บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. สารเคมี

สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ตลอดการศึกษามีดังนี้

1.1 ตัวยาที่ใช้ในการศึกษา

1.1.1 คลอกซาซิลิน โซเดียม (Cloxacillin sodium) Lot.No 916651 ประเทศจีน

1.1.2 ไดโคลฟีแนค (Diclofenac) Lot.No.DFSHO54 ประเทศจีน

1.1.3 ไดคลอกซาซิลิน โซเดียม (Dicloxacillin sodium) Lot.No.219002 ประเทศอิตาลี

1.1.4 ฟูโรซีไมด์ (Furosemide) Lot.No.897657 ประเทศจีน

1.1.5 ไกลเบนคลาไมด์ (Glibenclamide) Lot. No.IR 156/33 ประเทศจีน

1.1.6 ไอบูโปรเฟน (Ibuprofen) Lot.No.991 ประเทศอิตาลี

1.1.7 อินโดเมทาซิน (Indomethacin) Lot.No. 881005 ประเทศจีน

1.1.8 คีโตโปรเฟน (Ketoprofen) Lot.No. MK00875-54 ประเทศฝรั่งเศส

1.1.9 กรดมีเฟนนามิค (Mefenamic acid) Lot.No. SN 23674 ประเทศเยอรมัน

1.1.10 นาโปรเซน (Naproxen)Lot.No.FE 30677 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

1.1.11 ฟีนิลบิวนาโซน (Phenylbutazone)Lot.No. PB 83521 ประเทศอินเดีย

1.1.12 ไพรอกซิแคม (Piroxicam) Lot.No. PF83452 ประเทศเยอรมัน

1.2 สารเคมีอื่น ๆ

1.2.1 เมทานอล เกรด HPLC (Methanol, HPLC grade; J.T.Baker Chemical, New Jersey, USA)

1.2.2 เมทานอล เกรด AR (Methanol,AR grade; E.Merck, Damstadt, Germany)

1.2.3 แอซีโตไนไตรล์ เกรด HPLC (Acetonitrile, HPLC grade;J.T.Baker Chemical, New Jersey, USA)

1.2.4 แอซีโตไนไตรล์ เกรด AR (Acetonitrile, AR grade; E. Merck, Damstadt, Germany)

1.2.5 กรดอะซีติคล้วน เกรด AR(Glacial acetic acid, AR grade; E.merck, Damstadt, Germany)

1.2.6 โซเดียมอะซีเตท เกรด AR(Sodium acetate, AR grade; E. Merck, Damstadt, Germany)

1.2.7 แอมโมเนียม อะซีเตท เกรด AR (Ammonium acetate, AR grade; E. Merck, Damstadt, Germany)

1.2.8 โปแตสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต เกรด AR (Potasium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4, AR grade; E.Merck,Damstadt, Germany)

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

1.2.10 ซิงค์ซัลเฟต เกรด AR (Zinc sulfate, AR grade; E.Merck, Damstadt, Germany)

2. <u>พลาสมาของคน</u>

ตลอดการศึกษาทดลองวิเคราะห์ตัวยาทั้ง 12 ตัว ใช้พลาสมาของคน (pooled plasma) ที่ได้รับการอนุเคราะห์จากสภากาชาดไทยและเก็บรักษาในช่องแช่แข็งของตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ -4^{O}ซ จนกว่าจะถูกนำออกมาใช้

3. <u>เครื่องมือ</u>

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่

3.1 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

3.1.1 HPLC; Millipore Waters Chromatography Division,Milford,Massachusetts,USA ประกอบด้วย

3.1.1.1 Model 680 automated gradient controller

3.1.1.2 Model 6000A solvent dilivery system

3.1.1.3 Model 510 solvent delivery system

3.1.1.4 Waters 740 data module

3.1.1.5 Waters 484 tunable absorbance detector

3.1.2 HPLC; Milton Roy LDC Division, Florida, USA ประกอบด้วย

3.1.2.1 Model CM 4000 multiple solvent delivery system

3.1.2.2 Model SM 4000 programmable wavelength detector

3.1.2.3 Model CI-4000 computing integrator

3.2 อินเจคเตอร์ (Injector; Rheodyne 7100 injection port, Rheodyne, California, USA)

3.3 อัลตร้าไวโอเลตสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (Ultraviolet Spectrophotometer; Shimadzu, model UV-180 double beam, Shimadzu, Japan)

3.4 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Gallenkamp Junior Centrifuge, Gallenkamp, England)

3.5 เครื่องชั่งสำหรับการวิเคราะห์ (Precisa 300 A, PAG Oerikon AG, Switzerland)

3.6 เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Buchi melting point apparatus, Nach Dr. Tottoli, Buchi, Switzerland)

3.7 เครื่องวัด pH (Consort pH meter, P307, Germany)

3.8 เครื่องผสมวอร์เทกซ์ (Vortex mixer; Vortex-Genie, Scientific Industries Inc., New York, USA)

3.9 โครมาโทกราฟิคคอลัมน์ (Chromatographic column)

3.9.1 μBondapak C18 column (Waters(R), Waters Associated Pty, Ltd., Massachusetts, USA) เป็นคอลัมน์แบบเหล็กกล้าไร้สนิม ขนาดความยาว 30 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3.9 มม. บรรจุด้วย μBondapak C18 ขนาดอนุภาค 10 ไมครอน

3.9.2 Bondclone10 C18 column (Phenomenex(R), California, USA) เป็นคอลัมน์ แบบเหล็กกล้าไร้สนิม ขนาดความยาว 30 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3.9 มม. บรรจุด้วย Bondclone 10 C18 ขนาดอนุภาค 10 ไมครอน

3.10 การ์ดคอลัมน์ (Guard column) เป็นคอลัมน์แบบเหล็กกล้าไร้สนิม ขนาดความยาว 5 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.0 มม. บรรจุด้วย C18 / Corasil(R) (Waters Associates Pty, Ltd., Massachusetts, USA) ขนาดอนุภาค 37-50 ไมครอน

3.11 ไมโครปิเปต ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร (Micropipet; Pipetman(R), Gilson, UK)

3.12 ไมโครปิเปต ขนาด 10-20 ไมโครลิตร (Micropipet; Pipetman(R), Gilson, UK)

3.13 แลบบอราทอรี ไซริงค์ (Laboratory syringe) ขนาด 1000 ไมโครลิตร (Hamilton(R), Germany)

3.14 แลบบอราทอรี ไซริงค์ (Laboratory syringe) ขนาด 100 ไมโครลิตร (Unimetric(R), Shorewood, Illinois, USA)

3.15 หลอดทดลองฝาเกลียว (Screw-capped glass tube) ขนาดความจุ 15 ซีซี (Pyrex(R), USA)

4. <u>การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการศึกษา</u>

4.1 อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.20 ความเข้มข้น $1x10^{-1}$ โมลาร์ ชั่งโซเดียมอะซีเตท จำนวน 8.20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 980 มล. นำไปปรับ pH ให้ได้ 4.20 ด้วยกรดอะซีติกล้วน แล้วจึงนำไปปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่นในฟลาสค์ปรับปริมาตร

4.2 อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.30 ความเข้มข้น $2x10^{-2}$ โมลาร์ ชั่งโซเดียมอะซีเตท จำนวน 1.64 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 980 มล. นำไปปรับ pH ให้ได้ 5.30 ด้วยกรดอะซีติกล้วน แล้วจึงนำไปปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่นในฟลาสค์ปรับปริมาตร

4.3 อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.60 ความเข้มข้น $2x10^{-2}$ โมลาร์ ชั่งโซเดียมอะซีเตท จำนวน 1.64 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 980 มล. นำไปปรับ pH ให้ได้ 5.60 ด้วยกรดอะซีติกล้วน แล้วจึงนำไปปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่นในฟลาสค์ปรับปริมาตร

4.4 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 3.50 ความเข้มข้น $1x10^{-1}$ โมลาร์

ชั่งโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 13.61 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 980 มล. นำไปปรับ pH ให้ได้ 3.50 ด้วยกรดฟอสฟอริคเข้มข้น แล้วจึงนำไปปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่นในฟลาสค์ปรับปริมาตร

4.5 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.60 ความเข้มข้น $85x10^{-3}$ โมลาร์

ชั่งโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 11.57 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 980 มล. นำไปปรับ pH ให้ได้ 5.60 ด้วยกรดฟอสฟอริคเข้มข้น แล้วจึงนำไปปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่นในฟลาสค์ปรับปริมาตร

4.6 สารละลายซิงค์ซัลเฟต 10% (น้ำหนักโดยปริมาตร) ในน้ำ

ชั่งซิงค์ซัลเฟต แอนไฮดรัส จำนวน 10 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. ด้วยน้ำกลั่นในฟลาสค์ปรับปริมาตร

วิธีการศึกษา

เพื่อให้มีรูปแบบการศึกษาที่ชัดเจน ที่จะนำผลไปใช้สร้างกระสวนการวิเคราะห์ได้ การศึกษาทดลองนี้มีข้อกำหนดต่าง ๆ ดังนี้

- การศึกษานี้เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณยา ที่เติมไปในพลาสมาของคน ด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งเป็นเทคนิควิธีที่ใช้ทั่วไปและเน้นใช้ Isocratic reversed-phase system และ External standard method

- เกณฑ์การคัดเลือกตัวยาเพื่อนำมาใช้ในการศึกษา คือ ตัวยาที่นำมาศึกษาต้องเป็นยาที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูง และมีคุณสมบัติเป็นกรด ซึ่งยาเหล่านี้จะเป็นยาที่สามารถหาได้ไม่ยาก และเป็นยาที่มีการผลิตในประเทศ

019277

ค่อนข้างมาก เพื่อเน้นประโยชน์การนำผลการศึกษานี้ไปใช้ได้ทันที โดยอาจมีรายงานการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของยาเหล่านี้ตามวารสารต่างๆ หรือไม่ก็ได้

ยาที่ได้คัดเลือกสำหรับใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ คลอกซาซิลิน โซเดียม (Cloxacillin sodium), ไดโคลฟีแนค (Diclofenac), ไดคลอกซาซิลิน โซเดียม (Dicloxacillin sodium), ฟูโรซีไมด์ (Furosemide), ไกลเบนคลาไมด์ (Glibenclamide), ไอบูโปรเฟน (Ibuprofen), อินโดเมทาซิน (Indomethacin), คีโตโปรเฟน (Ketoprofen), กรดมีเฟนนามิค (Mefenamic acid), นาโปรเซน (Naproxen), ฟีนิลบิวทาโซน (Phenylbutazone) และไพรอกซิแคม (Piroxicam)

- ช่วงความเข้มข้นของยาแต่ละตัวที่ทำการศึกษา จะครอบคลุมความเข้มข้นสูงสุด จนถึงความเข้มข้นที่สามารถตรวจวัดได้ตามวิธีวิเคราะห์ที่เลือกใช้นั้น โดยอาศัยข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาแต่ละตัว ประกอบกับช่วงความเข้มข้นของยาที่ศึกษาที่ปรากฏ ในวารสารทางด้านการวิเคราะห์ต่าง ๆ ของตัวยานั้น

- ในแต่ละช่วงความเข้มข้นของยาแต่ละตัว จะเตรียมตัวอย่างพลาสมาเป็น 6 ชุดแยกจากกัน (hexa-replicate) สำหรับทำการทดลอง (n = 6)

- การคัดเลือกสารเคมีที่ใช้แยกพลาสมาโปรตีน เนื่องจากสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการแยกพลาสมาโปรตีนที่นิยมใช้ ในด้านการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา (Heide, et al., 1977; Henry, 1964; Koch and Hanke, 1953; Peter and Slyke, 1932; Somogyi, 1930) แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1. ตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถรวมกับน้ำได้ (miscible organic solvents) ได้แก่ แอซีโตไนไตรล์ (acetonitrile) และเมทานอล (methanol) ซึ่งเป็นกลุ่มสารเคมีที่ทำให้โปรตีนสูญเสียน้ำ (dehydration) ออกจากโมเลกุล ด้วยกลไกต่าง ๆ คือ

ก. โมเลกุลของตัวทำละลายอินทรีย์ จะแย่งกับโมเลกุลของโปรตีนในการรวมตัวกับน้ำทำให้โปรตีนสูญเสียน้ำออกจากโมเลกุล

ข. ตัวทำละลายอินทรีย์จะทำลายธรรมชาติของโปรตีน (denaturation) ทำให้คุณสมบัติของโปรตีนเปลี่ยนแปลง โปรตีนจึงละลายในพลาสมาลดลง

ค. ตัวทำละลายอินทรีย์จะไปลดค่า dielectric constant ของน้ำ ซึ่งปกติค่านี้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อค่า electrostatic force และ repulsion ระหว่างโมเลกุลของโปรตีน ดังนั้นจึงมีผลให้ repulsion ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนลดลง จึงเกิด attraction ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเองและตกตะกอนลงมา

2. กลุ่มสารเคมีที่ทำให้โปรตีนเกิดเกลือที่ไม่ละลายน้ำ (form insoluble salts) ซึ่งแบ่งได้เป็น

2.1 ตัวตกตะกอนโปรตีนที่มีประจุบวก มักจะเป็นโลหะหนักที่มีคุณสมบัติเป็นไดวาเลนท์ (Greenwald, 1915; Peter and Slyke, 1932;

Somogyi, 1930, 1931) ตัวที่นิยมใช้ได้แก่ สังกะสี (zinc, Zn^{2+}) เพราะนอกจากจะแยกพลาสมาโปรตีนแล้ว ยังสามารถแยก non-reducing sugar และ non-protein nitrogen ได้ด้วย

2.2. ตัวตกตะกอนโปรตีนที่มีประจุลบ ได้แก่ กลุ่มกรด เช่น กรดไตรคลอโรอะซีติค (Trichloroacetic acid) และกรดเพอคลอริค (Perchloric acid) (Berkman,1953; Brigg,1940; Heide,et al., 1977; Hoden, 1923) สารกลุ่มนี้มักจะไม่ค่อยนิยมใช้ในด้านการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา หรือถูกเลือกใช้เป็นอันดับหลัง ๆ เนื่องจากไม่สามารถแยกพลาสมาโปรตีนบางชนิด (Frank, 1977; Henry, 1964; Peter and Slyke, 1932) เช่น ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) และซีโรมิวคอยด์ (seromucoid) ในบางครั้งอาจพบอัลบูมินด้วย นอกจากนี้ยังให้ค่า pH ของสารละลายที่เหลือหลังการแยกพลาสมาโปรตีนที่ต่ำมาก (Blanchard, 1981) จึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนเพิ่มขึ้น เพื่อให้เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ทำให้ไม่สามารถนำไปวิเคราะห์หาปริมาณยาต่อได้ทันที

การศึกษานี้กำหนดขั้นตอนของการใช้สารเคมี เพื่อการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา ดังนี้คือ

- ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ แอซีโตไนไตรล์ และ เมทานอลก่อน เพราะสะดวกและเหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เนื่องจากสารกลุ่มนี้เข้ากันได้กับสารที่ใช้เป็นองค์ประกอบของโมบายเฟส (mobile phase) ในระบบ HPLC ประเมินผลการทดลองโดยพิจารณาลักษณะของตัวอย่างพลาสมาหลังการเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนลงในตัวอย่างพลาสมา ลักษณะโครมาโทแกรม และเปอร์เซนต์การคืนกลับของยา (รายละเอียดแสดงในวิธีการขั้นตอนที่ 4 ของบทที่ 2)

- ยาตัวใดที่ไม่ผ่านการประเมินจะถูกทดลอง เพื่อแยกพลาสมาโปรตีนต่อ โดยใช้สารตกตะกอนโปรตีนที่ทำให้เกิดเกลือที่ไม่ละลายน้ำ ที่เป็นตัวตะกอนโปรตีนที่มีประจุบวก คือ สังกะสี และ/หรือ ตัวตกตะกอนโปรตีนที่มีประจุลบ คือ กรด เช่น กรดไตรคลอโรอะซีติค

- ถ้าใช้ขั้นตอนทั้งหมดนี้แล้ว ยังไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินดังกล่าวจะจัดยาตัวนั้นอยู่ในกลุ่มที่ไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกโปรตีน

ดังนั้นเพื่อดำเนินการศึกษาตามข้อกำหนดดังกล่าว จึงแบ่งได้เป็น 6 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาตัวยาที่ถูกคัดเลือกเป็นตัวแบบในการศึกษา

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ตัวยาต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคทาง HPLC

ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา

ขั้นตอนที่ 4 การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน

ขั้นตอนที่ 5 การ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโดยการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา

ขั้นตอนที่ 6 การสร้างกระสวนการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของยากลุ่มกรดที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูง โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเทคนิคทาง HPLC และการคาดการณ์เกี่ยวกับ Binding Site ของยา

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาตัวยาที่ถูกคัดเลือกเป็นตัวแบบในการศึกษา

ทำการศึกษาตัวยาที่ถูกคัดเลือกเป็นตัวแบบในการศึกษาในหัวข้อต่อไปนี้

- คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของตัวยา
- การพิสูจน์เอกลักษณ์ของตัวยา

ก. <u>คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของตัวยา</u>

ทำการศึกษาคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของตัวยาที่ถูกคัดเลือกเป็นตัวแบบในการศึกษา เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ทาง HPLC ของแต่ละตัวยา

ข. <u>การพิสูจน์เอกลักษณ์ของตัวยาที่เป็นตัวแบบในการศึกษา</u>

เนื่องจากสารเคมีที่ใช้เป็นตัวยาในการศึกษาได้รับการอนุเคราะห์จากที่ต่าง ๆ ซึ่งมักไม่ได้ในรูปของสารมาตรฐานอ้างอิง (reference standard) เพื่อเป็นการยืนยันให้มั่นใจในความบริสุทธิ์ของตัวยาเหล่านั้นว่าสามารถนำมาใช้ได้ จึงได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของยาทุกตัวก่อนนำไปใช้ในการศึกษาทดลอง โดยทำการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของตัวยาแต่ละตัวตามที่ปรากฏในเอกสารอ้างอิง ดังนี้

1. ลักษณะทั่วไปของตัวยา (Description)

โดยการสังเกตลักษณะผงยาที่ปรากฏให้เห็นด้วยตา (appearance) ตลอดจนสี กลิ่น และรสจะต้องคล้ายคลึงกับลักษณะของตัวยาในเอกสารอ้างอิง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การหาจุดหลอมเหลว

จุดหลอมเหลวของผงยาที่ทำการศึกษาที่ได้จากการทดลอง ต้องมีค่าใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลวมาตรฐานของตัวยานั้นที่ปรากฏในเอกสารอ้างอิง

วิธีการทดลอง :-

การหาจุดหลอมเหลว ด้วยเครื่องหาจุดหลอมเหลวทำโดยบรรจุผงยาที่บดละเอียดในหลอดรูเล็ก (capillary tube) ให้มีความสูงของผงยาจากก้นหลอดขึ้นมา เมื่ออัดแน่นประมาณ 0.5-1 ซม. เปิดเครื่องหาจุดหลอมเหลวโดยให้ความร้อนเพิ่มขึ้นในอัตรา 4-5°ซ ต่อนาที จนกระทั่งถึงอุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดหลอมเหลวของตัวยาประมาณ 10°ซ จึงลดอัตราการเพิ่มของอุณหภูมิให้เป็น 1°ซ ต่อนาที เมื่อถึงอุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดหลอมเหลวของตัวยาประมาณ 5°ซ ใส่หลอดรูเล็กที่บรรจุสารเรียบร้อยแล้วลงในเครื่องหาจุดหลอมเหลวสังเกตและบันทึกอุณหภูมิที่สารเริ่มหลอมเหลว และหลอมเหลวจนหมด

3. การตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตร้าไวโอเลต

สเปคตรัมอัลตร้าไวโอเลต (Ultraviolet spectrum) ที่ได้จากการทดลองต้องมีลักษณะเหมือนกับสเปคตรัมอัลตร้าไวโอเลตของยานั้นที่ปรากฏในเอกสารอ้างอิง

วิธีการทดลอง :-

เตรียมสารละลายมาตรฐานของตัวยาในเมทานอล หรือแอซีโตไนไตรล์ ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยพิจารณาค่าการดูดกลืนแสง (Absorptivity) หรือ E(1%,1cm) ของตัวยานั้น จากเอกสารอ้างอิง บรรจุสารละลายของตัวยาในควอร์ทเซล (quartz cell) สำหรับใช้กับเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่มีขนาดความกว้างของเซลที่แสงผ่านได้ (pathlength) เท่ากับ 1 ซม. สำรวจ (scan) การดูดกลืนแสงของสารละลายของตัวยาในช่วงความยาวคลื่น 200-400 นาโนเมตร โดยมีความเร็วของการสำรวจ 50 นาโนเมตร/นาที สเปคตรัมของสารจะถูกบันทึกด้วยเครื่องบันทึกด้วยความเร็ว 50 มม./นาที

4. การตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงอินฟราเรด

สเปคตรัมอินฟราเรด (Infrared spectrum) ของตัวยาที่ได้จากการทดลองต้องมีลักษณะที่เหมือนกับสเปคตรัมอินฟราเรดของตัวยาที่ปรากฏในเอกสารอ้างอิง

วิธีการทดลอง :-

บดผสมผงยาจำนวนเล็กน้อยกับโปแตสเซียมโบรไมด์ที่ปราศจากน้ำ (anhydrous potassium bromide) จนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปตอกอัดเป็นเม็ด (pellet) ด้วยเครื่องอัดเม็ด สำรวจ (scan) การดูดกลืนแสงของตัวยาในช่วงอินฟราเรด และบันทึกเป็นสเปคตรัมอินฟราเรดของตัวยา เพื่อเปรียบเทียบกับสเปคตรัมในเอกสาร

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์แต่ละตัวยาโดยเทคนิค HPLC

การศึกษาทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์แต่ละตัวยาโดยเทคนิค HPLC เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป แบ่งออกเป็น 4 ส่วน ดังนี้

- การเลือกใช้คอลัมน์
- การคัดเลือกดีเทคเตอร์ที่ใช้ในการตรวจวัดตัวยา
- การทดลองหาส่วนประกอบที่เหมาะสมของโมบายเฟส
- การศึกษาระดับยาในเลือดของแต่ละตัวยาเพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานของตัวยา

สภาวะทาง HPLC ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง สำหรับแต่ละตัวยาจะใช้กับการแยกพลาสมาโปรตีนทุกแบบ เพื่อให้สามารถนำหลักสถิติเข้ามาช่วยในการตัดสิน ในกรณีของตัวยาที่ใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนได้มากกว่า 1 ชนิด

ก. <u>การเลือกใช้คอลัมน์</u>

ตัวยาแต่ละตัวที่คัดเลือกมาศึกษา มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในแอลกอฮอล์ และ/หรือตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ เช่น คลอโรฟอร์ม อะซีโตน จึงได้เลือกใช้เทคนิค reversed-phase HPLC และใช้คอลัมน์ที่เป็น C18 ซึ่งมีคุณสมบัติ non-polar มากกว่า alkyl side chain reversed-phase column ชนิดอื่น ๆ จึงเหมาะกับตัวยาทุกตัวที่ทำการศึกษา ซึ่งมีคุณสมบัติ non-polar

คอลัมน์ที่ใช้คือ μBondapak C18 และ Bondclone10 C18 ซึ่งเป็นคอลัมน์ C18 เช่นเดียวกัน อนุภาคของสารที่บรรจุภายในคอลัมน์มีขนาด 10 ไมครอน และมีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ (irregular particle) จึงเป็นคอลัมน์ที่มีราคาถูก แต่มีความทนทานและมีประสิทธิภาพดีพอสมควร จากการสำรวจรายงานการวิเคราะห์ยาต่าง ๆ ที่ทำการศึกษา พบว่านิยมใช้คอลัมน์ชนิดดังกล่าวเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา โดยใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีน เพราะนอกจากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น ยังเป็นคอลัมน์ที่ทำให้ระบบ HPLC มีความดันไม่สูงมากนักอีกด้วย

ข. <u>การคัดเลือกดีเทคเตอร์ที่ใช้ในการตรวจวัดตัวยา</u>

อัลตร้าไวโอเลต ดีเทคเตอร์ (ultraviolet detector) สำหรับ HPLC เป็นดีเทคเตอร์ที่ค่อนข้างจะเป็นที่นิยมใช้มากกว่าดีเทคเตอร์อื่น ๆ เช่น ฟลูออโรเมตริคดีเทคเตอร์ (fluorometric detector), อีเลคโตรเคมิคอลดีเทคเตอร์ (electrochemical detector) การศึกษานี้จึงได้ตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของยาทุกตัวที่ได้คัดเลือกมาทำการศึกษา ในช่วงอัลตร้า-ไวโอเลต เพื่อคัดเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสม

วิธีการทดลอง :-

มีรายละเอียดดังปรากฏในวิธีการขั้นตอนที่ 1 ข.3

ค. <u>การทดลองหาส่วนประกอบที่เหมาะสมของโมบายเฟส</u>

การวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโดยเทคนิค reversed-phase HPLC นั้น โมบายเฟสที่ใช้มักจะประกอบด้วย ส่วนที่เป็นบัฟเฟอร์และตัวดัดแปรอินทรีย์ (organic modifier) ต่างๆ เช่น แอซีโตไนไตรล์ และ เมทานอล เป็นต้น ในการทดลองหาส่วนประกอบที่เหมาะสมของโมบายเฟสของยาแต่ละตัวที่ศึกษาจะแบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

- การเลือกชนิดของบัฟเฟอร์
- การเลือกตัวดัดแปรอินทรีย์
- การปรับความเข้มข้นและค่า pH ของบัฟเฟอร์
- การปรับสัดส่วนขององค์ประกอบของโมบายเฟส

โดยการใช้คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของตัวยาแต่ละตัว เป็นหลักในการทดลองหาโมบายเฟสที่เหมาะสมของยานั้นๆ ร่วมกับการใช้ข้อมูลจากรายงานในวารสารต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับการวิเคราะห์ยาเหล่านั้นในพลาสมา เพื่อให้ได้โมบายเฟสที่ทำให้วิเคราะห์ยาแต่ละตัวได้โดยมีการแยก (resolution) ที่ดี มีเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ (retention time) ที่เหมาะสม และไม่ถูกรบกวนด้วย endogenous substance ต่าง ๆ

ง. <u>การศึกษาระดับยาในเลือดเพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานของตัวยา</u>

ช่วงความเข้มข้นของแต่ละตัวยาที่ทำการศึกษาจะกำหนดใช้ความเข้มข้นที่มากกว่าความเข้นข้นสูงสุดของยานั้นเมื่อถูกบริหารเข้าสู่ร่างกาย จนกระทั่ง

ถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ใช้โดยอาศัยข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์ของยาแต่ละตัว (รายละเอียดในภาคผนวก ก.) ร่วมกับข้อมูลจากรายงานการวิเคราะห์ยาในพลาสมาของยาเหล่านั้น ช่วงความเข้มข้นของแต่ละตัวยาที่ใช้ในการศึกษามีรายละเอียดแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงช่วงความเข้มข้นของตัวยาที่ใช้ในการศึกษา

ยา	สารละลายสต็อค			ช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษา (มคก./มล.ของสารละลาย)
	น้ำหนักผงยา (มก.)	ปริมาตรตัวทำละลาย (มล.)	ความเข้มข้น (มก./มล.)	
คลอกซาซิลิน โซเดียม	210	50*	4.20	6.0 - 4200.0
ไดโคลฟีแนค	25	100	0.25	10.0 - 150.0
ไดคลอกซาซิลิน โซเดียม	240	100*	2.40	6.0 - 2400.0
ฟูโรซีไมด์	25	50	0.50	10.0 - 500.0
ไกลเบนคลาไมด์	20	100	0.20	8.0 - 20.0
ไอบูโปรเฟน	125	50	2.50	25.0 - 2500.0
อินโดเมทาซิน	25	50	0.50	5.0 - 500.0
คีโตโปรเฟน	50	50	1.00	5.0 - 1000.0
มีเฟนนามิค แอซิด	25	50	0.50	10.0 - 500.0
นาโปรเซน	300	50	6.00	12.0 - 6000.0
ฟีนิลบิวทาโซน	250	50	5.00	5.0 - 5000.0
ไพรอกซิแคม	75	50	1.50	2.5 - 1500.0

หมายเหตุ ตัวทำละลายเป็นเมทานอล ยกเว้น * ตัวทำละลายเป็นน้ำ

ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา

การศึกษานี้จะยึดหลักเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย HPLC เพราะเป็นเทคนิคที่มักใช้ทั่วไป และจะเน้นใช้ Isocratic reversed-phase system และ External standard method ในแต่ละช่วงความเข้มข้นของยาแต่ละตัว จะเตรียมตัวอย่างพลาสมาเป็น 6 ชุด แยกจากกัน (hexa-replicate) สำหรับทำการทดลอง (n = 6)

การดำเนินการทดลองจะเป็นการวิเคราะห์ปริมาณยาที่เติมไปในพลาสมาของคน โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนที่ได้คัดเลือกไว้ (จากวิธีการศึกษา) โดยจะทำการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาของยาทุกตัว ด้วยสารตกตะกอนโปรตีนที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ตัว คือ แอซีโตไนไตรล์ และ เมทานอลก่อน (รายละเอียดดังข้อ ก.) เพราะสะดวกและเหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทาง HPLC เนื่องจากสารกลุ่มนี้เข้ากันได้ (miscible) กับสารที่ใช้เป็นองค์ประกอบของโมบายเฟสในระบบ HPLC

ผลการทดลองจะทำการประเมินตามเกณฑ์มาตรฐานที่ได้กำหนดไว้ โดยอาศัยหลักทางทฤษฎี (ในขั้นตอนที่ 4) ยาตัวใดที่ไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินดังกล่าวจะถูกทดลอง เพื่อแยกพลาสมาโปรตีนต่อ โดยใช้สารตกตะกอนโปรตีนที่ทำให้พลาสมาโปรตีนเกิดเกลือที่ไม่ละลายน้ำ ที่เป็นสารอนินทรีย์ที่มีประจุบวกคือ ซิงค์ซัลเฟต (รายละเอียดดังข้อ ข.1) และ/หรือ สารอนินทรีย์ที่มีประจุลบคือกรดไตรคลอโรอะซีติค (รายละเอียดดังข้อ ข.2) ตามลำดับ ยาตัวใดที่ผ่านเกณฑ์การประเมินดังกล่าวแล้ว จะถูกทดลองเพื่อ validate วิธีวิเคราะห์จนครบตามหลักทางทฤษฎี (ดังในขั้นตอนที่ 5)

ยาตัวใดเมื่อผ่านขั้นตอนทั้งหมดนี้แล้ว ยังไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินจะจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณโดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารตกตะกอนพลาสมาโปรตีน

ก. <u>การวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์</u>

ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ แอซีโตไนไตรล์ และเมทานอล ถูกนำมาใช้ในการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาของยาทุกตัวที่คัดเลือกมาศึกษาโดยมีขั้นตอนการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1

รูปที่ 1 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

ผสมพลาสมา 500 มคล. กับสารละลายมาตรฐานของยา 10 มคล.*
ในหลอดทดลองฝาเกลียว
↓ วอร์เทกซ์นาน 15 วินาที
เติมแอซีโตไนไตรล์ หรือ เมทานอล อย่างใดอย่างหนึ่ง จำนวน 2.0 มล.
↓ วอร์เทกซ์นาน 15 วินาที
ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 3000 รอบ/นาที
นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
↓
นำสารละลายใสส่วนบนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาฉีดเข้า HPLC จำนวน 20 มคล. โดยใช้สภาวะการทดลองจากขั้นตอนที่ 2

<u>หมายเหตุ</u> * ช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษา แสดงดังตารางที่ 1

ข. <u>การวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา โดยการใช้สารละลายอินทรีย์ที่มีประจุร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ในการแยกพลาสมาโปรตีน</u>

1. การใช้สารละลายอินทรีย์ที่มีประจุบวกร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ในการตกตะกอนพลาสมาโปรตีน

สารละลายอินทรีย์ที่มีประจุบวกที่ใช้ในการศึกษานี้คือซิงค์ซัลเฟต ซึ่งจะใช้ประจุบวกของ Zn^{2+} ในการจับกับส่วนที่แสดงประจุลบบนพลาสมาโปรตีน พลาสมาโปรตีนจึงถูกดึงออกจากตัวอย่างพลาสมาได้โดยมีขั้นตอนวิธีการทดลองดังแสดงในรูปที่ 2

รูปที่ 2 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโดยการใช้สารละลายอินทรีย์ที่มีประจุบวกร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ในการแยกพลาสมาโปรตีน

ผสมพลาสมา 500 มคล. กับสารละลายมาตรฐานของยา 10 มคล.*
ในหลอดทดลองฝาเกลียว
↓ วอร์เทกซ์นาน 15 วินาที
เติมสารละลายซิงค์ซัลเฟต △ จำนวน 100 มคล.
↓ วอร์เทกซ์นาน 15 วินาที
เติมแอซีโตไนไตรล์ หรือ เมทานอล จำนวน 1.0 มล.
↓ วอร์เทกซ์นาน 15 วินาที
ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 3000 รอบ/นาที
นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
นำสารละลายใสส่วนบนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาฉีดเข้า HPLC จำนวน 20 มคล. โดยใช้สภาวะการทดลองจากขั้นตอนที่ 2

<u>หมายเหตุ</u> * ช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษา แสดงดังตารางที่ 1

△ สารละลายซิงค์ซัลเฟต 10% (น้ำหนักโดยปริมาตร) ในน้ำ

2. การใช้สารละลายอินทรีย์ที่มีประจุลบร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ในการตกตะกอนพลาสมาโปรตีน

สารละลายอินทรีย์ที่มีประจุลบที่ใช้ในการศึกษานี้คือกรดไตรคลอโรอะซีติค ซึ่งจะให้ประจุลบในการจับกับส่วนที่แสดงประจุบวกของพลาสมาโปรตีน พลาสมาโปรตีนจึงถูกดึงออกมาจากตัวอย่างพลาสมาได้ แต่สารตกตะกอนพลาสมาโปรตีนกลุ่มนี้จะถูกเลือกใช้เป็นอันดับสุดท้ายเนื่องจากให้ค่า pH ของสารละลายส่วนที่เหลือจากการแยกพลาสมาโปรตีนที่ต่ำมากจึงไม่สามารถฉีดเข้า HPLC ได้โดยตรง จำเป็นต้องมีขั้นตอนการสะเทิน(neutralize) ก่อนโดยมีขั้นตอนวิธีการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3

รูปที่ 3 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโดยการใช้สารละลายอินทรีย์ที่มีประจุลบร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ในการแยกพลาสมาโปรตีน

ผสมพลาสมา 500 มคล. กับสารละลายมาตรฐานของยา 10 มคล.*
ในหลอดทดลองฝาเกลียว
↓ วอร์เทกซ์นาน 15 วินาที
เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติค@ จำนวน 100 มคล.
↓ วอร์เทกซ์นาน 15 วินาที
ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 3-8 ด้วยสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์△
↓ วอร์เทกซ์นาน 15 วินาที
เติมแอซีโตไนไตรล์ หรือ เมทานอล จำนวน 1.0 มล.
↓ วอร์เทกซ์นาน 15 วินาที
ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 3000 รอบ/นาที
นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
นำสารละลายใสส่วนบนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาฉีดเข้า HPLC จำนวน
20 มคล. โดยใช้สภาวะการทดลองจากขั้นตอนที่ 2

หมายเหตุ * ช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษา แสดงดังตารางที่ 1

@ สารละลายกรดไตรคลอโอะซีติค 10%(น้ำหนักโดยปริมาตร) ในน้ำ

△ สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์

ขั้นตอนที่ 4 การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน

ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของยาทุกตัวจากการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนทุกแบบจะถูกนำมาประเมินในหัวข้อต่าง ๆ ดังนี้

ก. <u>ลักษณะของตัวอย่างพลาสมาหลังจากเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนในตัวอย่างพลาสมา</u>

ตัวอย่างพลาสมาจะแยกออกเป็น 2 ส่วน หลังการเติมสารแยกพลาสมาโปรตีน ดังนั้นจะแบ่งพิจารณาเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1. ลักษณะตะกอนพลาสมาโปรตีน ควรอยู่ในรูปของตะกอนหนักที่สามารถแยกออกจากส่วนอื่น ๆ ของตัวอย่างพลาสมาได้อย่างชัดเจน

2. ลักษณะของสารละลายส่วนใสที่แยกออกมาของตัวอย่างพลาสมาหลังการเติมสารแยกพลาสมาโปรตีน สามารถนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยฉีดเข้า HPLC ได้โดยตรง โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนอื่น ๆ ในการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมอีกโดยพิจารณาในแง่ของ

ก) ความใสสะอาดของสารละลายส่วนใสที่แยกออกมาของตัวอย่างพลาสมา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพลาสมาโปรตีนแยกออกจากตัวอย่างพลาสมาได้ชัดเจน

ข) ความเป็นกรด-ด่างของสารละลายส่วนใสที่แยกออกมาของตัวอย่างพลาสมา ควรอยู่ในช่วง pH 3-8 หรือสามารถทำให้มี pH 3-8 ได้ไม่ยุ่งยาก ซึ่ง pH ในช่วงดังกล่าวเป็นช่วงที่เหมาะสมที่ไม่ทำให้เกิดความเสียหายแก่โครมาโทกราฟิคคอลัมน์ หรือทำให้อายุการใช้งานของคอลัมน์สั้นลง

ข. <u>ลักษณะโครมาโทแกรม</u>

ลักษณะโครมาโทแกรมที่ได้ไม่ควรมีการรบกวนของ endogenous substances ที่มีอยู่ในพลาสมา พีคของยาที่ได้เป็นพีคเดี่ยว ที่มีความสมมาตรและแคบ สามารถแยกออกจากพีคอื่น ๆ ได้ และมีเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ (retention time) ที่เหมาะสม ที่ไม่ทำให้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างมากเกินไป

ค. <u>เปอร์เซนต์การคืนกลับของยา</u> (% Physical recovery)

เปอร์เซนต์การคืนกลับของยาเป็นค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ในการแยกตัวยาโดยคำนวณเป็นเปอร์เซนต์การคืนกลับของยาที่ผ่านขั้นตอนการแยกพลาสมาโปรตีนกับยาที่ฉีดเข้า HPLC โดยตรง ดังนี้

$$\% \text{ Physical recovery} = \frac{PA_1 \text{ หรือ } PH_1 \times 100}{PA_2 \text{ หรือ } PH_2} \quad ...(1)$$

เมื่อ ปริมาตรที่ฉีดเข้า HPLC เท่ากัน

PA_1 และ PA_2 คือ พื้นที่พีคของยาในตัวอย่างพลาสมา และสารละลายมาตรฐาน ตามลำดับ

PH_1 และ PH_2 คือ ความสูงของพีคยาในตัวอย่างพลาสมาและสารละลายมาตรฐาน ตามลำดับ

การวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาทั่วไป ควรให้เปอร์เซนต์การคืนกลับของยาไม่ต่ำกว่า 75-80% (Silva, 1985) โดยมีสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนไม่เกิน $\pm$ 10% ในการศึกษานี้จะกำหนดใช้เกณฑ์เปอร์เซนต์การคืนกลับของยาไม่ต่ำกว่า 80% ตัวยาที่ผ่านการประเมินผลการแยกพลาสมาโปรตีน จาก

ขั้นตอนที่ 4 ทั้งหมดแล้ว แสดงว่าวิธีการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารตกตะกอนโปรตีนนั้นใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ยานั้น ๆ ได้ จะถูกนำไปทดลองเพื่อทำการประเมินวิธีวิเคราะห์ในขั้นตอนที่ 5 ต่อจนครบตามหลักเกณฑ์ทางทฤษฎี กรณีที่ไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินผลการแยกพลาสมาโปรตีนในหัวข้อใดหัวข้อหนึ่งจะไม่นำมา validate

กรณีที่ใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนได้มากกว่า 1 ชนิด สำหรับยาแต่ละตัวจะใช้หลักสถิติช่วยในการตัดสิน

ขั้นตอนที่ 5 การ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณยาในพลาสมาโดยการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา

การ validate วิธีวิเคราะห์ เพื่อเป็นการยืนยันว่า วิธีวิเคราะห์โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนนี้ สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาได้จริง วิธีวิเคราะห์ยาในพลาสมาของยาทุกตัวที่ศึกษา ต้องผ่านขั้นตอนการ validate ต่อไปนี้ก่อน จึงจะเป็นที่ยอมรับและนำไปใช้ได้

ก. <u>การศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสาร</u>

การศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสาร แสดงในเทอมของเปอร์เซนต์การคืนกลับของสาร (% Physical recovery) รายละเอียดการคำนวณและการพิจารณาเช่นเดียวกับข้อ ค.ขั้นตอนที่ 4

ข. <u>การศึกษาความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่พีคของตัวยากับความเข้มข้นของยาในพลาสมา</u> (Linearity)

การศึกษานี้เป็นการทดลองเพื่อยืนยันว่าความเข้มข้นของยาในพลาสมาในช่วงที่ศึกษาซึ่งครอบคลุมช่วงความเข้มข้นของยาในร่างกาย กับการดูดกลืนแสง

ของตัวยา ซึ่งแสดงด้วยพื้นที่พีคของยา เป็นสัดส่วนโดยตรงต่อกันตามกฎของเบียร์ (Beer's Law)

วิธีการทดลอง :-

วิเคราะห์หาปริมาณยาในตัวอย่างพลาสมาที่เติมยาในความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5-13 ความเข้มข้นดังกล่าวไว้ในตารางที่ 1 ตามวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมินจากขั้นตอนที่ 4 ข้อมูลที่ได้นำมาเขียนกราฟหาความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่พีคของยากับความเข้มข้นของยาในตัวอย่างพลาสมา

ค. <u>การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์</u> (Specificity)

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์จะพิจารณาจากเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ของตัวยาเมื่ออยู่ในตัวทำละลายกับเมื่ออยู่ในพลาสมา หลังจากผ่านกระบวนการต่าง ๆ ทางการวิเคราะห์เช่นเดียวกัน ตลอดจนเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมาและของตัวอย่างพลาสมา เพื่อพิจารณาถึงการรบกวนของสารอื่น ๆ และ/หรือ endogenous substance ต่างๆ ที่อาจมีผลต่อวิธีการวิเคราะห์นั้น ๆ ได้

ง. <u>การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์</u> (Lowest Limit Detection; LLD)

การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์อาศัยหลักที่ว่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารที่ถือว่ายังสามารถวิเคราะห์ได้ จะต้องให้สัญญาณของสารอย่างน้อยเป็น 2 เท่าของสัญญาณรบกวนปกติ (signal to noise ratio; $S/N \geq 2$) (Silva, 1985; Smith and Stewart, 1981) ซึ่งจะคำนวณโดยใช้อัตราส่วนของครึ่งหนึ่งของความสูงของพีคยา (signal; หน่วยเป็น มม.) กับครึ่งหนึ่งของความสูงของสัญญาณรบกวนปกติ (noise; หน่วยเป็น มม.)

วิธีการทดลอง :-

เตรียมตัวอย่างพลาสมาให้มีความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่วิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 4 แล้วให้อัตราส่วนครึ่งหนึ่งของความสูงของพีคยาต่อครึ่งหนึ่งของความสูงของสัญญาณรบกวนปกติไม่น้อยกว่า 2:1 เมื่อใช้แอทเทนูเอชั่น (attenuation) ของเครื่องประมวลผล (integrator) ที่ต่ำที่สุด (2^{o}) ทำการทดลองซ้ำโดยใช้ความเข้มข้นนั้นอีก 9 ตัวอย่าง คำนวณร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของค่าอัตราส่วน S/N ต้องไม่เกิน $\pm$ 10%

จ. <u>การศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์</u> (Precision)

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์จะแบ่งออกเป็นความเที่ยงตรงภายในวันเดียวกัน (Within-run precision) และความเที่ยงตรงระหว่างวัน (Between-run precision) การวิเคราะห์ปริมาณยาในพลาสมา โดยทั่วไปควรมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันไม่เกิน $\pm$ 10% (Silva, 1985; Smith and Stewart, 1981)

1. การหาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน

เป็นการทดลองเพื่อยืนยันว่า เมื่อนำวิธีวิเคราะห์นี้มาทำการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาภายในวันเดียวกัน ก็สามารถให้ผลในลักษณะเดียวกัน

วิธีการทดลอง :-

เตรียมตัวอย่างพลาสมาที่มีชุดความเข้มข้นของตัวยาเช่นเดียวกับการหาเปอร์เซนต์การคืนกลับของยาในข้อ ค. ขั้นตอนที่ 4 รวมกับความเข้มข้นที่เป็นขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ในข้อ ง. ขั้นตอนที่ 5 จำนวน 3 ชุดความเข้มข้น (n = 3) ทำการวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมินจากขั้นตอนที่ 4 ให้เสร็จสิ้นภายในวันเดียวกัน คำนวณเปอร์เซนต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, %CV) ของพื้นที่พีคของยาและความสูงของ

พีคยาที่ความเข้มข้นเดียวกัน ต้องให้ค่าเปอร์เซนต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนไม่เกิน ± 10%

2. การหาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ระหว่างวัน

เป็นการทดลองเพื่อยืนยันว่า เมื่อนำวิธีวิเคราะห์นี้มาทำการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาในวันต่าง ๆ กัน ก็สามารถให้ผลในลักษณะเดียวกัน

วิธีการทดลอง :-

เตรียมตัวอย่างพลาสมาและทำการวิเคราะห์ในทำนองเดียวกันกับการหาความเที่ยงตรงภายในวันเดียวกันในข้อ 1. วันละ 1 ชุดความเข้มข้น จำนวน 5 วัน (n = 5) คำนวณเปอร์เซนต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของพื้นที่พีคยาและความสูงของพีคยาที่ความเข้มข้นเดียวกัน ต้องให้ค่าเปอร์เซนต์-สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนไม่เกิน ± 10%

ฉ. <u>การหาปริมาณต่ำสุดของตัวยาในตัวอย่างพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ได้</u>
(Lowest Limit Quantitation, LLQ)

ปริมาณที่ต่ำที่สุดของตัวยาในตัวอย่างพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ได้คือความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการหาความเที่ยงตรงภายในวันเดียวกัน และความเที่ยงตรงระหว่างวันที่ให้เปอร์เซนต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของพื้นที่พีคยาและความสูงของพีคยาไม่เกิน ± 10%

ช. <u>การศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์</u> (Accuracy)

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์จะเป็นการทดลองเพื่อพิสูจน์และยืนยันถึงความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ว่าสามารถให้ผลเช่นเดียวกัน แม้จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาจริง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์จะแสดงด้วยเปอร์เซนต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% Analytical recovery) ทำได้โดยวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาที่ไม่รู้ความเข้มข้น ควบคู่ไปกับการสร้างแคลิแบรชั่น เคิร์ฟ (calibrationcurve) คำนวณค่าความเข้มข้นของยาในตัวอย่างพลาสมา นำค่าที่คำนวณได้ มาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่แท้จริงของยาในตัวอย่างพลาสมานั้น ในรูปของเปอร์เซนต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ ดังนี้

$$\% \text{ Analytical recovery} = \frac{\text{Analytical conc.} \times 100}{\text{Actual conc.}} \quad ..(2)$$

เมื่อ Analytical conc. คือ ความเข้มข้นของยาในตัวอย่างพลาสมาที่วิเคราะห์ได้

Actual conc. คือ ความเข้มข้นที่แท้จริงของยาที่เติมในตัวอย่างพลาสมา

วิธีการทดลอง :-

ก. รับตัวอย่างพลาสมาของตัวยาจำนวน 3 ค่าความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ชุด ตัวอย่างแยกจากกัน

ข. ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาที่ไม่รู้ความเข้มข้นของตัวยาจากข้อ ก ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมินจากขั้นตอนที่ 4 ควบคู่ไปกับการสร้างแคลิแบรชั่น เคิร์ฟของตัวยา โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาที่มีชุดความเข้มข้นเช่นเดียวกับการหาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ในข้อ จ. ด้วยวิธีวิเคราะห์เดียวกัน

ค. พื้นที่พีคของยาที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาที่ไม่รู้ความเข้มข้นดังกล่าว จะนำมาคำนวณเป็นความเข้มข้นของตัวยาในตัวอย่างพลาสมา โดยใช้ค่าความชัน (slope) และค่าตัดแกน (intercept) ที่ได้จากสมการของแคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ซึ่งวิเคราะห์พร้อมไปกับตัวอย่างพลาสมาที่ได้รับมา จากนั้นคำนวณเป็นเปอร์เซนต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ตามสมการ (2)

ขั้นตอนที่ 6 การสร้างกระสวนการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของยากลุ่มที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูงโดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน ด้วยเทคนิคทาง HPLC และการคาดการณ์เกี่ยวกับ binding site ของยา

ผลการศึกษาการวิเคราะห์ยากลุ่มกรดที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูงทั้ง 12 ตัวที่ได้คัดเลือกเป็นตัวแบบในการศึกษา โดยการแยกพลาสมาโปรตีนจะนำมารวบรวมและประมวลผลเพื่อสร้างเป็นกระสวนการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของยากลุ่มกรดที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูง โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเทคนิคทาง HPLC

นอกจากนี้แล้วจะนำผลการศึกษาดังกล่าวมาพิจารณาควบคู่ไปกับลักษณะของ binding site ของตัวยาตลอดจนข้อมูลเกี่ยวกับ binding site ของยาแต่ละตัว เพื่อนำมาใช้ในการคาดการณ์เกี่ยวกับ binding site ของยาตัวอื่นต่อไป