาณ 90% ส่วนที่เหลือ 10% ประกอบไปด้วยสารต่างๆ มากมายละลายอยู่ (Montgomery, Dryer, Conway and Spectro, 1977) สารที่มีปริมาณมากที่สุด คือ โปรตีน ซึ่งเป็นสารมหโมเลกุล (macromolecule) มีมากถึง 7% ของพลาสมา ดังนั้น ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา ถ้าสามารถแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาก็น่าจะเป็นการกำจัดสิ่งรบกวนต่อการวิเคราะห์ออกไปได้ โดยการเติมสารที่มีคุณสมบัติในการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างลงไปในตัวอย่างพลาสมา สารเหล่านี้จะทำให้พลาสมาโปรตีนแยกออกจากตัวอย่าง แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ซึ่งสามารถเอาสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์ด้วยวิธีที่เหมาะสมต่อไปได้ทันที

เปรียบเทียบหลักการทั้งสอง หลักการใช้สารแยกตะกอนพลาสมาโปรตีนค่อนข้างจะเป็นวิธีที่สะดวก ทำได้ง่าย ทั้งประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายมากกว่าหลักการสกัด ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยากแต่ให้ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ที่ดี สารแยกพลาสมาโปรตีนบางชนิด ยังสามารถแยกสารอื่น ๆ ในพลาสมาได้ ยิ่งทำให้ตัวอย่างพลาสมาสะอาดมากเพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาให้มีความถูกต้องยิ่งขึ้น

การใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีนเตรียมตัวอย่างพลาสมาให้สะอาดสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา สิ่งที่ควรคำนึงถึงคือ การจับของยากับพลาสมาโปรตีน เนื่องจากตามธรรมชาติยาจะอยู่ในสภาวะสมดุลกับพลาสมาโปรตีนในร่างกาย (Lada, et.al, 1971) ในระดับของการใช้ยาขนาดหนึ่ง อัตราการจับของยากับพลาสมาโปรตีนค่อนข้างคงที่ ยาแต่ละชนิดมีความสามารถ

(capacity) ในการจับกับพลาสมาโปรตีนแตกต่างกัน แบ่งได้เป็น 3 ระดับ คือ (Grahame, 1987)

1. จับอย่างหลวม (Weakly bound) จับกับพลาสมาโปรตีน น้อยกว่า 50 เปอร์เซนต์
2. จับปานกลาง (Moderately bound) จับกับพลาสมาโปรตีนได้ 50-80 เปอร์เซนต์
3. จับอย่างเหนียวแน่น (Highly bound) จับกับพลาสมาโปรตีนได้ 80-100 เปอร์เซนต์

Bye และ Brewn(1977); Smith และ Stewart (1981) กล่าวถึงการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์หาปริมาณยาว่า ยาบางส่วนอาจตกตะกอนร่วมไปกับโปรตีน ส่วน Lim (1988) รายงานว่ายาที่จับกับพลาสมาโปรตีนอย่างเหนียวแน่น ตัวยาอาจถูกดูดซับ (adsorb) อยู่บนผิวของโปรตีนเมื่อโปรตีนถูกแยกตะกอนออกมา Mcdowall (1989) กล่าวถึงปัญหาสำคัญสำหรับการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเช่นกันโดยยาจะเข้าไปรวมกับโปรตีน (occlude) ที่ถูกแยกตะกอนออกมา ทำให้การวิเคราะห์หาปริมาณยาไม่ถูกต้องแม่นยำเท่าที่ควร

Burke และ Thenot (1985) กล่าวถึงการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์กลุ่มยากันโรคลมบ้าหมู (Antiepileptic Drugs) ว่าค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาที่มีการจับกับพลาสมาโปรตีนอย่างเหนียวแน่นจะมีค่าต่ำเนื่องจากการตกตะกอนร่วมไปกับโปรตีน รายงานอื่น ๆ เช่น การควบคุมระดับยาปฏิชีวนะในเลือด (Rouan,1985), การวิเคราะห์คลอแรมเฟนนิเคิลในพลาสมา (Kim and Lee, 1987), การวิเคราะห์หาปริมาณไพรมาควิน (primaquine) ในพลาสมา (Parkhurst, 1984), การวิเคราะห์หาปริมาณเมโททรีเซตในพลาสมา (Lankelm and Poppe, 1978; Chen and Chiou,

1981; Lawson, 1981), การวิเคราะห์หาปริมาณแอนทราควิโนน ไกลโคไซด์ในพลาสมา (Eksberg and Ehrsson, 1985) และการวิเคราะห์หาปริมาณยาเซฟเมนอกไซม (cefmenoxime) ในพลาสมา (Granneman and Sennello, 1982) ก็ได้กล่าวถึงการตกตะกอนของยาร่วมไปกับพลาสมาโปรตีนเช่นกัน ซึ่งยาเหล่านี้เป็นยาที่จับกับพลาสมาโปรตีนอย่างเหนียวแน่น แต่ไม่มีการกล่าวรายละเอียดผลการทดลองหรือรายงานเพิ่มเติมแต่อย่างไร

อย่างไรก็ดี จากการศึกษาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโดยอาศัยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา ที่ปรากฏในวารสารต่าง ๆ พบว่ายังมีความคลุมเครือในด้านการรายงานผลการวิเคราะห์ซึ่งไม่แสดงการ validate วิธีวิเคราะห์ที่ใช้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะกับยากลุ่มที่จับกับพลาสมาโปรตีนอย่างเหนียวแน่น เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ ในพลาสมา (Albani, Riva and Baruzzi, 1982; Lo and Riegelman, 1980) ไม่แสดงค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยา, ข้อมูลรายงานความเที่ยงตรงของวิธีแสดงแต่ค่าเฉลี่ยแต่ละอัน เช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิวบิวตาโซน (Leon, et. al., 1980), วาฟาริน (Ueiand, et.al., 1985), อิมิพรามีนและเดซิพรามีน (Kobayashi, et.al.,1984), ฟีนายโตอิน (Solidin and Hill, 1976; Slonek, Peng and Chiou, 1978; Szabo and Brown, 1982; Haroon and Keith, 1983), อินโดโปรเฟน (Laking, et.al., 1978), ไดโครฟีแนก (Youry,et.al., 1988), ไตรเมโทรฟริม (Vree, et.al.,978), เซโฟซิทีน (Torchia and Danzinger, 1980), คีโตโปรเฟน (Ballerini, 1979) ไอบูโปรเฟน (Hoffman, 1977) ฟีโนโปรเฟน (Katogi, Onmuri and Adachi, 1983) อินโดเมธาซีน (Brown, Kandrotas, Douglas and Gal, 1988) บาโคลเฟน (Rustum 1989)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บางรายงานไม่สามารถแสดงความเจาะจงของวิธี เช่น การวิเคราะห์โดย HPLC ของควินิดีนในพลาสมามีเพียงโครมาโทแกรมของยาในสารละลายมาตรฐาน (Reese and Peikert,1980) บางรายงานไม่แสดงโครมาโทแกรมเลย เช่น การวิเคราะห์ควินิดีนในพลาสมาด้วย HPLC (Hartel and Harjanne, 1969) หรือ การวิเคราะห์ไอบูโปรเฟนในพลาสมาด้วย GLC (Hoffman,1977)

จากการศึกษาข้อมูลต่าง ๆ ข้างต้น จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาถึงผลของการจับของยากับพลาสมาโปรตีนต่อการวิเคราะห์หาปริมาณยาโดยวิธีการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา โดยกำหนดข้อสมมติฐานสำหรับการศึกษาไว้ดังนี้

"การใช้วิธีการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาในการวิเคราะห์หาปริมาณยาขึ้นกับความสามารถในการจับของยากับพลาสมาโปรตีน"

การศึกษานี้จะทำการทดสอบสมมติฐานโดย วิเคราะห์หาปริมาณยาที่เติมไปในพลาสมาของคนโดยเทคนิควิธีทาง HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา เพราะสะดวกและรวดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับวิธีอื่น ๆ เช่น GC หรือ Immunoassay และเครื่องมือทาง HPLC มีพร้อมในห้องทดลอง

ยาที่นำมาเป็นต้นแบบในการศึกษา จะแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ตามค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีน(Drug-protein binding) (Windholz,Budavaru, Blumetti and Otterbein, 1983; Moffat, Jackson, Mass and Widdop, 1986) ซึ่งยาเหล่านี้จะเป็นยาที่หาได้ไม่ยาก และอาจมีรายงานการวิเคราะห์ยาเหล่านี้ในพลาสมาตามวารสารต่าง ๆ หรือไม่ก็ได้ ถ้ามีการรายงานจะเลือกยาที่มีการรายงานการวิเคราะห์อย่างคลุมเครือไม่ชัดเจน ยาที่ได้ถูกคัดเลือกสำหรับการศึกษา ได้แก่ พาราเซตามอล, ฟีนายโตอิน, ไนโตรฟิวแรนโตอิน,

โพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์, มีโทรนิดาโซล, และไนเฟดิพีน ถ้าตัวยาที่คัดเลือกไม่สามารถตอบคำถามได้อาจเพิ่มตัวยาตามความจำเป็น (ในการศึกษาครั้งนี้ ได้เพิ่มยาไกลเบนคลาไมด์ เพื่อสามารถอธิบายผลที่เกิดขึ้นกับยาไนเฟดิพีน รายละเอียดอยู่ในบทที่ 3 ขั้นตอนที่ 4) ยาที่ถูกคัดเลือกแบ่งตามค่าการจับของยาและพลาสมาโปรตีน ได้ดังนี้

1. พาราเซตามอล และมีโทรนิดาโซล มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนโดยประมาณเท่ากับ 25 และ 20 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ จึงจัดอยู่ในกลุ่ม weakly bound

2. ไนโตรฟิวแรนโตอิน มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนโดยประมาณเท่ากับ 60 เปอร์เซนต์ จึงจัดอยู่ในกลุ่ม moderately bound

3. ฟีนายโตอิน, โพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ และ ไนเฟดิพีน มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนโดยประมาณเท่ากับ 90, 90 และ 94-99 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ จึงจัดอยู่ในกลุ่ม highly bound (สำหรับไกลเบนคลาไมด์ ซึ่งทำการศึกษาเพิ่มเติม มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนประมาณ 99 เปอรเซนต์ จึงจัดอยู่ในกลุ่มนี้ เช่นกัน)

ในทุกตัวยาที่ทำการศึกษา จะใช้สารมาตรฐานของแต่ละตัวยาซึ่งได้ผ่านการตรวจสอบทางกายภาพและพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย UV สเปกตรัมและ IR สเปกตรัม จนแน่ใจว่าเป็นยาที่ต้องการ และไม่มีสารอื่นลอดแทรกปนมา

การศึกษาทดลอง จะทำการวิเคราะห์หาปริมาณยาที่เติมในพลาสมาของคน โดยการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน เนื่องจากสารที่มีคุณสมบัติในการแยกพลาสมาโปรตีน มีหลายประเภท แบ่งตามกลุ่มสาร ได้แก่ (Henry, 1964; Peker and Van Slyke, 1932; Mcdowall, 1989)

1. กรด เช่น กรดเปอร์คลอริค, กรดทังสติก, กรดเมตาฟอสฟอริก และกรดไตรคลอโรอะซิติค จะจับกับไอออนบวกของโปรตีน เกิดเกลือที่ไม่ละลายในน้ำ แยกตัวออกจากตัวอย่างพลาสมา

2. เกลืออินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต, โซเดียมคลอไรด์ และโซเดียมคาร์บอเนต ทำให้โปรตีนเกิด salting out แยกออกจากตัวอย่างพลาสมา

3. ไอออนของโลหะ เช่น สังกะสี ($Zn^{++}$), ทองแดง ($Cu^{++}$) และเหล็ก ($Fe^{++}$) จะจับกับไอออนลบ ของโปรตีนเกิดเกลือที่ไม่ละลายในน้ำแยกออกจากตัวอย่างพลาสมา

4. ตัวทำละลายอินทรีย์ ที่สามารถรวมกับน้ำได้ เช่น อะซิโตน, แอซีโตรไนไตรล์, เมทานอล และเอทานอล ทำให้เกิดการละลายของโปรตีนในพลาสมาลดลง โปรตีนจึงตกตะกอนออกจากตัวอย่างพลาสมา

ดังนั้นการศึกษานี้ จึงทำการทดลองเปรียบเทียบลักษณะการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาเมื่อเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนชนิดต่างๆ เพื่อเลือกสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสมกับวิธี Reverse-phase HPLC และทำให้ทราบประสิทธิภาพของสารแยกพลาสมาโปรตีนชนิดต่าง ๆ ด้วย

<u>วัตถุประสงค์ในการศึกษา</u>

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการจับของยากับพลาสมาโปรตีนต่อการวิเคราะห์ปริมาณยาในพลาสมา โดยวิธีการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา
2. เพื่อศึกษาผลและประสิทธิภาพของสารแยกพลาสมาโปรตีนประเภทต่างๆ ในการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากพลาสมา
3. ศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา โดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างการจับของยากับพลาสมาโปรตีน และการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่าง
2. ทราบแนวทางความเป็นไปได้ในการที่จะใช้หลักการของการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างในการวิเคราะห์ยากลุ่มอื่น ๆ ต่อไป
3. จากข้อมูลที่ได้ สามารถนำไปประยุกต์ให้เกิดความรู้ความเข้าใจในการนำไปใช้เป็นรากฐานในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ยาในพลาสมาเพื่อให้เหมาะสมแก่การใช้งานในประเทศไทย โดยเฉพาะการศึกษาการเอื้อประโยชน์สมมูลในร่างกาย (Bioequivalence) ของยาที่ผลิตในประเทศเทียบกับยาที่ผลิตจากต่างประเทศ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย