บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. <u>สารเคมี</u>

สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ตลอดการศึกษามีดังนี้

1.1 ตัวยาที่ใช้ในการศึกษา

1.1.1 อิมมิพรามีน ไฮโดรคลอไรด์ (Imipramine Hydrochloride) Lot.No. 79H0847 ความบริสุทธิ์ 99.90%ของ Sigma, St. Louis, USA

1.1.2 เดซิพรามีน ไฮโดรคลอไรด์ (Desipramine Hydrochloride) Lot.No. 70K1039 ความบริสุทธิ์ 99.90% ของ Sigma, St. Louis,USA

1.1.3 อมิทริปทีลีน ไฮโดรคลอไรด์ (Amitriptyline Hydrochloride) Lot.No. 99H1441 ความบริสุทธิ์ 99.90% ของ Sigma, St. Louis,USA

1.1.4 นอร์ทริปทีลีน ไฮโดรคลอไรด์ (Nortriptyline Hydrochloride) Lot.No. 30K1251 ความบริสุทธิ์ 99.90% ของ Sigma, St. Louis,USA

1.1.5 โคลมิพรามีน ไฮโดรคลอไรด์ (Clomipramine Hydrochloride) Lot.No129H1012 ความบริสุทธิ์ 99.90% ของ Sigma, St. Louis,USA

1.2 สารเคมีและรีเอเจนต์อื่นๆ

1.2.1 แอซิโตไนไตรส์ เกรด HPLC (Acetonitrile, HPLC grade; E.Merck, Damstadt, Germany)

1.2.2 โปตัสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต เกรด AR (Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4, AR grade; E.Merck, Damstadt, Germany)

1.2.3 ไดโปตัสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต เกรด AR (Dipotassium hydogen phosphate, K_2HPO_4, AR grade; E.Merck, Damstadt, Germany)

1.2.4 กรดฟอสฟอริค เกรด AR (Orthophosphoric acid, H_3PO_4, AR grade; E.Merck, Damstadt, Germany)

2. <u>พลาสมาของคน</u>

ตลอดการศึกษาทดลองใช้พลาสมาของคน (pooled plasma) ที่ผ่านการตรวจสอบแล้ว ได้รับการอนุเคราะห์จากสภากาชาดไทย และเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -48°ซ จนกว่าจะถูกนำออกมาใช้

3. <u>เครื่องมือและอุปกรณ์</u>

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่

3.1 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตรกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ของ TSP ประกอบด้วย Gradient pump Model P4000, autosampler Model AS3000, UV detector Model UV2000, Fl detector Model FL3000, Degaser, System software PC1000 และ integrator Data Jet ส่วน EC detector Model CC-5 และ LC-4C เป็นของ Bioanalytical System (BAS), USA

3.2 อัลตราไวโอเลตสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Ultraviolet Spectrophotometer; Miton Roy, Model spectronic 3000 array, Florida, USA)

3.3 สเปคโตรฟลูออโรมิเตอร์ (Spectrofluorometer, Jasco, Japan) Model FP-777 และ plotter Model PLT-396S

3.4 โพราโลกราฟีย์ (Poralography) ประกอบด้วย 693 VA processor และ 694 VA stand ของ Metrohm, Swizerland

3.5 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) Model EBA 12 ของ Hettich, Germany

3.6 เครื่องระเหยแห้งระบบสูญญากาศ (vacuum concentrator) Hito ประกอบด้วย Cooling system Model CT10 และ Rotary chamber Model HS-1-110-LYO

3.7 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Consort pH meter electrochemical multimeter, P307, Germany)

3.8 เครื่องผสมวอร์เทกซ์ (Vortex mixer) ของ Vortex-Genie, Scientific, Germany

3.9 คอลัมน์ HPLC

3.9.1 LiChrospher$^{(R)}$ 60 RP-select B, C 18 (Merck, Germany) ขนาด 125x5 mm., i.d., 5 μm

3.9.2 การ์ดคอลัมน์ (Guard column) ขนาด 50x2.0 mm., i.d. บรรจุด้วย C18 / Corasil(R) 37-50 µm (Water Associates Pty, Ltd., Massachusetts, USA)

3.10 ไมโครปิเปต (Micropipette) Socorex(R) ,USA

4. <u>การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการศึกษา</u>

4.1 บัฟเฟอร์ฟอสเฟต ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์
ละลายโปตัสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต จำนวน 7.480 กรัม และ ไดโปตัสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต จำนวน 2.620 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มล

4.2 ไดโปตัสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต 1 กรัม/มล
ละลายไดโปตัสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 10 มล

วิธีการทดลอง

วิธีการศึกษาทดลอง แบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอนดังนี้

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> การศึกษาทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของ HPLC สำหรับอิมิพรามีน, เดซิพรามีน. อมิทริปทีลีน และ นอร์ทริปทีลีน

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> การศึกษาเลือกใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสม

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> การศึกษาพัฒนาเทคนิคการเพิ่มความไวในการวิเคราะห์

<u>ขั้นตอนที่ 4</u> การยืนยันความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์(Validation)ของ อิมิพรามีน, เดซิพรามีน, อมิทริปทีลีน และ นอร์ทริปทีลีน

<u>ขั้นตอนที่ 5</u> การนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาจริงจากอาสาสมัคร

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของ HPLCสำหรับ อิมิพรามีน, เดซิพรามีน,อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน

ในการศึกษาทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของ HPLCของอิมิพรามีน, เดซิพรามีน, อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน ในเบื้องต้นจะใช้เพียงอิมิพรามีนเพียงตัวเดียวเป็นตัวแทนในการศึกษาก่อน โดยใช้สภาวะที่ได้จากรายงานที่มีมาแล้วนำมาดัดแปลงให้เหมาะสม โดยจะใช้คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของตัวยามาเป็นตัวกำหนด

การศึกษาทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของ HPLC จะประกอบด้วย การคัดเลือกคอลัมน์, การคัดเลือกสารมาตรฐานภายใน, การคัดเลือกดีเทคเตอร์ที่เหมาะสม และ การกำหนดส่วนประกอบของโมบายเฟส

1.1 <u>การคัดเลือกคอลัมน์</u>

ตัวยาอิมิพรามีน, เดซิพรามีน, อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีนที่ทำการศึกษาจัดเป็นยากลุ่มด่าง (basic drugs) ซึ่งละลายในน้ำได้ดีและละลายตัวทำละลายอินทรีย์บางตัวได้ เช่น แอซีโตไนไตรล์ จึงได้เลือกใช้เทคนิค reversed-phase HPLC โดยคอลัมน์ที่อยู่ในข่ายของการใช้วิเคราะห์ได้ ได้แก่ คอลัมน์ LiChrospher$^{(R)}$ 60 RP-select B ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่พัฒนามาเพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ยาในกลุ่มด่างโดยเฉพาะ

1.2 <u>การคัดเลือกสารมาตรฐานภายใน</u> (Internal Standard : IS)

เกณฑ์การเลือก IS คือ ควรมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับยาที่จะทำการวิเคราะห์ เพื่อให้ได้เวลาที่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ (retention time) ใกล้เคียงกัน, ต้องมีคุณสมบัติการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่นที่จะเลือกใช้, มีคุณสมบัติอื่นๆ ที่ใกล้เคียงกับยาที่ศึกษา และที่สำคัญยาหรือ สาร ที่จะเลือกใช้นั้นต้องไม่เป็นสารที่มีอยู่แล้วในร่างกาย หรือเป็นยาที่อาจใช้ร่วมในการรักษาผู้ป่วยที่ใช้ยาต้านอาการซึมเศร้ากลุ่มไตรไซคลิกนี้ โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือก โคลมิพรามีน เป็น IS

1.3 <u>การคัดเลือกดีเทคเตอร์</u>

จากสูตรโครงสร้างของตัวยาทั้งสี่แสดงถึงกลุ่มฟังก์ชั่นที่น่าจะดูดกลืนแสงอัตราไวโลเลต หรือการเรืองแสง หรือแสดงสมบัติทางเคมีไฟฟ้าได้ จึงทดลองศึกษาคุณสมบัติทั้งสามดังนี้

1.3.1 การศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลต

เตรียมสารละลายมาตรฐานของอิมิพรามีน, เดซิพรามีน, อมิทริปทีลีน, นอร์ทริปททีลีน และโคลมิพรามีน ให้มีความเข้มข้น 20 มคก/มล ในเมธานอล สแกน การดูดกลืนแสงของสารละลายของตัวยาในช่วงความยาวคลื่น 220-400 นาโนเมตร ด้วยความเร็วของการสแกน 50 นาโนเมตร/นาที

1.3.2 การศึกษาคุณสมบัติการเรืองแสง

เตรียมสารละลายมาตรฐานของอิมิพรามีน, เดซิพรามีน, อมิทริปทีลีน, นอร์ทริปทีลีน และโคลมิพรามีน ให้มีความเข้มข้น 20 มคก/มล ในเมธานอล ทำการสแกนเพื่อหาค่า Emission และ Excitation ของยาแต่ละตัว ด้วยเครื่องสเปคโตรฟลูออโรมิเตอร์ โดยสแกนวัดในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200-600 นาโนเมตร

1.3.3 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้า

เป็นการศึกษาหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมที่ทำให้ยานั้นๆ เกิดปฏิกิริยาแตกตัวให้กระแสจำกัดแปรตามความเข้มข้นของสาร ถ้ายาตัวใดมีคุณสมบัติดังกล่าวจะทำให้สามารถใช้ ดีเทคเตอร์อิเล็กโทรเคมิคอล (อีซี) ได้ โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานของ อิมิพรามีน, เดซิพรามีน, อมิทริปทีลีน, นอร์ทริปทีลีน และโคลมิพรามีน ให้มีความเข้มข้น 500 มคก/มล ในแอซีโตไนไตรล์ และวัดหาค่าศักย์ครึ่งคลื่น (half-potential) และค่าศักย์ที่ทำให้เกิดกระแสจำกัดของยาแต่ละตัวจากเครื่องโพราโลกราฟีย์ ซึ่งมีขั้วไฟฟ้าอ้างอิง (reference electrode) คือขั้วไฟฟ้าซิลเวอร์-ซิลเวอร์ คลอไรด์ และมีขั้วไฟฟ้าใช้งาน (working electrode) คือกลาสสี คาร์บอน และใช้บัฟเฟอร์ฟอสเฟตเป็นอิเล็กโทรไลต์เกื้อหนุน

1.4 <u>การกำหนดส่วนประกอบที่เหมาะสมของโมบายเฟส</u>

ส่วนประกอบของโมบายเฟสขึ้นกับคุณสมบัติของ HPLC คอลัมน์และคุณสมบัติของตัวยาเอง โดยโมบายเฟสเริ่มต้นที่จะใช้ในการศึกษาจะประกอบด้วย แอซีโตไนไตรล์ และบัฟเฟอร์อะซีเตด ความเข้มข้น 0.25 นอร์มอล pH 5.5 ในสัดส่วน 50:50

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาเลือกใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสม

สารตกตะกอนโปรตีนที่เลือกมาใช้ในการศึกษานี้จะใช้สารที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์คือ เมธานอล และ แอซีโตไนไตรล์ (กนกวรรณ, 2536) โดยเตรียมตัวอย่างพลาสมาตามแผนภาพที่ 1

เกณฑ์ในการคัดเลือกสารตกตะกอนโปรตีนที่เหมาะสม คือ

1.1 เมื่อเติมสารตกตะกอนโปรตีนไปแล้ว ควรทำให้พลาสมาโปรตีนแยกออก จากส่วนอื่นๆ ของพลาสมาได้รวดเร็ว

1.2 ควรทำให้ได้ตะกอนของพลาสมาโปรตีนที่เป็นตะกอนอัดตัวกันแน่น และแยกออกจากสารละลายได้ง่าย

1.3 สารละลายที่ได้หลังจากแยกตะกอนพลาสมาโปรตีนออกไปแล้ว ควรมีความใสและสะอาดเพียงพอที่จะไปวิเคราะห์ต่อด้วย HPLC ได้

1.4 ตัวอย่างที่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC ต้องได้ %การคืนกลับของยา (%Absolute recovery) และสารมาตรฐานภายในไม่ต่ำกว่า 60% (Causon, 1997)

วิธีทดลอง ทำการเตรียมแบลงค์พลาสมา, แบลงค์พลาสมาที่เติมอิมิพรามีน, เดซิพรามีน, อมิทริปทีลีน, นอร์ทริปทีลีน และ IS ซึ่งต่อไปจะเรียกว่าตัวอย่างพลาสมามาตรฐาน และน้ำที่เติมอิมิพรามีน,เดซิพรามีน, อมิทริปทีลีน, นอร์ทริปทีลีน และ IS โดยทุกตัวมีความเข้มข้น 1 มคก/มล พลาสมา เตรียมทั้งหมด 3 ตัวอย่าง (n=3) ทำการเตรียมตัวอย่างตามแผนภาพที่ 1 สังเกตลักษณะตะกอนและสารละลายที่ได้ โดยสารละลายที่ได้ต้องมีความใส เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยง ไม่มีตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด จึงนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ได้ คำนวณ %การคืนกลับของยา (%Absolute recovery) ตามสมการที่ 1ดังนี้

$$\%\text{การคืนกลับ} = \frac{\text{พื้นที่ภายใต้พีคของสารที่วิเคราะห์ได้ในพลาสมา}}{\text{พื้นที่ภายใต้พีคของสารที่วิเคราะห์ได้ในน้ำ}} \times 100 \qquad (1)$$

แผนภาพที่ 1

ผสมพลาสมา 500 มคล กับสารละลายมาตรฐานของยาตัวละ 10 มคล
และ IS 10 มคล ในหลอดทดลอง
↓
วอร์เทคนาน 10 วินาที
↓
เติมแอซีโตไนไตรล์ หรือ เมธานอล จำนวน 2.0 มล.
↓
วอร์เทคนาน 1 นาที
ปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 1400xg
15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
↓
แยกสารละลายใสส่วนบนฉีดเข้า HPLC จำนวน 20 มคล

ขั้นตอนที่ 3 การศึกษาพัฒนาเทคนิคการเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ อิมิพรามีน, เดซิพรามีน, อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน

การศึกษานี้ได้ศึกษาการเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ใน 2 ลักษณะ กล่าวคือ

- การทำให้สารตัวอย่างภายหลังการตกตะกอนมีความเข้มข้นมากขึ้น
- การเลือกใช้ HPLC detector ที่มีความไวสูงขึ้น ทั้งนี้จะขึ้นกับคุณสมบัติของสารที่วิเคราะห์

3.1 การแยกส่วนของสารแยกพลาสมาโปรตีนออกจากส่วนผสมอื่นในตัวอย่างโดยใช้ความแตกต่างของจุดเยือกแข็ง

ทำการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอซีโตไนไตรล์ ตามวิธีในแผนภาพที่ 1 สารละลายใสที่แยกได้จากการแยกพลาสมาโปรตีนจะเป็นส่วนผสมของ แอซีโตไนไตรล์ และน้ำจากพลาสมา ดังนั้นถ้าสามารถแยกทั้งสองส่วนออกจากกันได้ และวิเคราะห์ส่วนที่มีตัวยาอยู่ย่อมทำให้สารละลายที่ได้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เนื่องจากน้ำ กับแอซีโตไนไตรล์ มีค่าจุดเยือกแข็งที่แตกต่างกัน คือ น้ำมีค่าจุดเยือกแข็งเท่ากับ 0°ซ ส่วนแอซีโตไนไตรล์มีค่าจุดเยือกแข็งเท่ากับ -45°ซ ซึ่งแตกต่างกันมาก ดังนั้นถ้านำสารละลายที่ประกอบด้วยน้ำและแอซีโตไนไตรล์ไปแช่ในช่องแข็งที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของน้ำจะทำให้เกิดแยกชั้น โดย ชั้นแอซีโตไนไตรล์ยังเป็นของเหลวอยู่ ทำให้สามารถแยกชั้นออกมาได้ โดยเกรียงศักดิ์ และคณะ (2541) ได้ตรวจสอบแล้วว่ายาอยู่ในชั้นแอซีโตไนไตรล์

แผนภาพที่ 2

จากแผนภาพที่ 1

↓

แยกสารละลายส่วนใส

↓ แช่แข็งที่อุณหภูมิ -18°ซ, 20 นาที

แยกสารละลายส่วนใสซึ่งเป็นชั้นแอซีโตไนไตรล์ (ชั้นบน)

ฉีดเข้าสภาวะ HPLC จำนวน 20 มคล

3.2 การแยกส่วนของสารแยกพลาสมาโปรตีนออกจากส่วนผสมอื่นในตัวอย่าง โดยใช้ความแตกต่างของจุดเยือกแข็ง และการระเหยแห้งชั้นแอซีโตไนไตรล์ด้วยระบบสูญญากาศ

การแยกเฉพาะชั้นแอซีโตไนไตรล์ อาจทำให้สารละลายตัวอย่างเข้มข้นไม่พอ ดังนั้นการศึกษานี้จึงทำการระเหยแห้งส่วนของแอซีโตไนไตรล์ แล้วใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายตัวยาต่อไป

แผนภาพที่ 3

จากแผนภาพที่ 2

↓

สารละลายส่วนใสชั้นแอซีโตไนไตรล์ (ชั้นบน)

ระเหยแห้งด้วยระบบสูญญากาศ นาน 80 นาที

↓

ละลายกลับด้วยสารละลาย

80% แอซีโตไนไตรล์ในน้ำ จำนวน 200 มคล.

↓ วอร์เทคนาน 2 นาที

ฉีดเข้า HPLC จำนวน 20 มคล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การเพิ่มความเข้มข้นของสารวิเคราะห์ด้วยการใช้ส่วนผสมของสารละลายอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์

โดยปกติการเติมสารประกอบอนินทรีย์ ซึ่งละลายได้ดีมากในน้ำจะสามารถแย่งที่น้ำในสารละลายเกิด salting out จึงได้นำวิธีนี้มาใช้ในการเตรียมตัวอย่างด้วยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายอินทรีย์ คือ แอซีโตไนไตรล์ แล้วเติม ไดโปตัสเซียมฟอสเฟต ร่วมลงไป (Phensri Thongnopnua, and et al,1989)

แบบแผนที่ 4

ผสมพลาสมา 500 มคล กับสารละลายมาตรฐานของยาแต่ละตัว 10 มคล
และสารละลายมาตรฐานภายใน 10 มคล ในหลอดทดลอง

↓ วอร์เทคนาน 10 วินาที

เติมแอซีโตไนไตรล์ 350 มคล

↓ วอร์เทคนาน 1 นาที

เติมสารละลายของ ไดโปตัสเซียมฟอสเฟต (1กรัม/มล) 300 มคล

↓ วอร์เทคนาน 1 นาที
ปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 3500xg
15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

แยกสารละลายใสส่วนบน (ชั้นแอซีโตไนไตรล์) ฉีดเข้า HPLC 20 มคล

3.4 การเพิ่มความไวของการวิเคราะห์ด้วยการเลือกใช้ดีเทคเตอร์

ปกติดีเทคเตอร์ของ HPLC ที่มักใช้กันคือดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเลต (UV) ซึ่งมีความไวน้อยกว่า ดีเทคเตอร์ฟลูออเรสเซ็นต์ (FL) และดีเทคเตอร์อีซี (EC) ดังนั้นถ้าสารมีคุณสมบัติการเรืองแสง หรือคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าด้วย จะสามารถเพิ่มความไวของการวิเคราะห์ได้ จากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีที่ได้และสูตรโครงสร้างของ อิมมิพรามีน, เดซิพรามีน, อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน น่าจะมีคุณสมบัติของการเรืองแสง และคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าได้

<u>วิธีการทดลอง</u>

วิเคราะห์แบลงค์พลาสมา และตัวอย่างพลาสมามาตรฐานที่มีอิมิพรามีน,เดซิพรามีน และ IS ที่ความเข้มข้น 1 มคก/มล โดยใช้ดีเทคเตอร์คือ อัลตราไวโอเลต, ฟลูออเรสเซ็นต์ และอีซี เพื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ โดยใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเลต เป็นตัวเทียบ โดยโครมาโตแกรมที่ได้ควร ต้องได้รูปร่างพีคที่ดี มีสัญญาณรบกวนต่ำด้วย

ขั้นตอนที่ 4 การยืนยันการใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Validation) ของยาอิมิพรามีน, เดซิพรามีน, อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีนในพลาสมา

ตามข้อกำหนดของ Bioanalytical Method Validation (Drug imformation branch, 2001; Hartmann และคณะ, 1998; Causon, 1997; Dadgar และคณะ, 1995; Shah และคณะ, 1992) การยืนยันวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีหัวข้อต่างๆ ดังนี้

- ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของยากับสารมาตรฐานภายในและความเข้มข้นของยา (Linearity)
- ความไวของวิธีวิเคราะห์ (Sensitivity)
- การศึกษาประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่าง
- ความถูกต้องและความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy and precision)
- ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)
- ความคงตัว (Stability) ของตัวอย่างพลาสมา และสารละลายมาตรฐาน

โดยในการยืนยันความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ จะแยกการวิเคราะห์ระหว่างอิมิพรามีนกับเดซิพรามีน และอมิทริปทีลีนกับนอร์ทริปทีลีน

ในการยืนยันความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของอิมิพรามีน, เดซิพรามีน ,อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน จะใช้ความเข้มข้นที่ครอบคลุมในช่วงสูง, กลาง และต่ำ สำหรับดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเลต คือ 80,160,240 และ 480 นนก/มล และสำหรับดีเทคเตอร์อีซี คือ 20,80,160 และ 480 นนก/มล ตลอดการศึกษา

1. <u>การศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตรส่วนพื้นที่ใต้พีคของตัวยากับความเข้มข้นของยาในพลาสมา</u>

การศึกษานี้เป็นการหาช่วงความเข้มข้นของตัวยาที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของยากับสารมาตรฐานภายใน (PAR)

วิธีการทดลอง

วิเคราะห์แบลงค์พลาสมา ตัวอย่างพลาสมามาตรฐาน ตามความเข้มข้นในตารางที่ 3 โดยทำการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาและตัวอย่างพลาสมามาตรฐาน ตามการเตรียมตัวอย่างในแผนภาพที่ 4 สร้างเส้นกราฟเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ และใช้ linear regression ในการสร้างสมการเส้นตรง จากนั้นทำการยืนยันความสัมพันธ์ที่ได้ โดยวิเคราะห์แบลงค์พลาสมา ตัวอย่างพลาสมามาตรฐาน รวมเป็น 3ชุด โดยร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความชันของสมการ ต้องไม่เกินร้อยละ 15

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของยาและสารมาตรฐานภายใน ที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

ยา	ดีเทคเตอร์	ความเข้มข้นของยาในพลาสมา (นนก/มล)	ความเข้มข้นสารมาตรฐานภายใน (นนก/มล)
อิมิพรามีน, เดซิพรามีน	UV	0,40,80,160,240,480,720,900	400
อมิทริปทีลีน, นอร์ทริปทีลีน	UV	0,40,80,160,240,480,720,900	400
อิมิพรามีน, เดซิพรามีน	EC	0,4,20,80,160,480,900	80

2. ความไวของวิธีวิเคราะห์

ความไวของวิธีวิเคราะห์ แสดงในเทอมของค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถวิเคราะห์ได้ โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้จะต้องมีความถูกต้อง ซึ่งแสดงในรูปร้อยละของการเบี่ยงเบน (%Bias) ต้องไม่เกิน ± 20% และความเที่ยงตรงซึ่งแสดงในรูปของ %RSD ต้องไม่เกิน 20%

วิธีการทดลอง

วิเคราะห์แบลงค์พลาสมา และตัวอย่างพลาสมามาตรฐานความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด จากนั้นนำค่าความเข้มข้นที่คำนวณได้ไปหาค่า %Bias ตามสมการ (2)ดังนี้

$$\%Bias = \frac{[(\text{analyzed conc.} - \text{added conc.})]}{\text{added conc.}} \times 100 \quad (2)$$

โดย analyzed conc. คือ ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้

added conc. คือ ความเข้มข้นที่เติม

และหาค่า%RSD ของความเข้มข้นที่คำนวณได้จากตัวอย่างพลาสมา

3. <u>การศึกษาประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่าง</u>

การบอกประสิทธิภาพของวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยการแยกพลาสมาโปรตีน จะแสดงในรูปของ %การคืนกลับ โดยค่าที่ได้จะต้องไม่ต่ำกว่า 60% จึงถือว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ใช้นั้นใช้ได้

$$\%\text{การคืนกลับ} = \frac{\text{พื้นที่พีคของยาในตัวอย่างพลาสมา}}{\text{พื้นที่พีคของยาในสารละลายมาตรฐาน}} \times 100 \quad (3)$$

<u>วิธีการทดลอง</u>

เตรียมสารละลายมาตรฐาน และเตรียมตัวอย่างพลาสมามาตรฐาน 3 ความเข้มข้น สูง, กลาง และต่ำ โดยเตรียมความเข้มข้นละ 6 ตัวอย่าง (n=6) นำตัวอย่างพลาสมาที่เตรียมไปผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างตามแผนภาพที่ 4 คำนวณหาค่า% การคืนกลับ ตามสมการข้างต้น

4 <u>ความถูกต้อง และความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์</u>

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ แสดงด้วยค่า %Bias ตามสมการที่ 2 และความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ประกอบด้วยความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (Intra-day precision) และความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน (Inter-day precision) ซึ่งแสดงผลในรูปของ %RSD

4.1 ความถูกต้องและความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน

วิธีการทดลอง

วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมามาตรฐานที่เติมยาจำนวน 4 ความเข้มข้น คือ 80,160,240 และ 480 นนก/มล (สำหรับ UV) และ 20,80,160 และ 480 นนก/มล (สำหรับ EC) โดยเตรียมความเข้มข้นละ 6 ตัวอย่าง (n=6) นำค่าPAR ที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นเทียบจากเส้นกราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve) คำนวณค่า %Bias ซึ่ง ต้องไม่เกิน ±15% จึงถือว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง และค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ต้องมีค่า%RSD ไม่เกิน 15%จึงถือว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยงตรง

4.2 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน

วิธีการทดลอง

วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมามาตรฐานที่เติมยา จำนวน 4 ความเข้มข้น เหมือนในข้อ 4.1 โดยเตรียมตัวอย่างความเข้มข้นละ 6 ตัวอย่าง (n=6) ทำการวิเคราะห์ต่างวันกัน 4 วัน ควบคู่กับการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน โดยค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ต้องมีค่า%RSD ไม่เกิน 15%

5. ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์พิจารณาจาก เวลาที่ถูกหน่วงเหนียวในคอลัมน์ของตัวยา เมื่ออยู่ในตัวทำละลายและเมื่ออยู่ในพลาสมา หลังจากผ่านกระบวนการต่างๆ ตลอดจนเปรียบเทียบโครมาโทรแกรมของแบลงค์พลาสมาและตัวอย่างพลาสมามาตรฐาน และตัวอย่างพลาสมาของอาสาสมัครที่รับประทานยาอิมิพรามีน หรืออมิทริปทีลีน เพื่อพิจารณาถึงการรบกวนของสารอื่นๆ และ/หรือ endogenous substance ต่างๆ ที่อาจมีผลต่อวิธีการวิเคราะห์ได้

วิธีการทดลอง

วิเคราะห์แบลงค์พลาสมา, สารละลายมาตรฐาน และตัวอย่างพลาสมามาตรฐานที่เติมยาที่ความเข้มข้น 900 นนก./มล. เปรียบเทียบเวลาที่ถูกหน่วงเหนียวในคอลัมน์ ของแบลงค์พลาสมา,

สารละลายมาตรฐาน และตัวอย่างพลาสมามาตรฐาน และพิจารณาว่ามีการรบกวนของสาร และ/หรือ endogenous หรือไม่

6. ความคงตัว

การศึกษาความคงตัวประกอบด้วย

- ความคงตัวของตัวอย่างพลาสมาที่สภาวะต่างๆ
- ความคงตัวของตัวอย่างใน autosampler
- ความคงตัวของสารละลายมาตรฐาน

ซึ่งเป็นการศึกษาเพื่อกำหนดระยะเวลาในการเก็บรักษาตัวอย่างพลาสมา และสารมาตรฐาน ในการศึกษาความคงตัวจะดูผลจากค่า %ความแตกต่างของความเข้มข้นของยา (%difference) ที่จุดเวลาต่างๆ เทียบกับที่จุดเวลาเริ่มต้น โดย

$$\%\text{difference} = \frac{(Ct - Co)}{Co} \times 100 \qquad (4)$$

โดยค่า Ct คือ ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ที่จุดเวลาต่างๆ

Co คือ ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ที่เวลาศูนย์ (เริ่มต้น)

ความเข้มข้นที่จะใช้ในการศึกษาความคงตัวของตัวอย่างพลาสมามาตรฐานทุกหัวข้อคือ 80 และ 480 นนก/มล

ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างพลาสมาในสภาวะต่างๆ พิจารณาจากค่า %difference คือ ถ้าค่า %difference ไม่เกิน ±10% ถือว่ายาแต่ละตัวในพลาสมา หรือสารละลายมาตรฐานยังคงมีความคงตัวที่ดีอยู่

6.1 ความคงตัวของตัวอย่างพลาสมามาตรฐานที่อุณหภูมิห้อง

เป็นการศึกษาความคงตัวของยาในพลาสมา ณ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ในช่วงเวลาของการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

วิธีการทดลอง

วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมามาตรฐาน โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง (n = 3) ที่อุณหภูมิห้อง และทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของยาที่เวลา 0, 3, 6, 9 และ 12 ชั่วโมง หรือจนพบความไม่คงตัวก่อนเวลา 12 ชั่วโมง ในการวิเคราะห์ต้องสร้างกราฟเทียบมาตรฐานควบคู่ไปด้วย นำความเข้มข้นของยาที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณหาค่า %difference ของยาตามวิธีข้างต้น

6.2 <u>ความคงตัวของตัวอย่างพลาสมามาตรฐานเมื่อผ่านรอบการแช่แข็งและละลาย</u>

<u>วิธีการทดลอง</u>

วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมามาตรฐาน โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง (n = 3) โดยวิเคราะห์ก่อนนำเข้าแช่แข็ง ทุก12 ชั่วโมงให้นำตัวอย่างพลาสมาออกมาละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ทำเช่นนี้จนครบ 3รอบ แล้วจึงทำการวิเคราะห์หลังจากผ่านรอบที่ 3 แล้ว คำนวณความเข้มข้นเทียบกับเส้นกราฟเทียบมาตรฐาน แล้วนำไปหา %difference ตามสมการข้างต้น

6.3 <u>ความคงตัวของตัวอย่างพลาสมาที่สภาวะการเก็บรักษา</u> (-48°ซ)

เป็นการหาช่วงเวลาที่ยาในพลาสมามีความคงตัวที่สภาวะการเก็บรักษาตัวอย่างพลาสมาที่อุณหภูมิ -48°ซ

<u>วิธีการทดลอง</u>

เตรียมตัวอย่างพลาสมามาตรฐาน ตัวอย่างความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง (n = 3) นำตัวอย่างพลาสมาไปเก็บไว้ที่สภาวะการเก็บรักษาคือ ที่อุณหภูมิ -48°ซ แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของยาในวันที่ 15 และ 30 ของการเก็บรักษา โดยในแต่ละวันให้สร้างกราฟเทียบมาตรฐานควบคู่กันไปด้วย และนำความเข้มข้นที่หาได้มาเทียบกับความเข้มข้นตัวอย่างในวันเริ่มต้น ในรูป %differecne ตามสมการข้างต้น

6.4 <u>ความคงตัวของตัวอย่างเมื่ออยู่ใน autosampler</u>

<u>วิธีการทดลอง</u>

วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมามาตรฐานที่เติมยาชุดที่ 1 คือ อิมิพรามีนและเดซิพรามีน ชุดที่ 2 คือ อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน ที่ความเข้มข้น 80 ,160 และ 480 นนก/มล พลาสมา นำตัวอย่างพลาสมาที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างตามแผนภาพที่ 4 ใส่ไว้ใน autosampler ที่อุณหภูมิ 4°ซ ทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของยาที่จุดเวลาต่างๆ เทียบกับเส้นกราฟเทียบมาตรฐาน คือที่เวลา 0 (จุดเริ่มต้นใส่ใน autosampler), 6, 12, 18, และ 24 ชั่วโมง และหาค่า %difference ของยาที่จุดเวลาต่างๆ เทียบกับที่จุดเริ่มต้น

6.2 <u>ความคงตัวของสารละลายมาตรฐานของยาแต่ละตัว และสามาตรฐานภายใน</u>

<u>วิธีการทดลอง</u>

เตรียมสารละลายมาตรฐานสต็อก (stock standard solution) ของยาแต่ละตัวให้มีความเข้มข้น 450 มคก/มล ในแอซีโตไนไตรล์ ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์หาพื้นที่พีคของยาแต่ละตัวในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 (4 สัปดาห์) และคำนวณ %difference เทียบกับพื้นที่พีคของยาในวันเริ่มต้น (วันที่ 0) โดย

$$\%\text{difference} = \frac{(Pt - Po)}{Po} \times 100 \qquad (5)$$

โดย Pt คือ พื้นที่ใต้พีคของยาที่วันใดๆ

Po คือ พื้นที่ใต้พีคของยาที่วันที่ศูนย์ (เริ่มต้น)

%difference ที่ได้ต้องไม่เกิน ±10%

ขั้นตอนที่ 5 การประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นในการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาจากอาสาสมัครที่รับประทานยา

การนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา จากอาสาสมัครเป็นการยืนยันที่แน่นอนว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมา สามารถใช้ได้จริงกับตัวอย่างพลาสมาจากอาสาสมัครที่รับประทานยา อิมมิพรามีน, เดซิพรามีน, อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน

วิธีการทดลอง

อาสาสมัครเป็นชายไทย อายุ 18-25 ปี ผ่านการตรวจสุขภาพเบื้องต้นแล้วว่าเป็นผู้ที่แข็งแรงไม่มีความผิดปกติของตับ, ไต และอื่นๆ และไม่ได้รับประทานยาต้านอาการซึมเศร้ากลุ่มไตรไซคลิกอยู่

ก่อนวันทำการศึกษาอาสาสมัครต้องไม่รับประทานยาใดๆ และต้องอดอาหารก่อนรับประทานยาเป็นเวลาอย่างน้อย 8-10 ชั่วโมง และอดต่อไปอีก 3 ชั่วโมงหลังรับประทานยาแล้ว

ในวันทำการศึกษา จะแบ่งอาสาสมัครออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 2 คนอาสาสมัครกลุ่มที่ 1 รับประทานยาอมิทริปทีลีน (ยาTryptanol$^{(R)}$) 50 มก ส่วนอีกกลุ่มรับประทานยาอิมิพรามีน (ยา Sermonil$^{(R)}$) 50 มก การรับประทานยาเป็นแบบขนาดเดียวครั้งเดียว (single-dosed) โดยอาสาสมัครต้องได้รับการเจาะเลือดที่หลอดเลือดดำที่แขน 1 ครั้งก่อนการรับประทานยา จากนั้นทำการเก็บตัวอย่าง เลือดจำนวน 12 ครั้งภายในเวลา 12-13 ชั่วโมง และปริมาณตัวอย่างเลือดที่เก็บในแต่ละครั้งคือ 3 มล. ตัวอย่างเลือดที่ได้ต้องทำการปั่นเหวี่ยงทันที และแยกพลาสมาเพื่อเก็บในช่องแข็ง จากนั้นทำการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาที่ได้ภายใน 1 สัปดาห์ โดยหาความเข้มข้นของยา อิมิพรามีนและ เดซิพรามีน จากตัวอย่างของอาสาสมัครที่รับประทานยาอิมิพรามีน และหาความเข้มข้นของยาอมิทริปทีลีนและนอร์ทริปทีลีน จากอาสาสมัครที่รับประทานยาอมิทริปทีลีน โดยเทียบจากเส้นกราฟเทียบมาตรฐาน สร้างเส้นกราฟแสดงความเข้มข้นของยาในร่างกายที่เวลาต่างๆ เพื่อหาค่าความเข้มข้นสูงสุดของยาในพลาสมา (Cpmax) และเวลาที่ระดับยาในพลาสมาสูงที่สุด (tmax) และคำนวณค่า AUC จากพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มข้นของยาในพลาสมากับเวลา เปรียบเทียบผลที่ได้กับการศึกษาอื่นๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย