บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์:-

1. สารเคมี: สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ตลอดการศึกษามีดังนี้ :-

1.1 Nifedipine For Pellets (USP XXI) Lot No.8812 H 010 บ.Siegfried (Siegfried AG 4800 Zofingen, Germany)

1.2 4-Dimethylaminobenzaldehyde เกรด AR (E. Merck, Darmstadt, Germany)

1.3 Nitrendipine (ได้รับความอนุเคราะห์จาก บ.Bayer จำกัด, Batch No. RS6113)

1.4 Butamben (Lot No.8915 J 012, Germany)

1.5 Diazepam (Lot No.746BI, U.K.)

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

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

1.8 เฮกเซน เกรด AR (Hexane, J.T. Baker Chemical, New Jersey, USA)

1.9 เอทิลอะซีเตท เกรด AR (Ethyl acetate, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

1.10 คลอโรฟอร์ม เกรด AR (Chloroform, AR; BDH Chemical, Poole, England)

1.11 โพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เกรด AR ; (Potassium Hydroxide, KOH, AR; E. Merck, Damstadt, Germany)

1.12 กรดอะซีติกล้วน เกรด AR(Glacial acetic acid, AR; E. Merck, Damstadt, Germany)

1.13 แอมโมเนียมอะซีเตท เกรด AR (Ammonium acetate, AR; E. Merck, Damstadt, Germany)

1.14 ยูเรีย เกรด AR (Urea, AR; E. Merck, Damstadt, Germany)

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

1.16 ไดโพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เกรด AR (Anhydrous Dipotassium Hydrogen Phosphate, K_2HPO_4, AR; E. Merck, Damstadt, Germany)

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

1.18 Heparin (Leo, Lot No. K08B, USA)

1.19 Adalat ^{R} 10 mg (Bayer, Germany)

2. <u>พลาสมาของคน</u>

ในระหว่างขั้นตอนการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ใช้ pooled plasma จากคน โดยได้รับความอนุเคราะห์จากสภากาชาดไทย เก็บเข้าตู้เย็น ในช่องแช่แข็ง จนกว่าจะถูกนำออกมาใช้ และในการประยุกต์ วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นโดยหาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมา ใช้พลาสมาจากอาสาสมัคร โดยแยกพลาสมาจากเลือด (whole blood) ด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 1,500 รอบ/นาที นาน 15 นาที

3. <u>เครื่องมือ</u> :-เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่

3.1 เครื่องชั่งสำหรับการวิเคราะห์ (Precisa 300 A , PAG OERIKON AG, Switzerland)

3.2 อัลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Ultra-violet Spectrophotometer; Shimadzu, Model UV-180 double beam, Shimadzu, Japan)

3.3 เครื่องวัด pH (Consort pH meter, P 307, Germany)

3.4 เครื่องผสมวอร์เท็กซ์ (Vortex mixer, Vortex-Genie, Scientific Industries, Inc. New York, USA)

3.5 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Clements Model GS 200 H. I Clements Pty Ltd. Australia.)

3.6 ไมโครปิเปต (Micropipet; Pipetman^{R}, Gilson, U.K.)

3.7 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC; Milton Roy LDC Division, Florida, USA) ประกอบด้วย

3.7.1 Model CM 4000 Multiple solvent delivery system

3.7.2 Model SM 4000 Programmable wavelength detector

3.7.3 Model CI-4100 Computing Integrator

3.8 อินเจคเตอร์ (Injector; Rheodyne 7100 Injector Port, Rheodyne, California, USA)

3.9 Disposable Needle No 21, 23 (Terumo, USA)

3.10 Disposable Syringe 5 ml (Terumo, USA)

3.11 Screw-capped tube (Pyrex, USA)

3.12 หลอดไฟสีเหลือง (Tungsram®, 40 W, Hungary)

วิธีการ

ไนเฟดิพีนมีคุณสมบัติไวต่อแสงมากซึ่งจะเปลี่ยนเป็น Nitropyridine Derivative เมื่อถูกแสง UV และเปลี่ยนเป็น Nitrosopyridine Derivative เมื่อถูกแสงปกติ (Daylight) ค่าครึ่งชีวิตในตัวทำละลายอินทรีย์ ประมาณ 15 นาที และ ในพลาสมา ประมาณ 44 นาที (Kleinbloesem and Harten, 1984) ดังนั้นการศึกษาทดลองทุกขั้นตอน จะกระทำภายใต้แสงสีเหลือง(Hamamm and Mc Allister,1983) ภาชนะที่บรรจุตัวยาจะถูกห่อหุ้มด้วย แผ่นอลูมิเนียม ตลอดขั้นตอนที่ศึกษาทดลอง

ขั้นตอนการศึกษาพัฒนา วิธีวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมาโดยเทคนิคทาง HPLC ในครั้งนี้ ได้แบ่งออกเป็น 6 ส่วน ดังนี้ คือ:-

ส่วนที่ 1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม ของการวิเคราะห์สารละลายของตัวยาโดยใช้ HPLC

ส่วนที่ 2 การศึกษาทดลองวิธีการต่าง ๆ ที่จะทำให้ได้ตัวอย่างพลาสมาที่สะอาดมากพอที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทาง HPLC ได้

ส่วนที่ 3 การคัดเลือก Internal standard ที่เหมาะสมและสรุปวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมา

ส่วนที่ 4 การ Validate วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้

ส่วนที่ 5 การศึกษาช่วงระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างพลาสมาที่มีไนเฟดิพีน ในช่องแช่แข็ง

ส่วนที่ 6 การประยุกต์วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น โดยนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้นี้ไปหาปริมาณไนเฟดิพีนในตัวอย่างพลาสมาของผู้ที่ได้รับยา

ส่วนที่ 1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์สารละลายของตัวยาโดยใช้ HPLC

วิธีวิเคราะห์ไนเฟดิพีน ที่ปรากฏตามวารสารต่างประเทศ มีทั้งที่ใช้ UV Detector และ Electrochemical Detector (Huebert et al., 1986 ; Suzuki et al., 1985) UV Detector เป็น Detector ที่นิยมใช้และมีใช้กันโดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการต่างๆ และไนเฟดิพีนมีโครงสร้างที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วง UVได้ดี การศึกษานี้จึงได้ตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของไนเฟดิพีนในช่วง UV เพื่อเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสม

1.1 การตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วง UV ของตัวยา

วิธีการ

ชั่งไนเฟดิพีนมาตรฐาน จำนวน 25.0 มก. มาอย่างถูกต้องแม่นยำละลาย และ ปรับปริมาตรด้วย เมทานอลจนครบ 50 มล. ในฟลาสค์ปรับปริมาตร (ความเข้มข้นของไนเฟดิพีน = 0.50 มก./มล.) สารละลายที่ได้นำมาเจือจางด้วยเมทานอล ให้มีความเข้มข้นของตัวยา 40.0 มคก./มล. โดยปิเปตสารละลายที่ได้จำนวน 2 มล. เจือจาง และปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 25 มล. ในฟลาสค์ปรับปริมาตรบรรจุสารละลายในควอร์ทซเซลล์ (Quartz Cell) สำหรับใช้กับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยมีขนาดความกว้างของเซลล์ที่แสงผ่านได้ (Pathlength) เท่ากับ 1 ซม. สำรวจ (Scan) การดูดกลืนแสงของสารละลาย ในช่วงความยาวคลื่น 190-350 นาโนเมตร ความเร็วของการสำรวจ 50 นาโนเมตร/นาที สเปกตรัมของสารจะถูกบันทึกโดยเครื่องบันทึกด้วยความเร็ว 50 มม./นาที

1.2 <u>การหาสภาวะการทดลองทาง HPLC</u>

การศึกษาครั้งนี้จะทำการหาสภาวะการทดลอง ทางโครมาโทกราฟี เพื่อที่จะใช้ในการศึกษาพัฒนาต่อไป ดังนี้

- การเลือกใช้คอลัมน์
- การเลือกความยาวคลื่นที่จะใช้ในการตรวจหาตัวยา
- การเลือกบัฟเฟอร์ เพื่อเป็นส่วนประกอบของ Mobile Phase

ไนเฟดิพีนมีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายในแอลกอฮอล์ และตัวทำละลายอินทรีย์อื่น ๆ เช่น คลอโรฟอร์ม อะซีโตน ดังที่ได้กล่าวไปแล้ว จึงได้เลือกใช้เทคนิค Reverse-Phase HPLC และ ใช้คอลัมน์ที่เป็น C_{18} ซึ่งมีคุณสมบัติ Non-polar กว่า Alkyl side chain reverse-phase column ชนิดอื่นๆ จึงเหมาะกับตัวยาซึ่งมีคุณสมบัติ Non-polar คอลัมน์ที่ใช้คือ Spherisorb ODS 2 ซึ่งคอลัมน์ชนิดนี้ มีข้อได้เปรียบกว่า คอลัมน์ C_{18} ชนิดอื่นๆ จากการที่สารที่บรรจุภายในคอลัมน์มีลักษณะกลม (Spherical Particle) ซึ่งสามารถเรียงตัวได้แน่นกว่าสารบรรจุภายในคอลัมน์ที่มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ (Irregular Particle)จึงมีความทนทานและมีประสิทธิภาพดีกว่าคอลัมน์ที่ภายในบรรจุสารที่มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ (Snyder and Kirkland ,1979)

จาก UV สเปกตรัมของไนเฟดิพีนในเมทานอล แสดงถึงการดูดกลืนแสง UV สูงสุดที่ 236-238 นาโนเมตร ดังนั้น ในสภาวะการทดลองทาง HPLC จึงทำการตรวจหาตัวยาที่ความยาวคลื่น 236 นาโนเมตร อย่างไรก็ตาม ลักษณะโครมาโทแกรมที่ได้จากการตรวจหาตัวยาที่ 236 นาโนเมตรนั้น จะมี Base Line ไม่เรียบ จึงทำการศึกษาเพื่อเลือกความยาวคลื่นที่ตัวยาแสดงการดูดกลืนแสงสูง และมี Base Line ที่เรียบ เพื่อใช้เป็นความยาวคลื่นของ Detector ของ HPLC ต่อไป โดยจะพิจารณาจาก

- ความเรียบของ Base Line
- ความสูงของพีคของยา

ตามรายงานจากวารสารต่างประเทศที่มีการวิเคราะห์ไนเฟดิพีน โดยใช้เทคนิค Reverse-phase HPLC นั้น Mobile Phase ที่ใช้มักจะประกอบด้วยส่วนที่เป็นบัฟเฟอร์ และ Organic Modifier ต่างๆ เช่น เมทานอล, แอซีโตไนไตร์ล เป็นต้น บัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ Mobile Phase เท่าที่ปรากฏอย่างเด่นชัดในรายงานเหล่านั้น มีอยู่ 2 ชนิด คือ อะซีเตทบัฟเฟอร์ (Kleinbloesem and Harten,1984; Nitche et al., 1987) และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Bach 1983; Gurley et al., 1985; Huebert et al.,1986; Miyazaki et al., 1984; Pietta et al., 1981; Snedden, Fernandez, Galway et al., 1984; Snedden, Fernandez, and Nath, 1986; Suzuki et al.,1985)

การศึกษานี้ทดลองใช้แอมโมเนียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ จากการที่แอมโมเนียมอะซีเตทเป็นเกลือที่ระเหยได้ง่าย และละลายในน้ำได้ดี โอกาสที่จะมีการสะสม หรือ ตกค้างของเกลือบัฟเฟอร์ชนิดนี้ จึงน้อยกว่าเกลือบัฟเฟอร์ชนิดอื่นๆ จึงมักจะถูกนำไปใช้ใน Preparative HPLC และ LC-MS แอมโมเนียมอะซีเตท ยังเป็นเกลือที่ถูกแนะนำเป็นเกลือบัฟเฟอร์ที่ใช้ในวัตถุประสงค์ทั่วไปสำหรับ Reverse-Phase HPLC (Law and Chan, 1991) และจากการที่ มีรายงานบางส่วนที่ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นส่วนประกอบของ Mobile Phase ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบบัฟเฟอร์ 2 ชนิด คือ แอมโมเนียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในด้านต่างๆ เพื่อที่จะเลือกเป็นบัฟเฟอร์ที่เป็นส่วนประกอบของ Mobile Phase ที่จะใช้ในการศึกษาต่อไป ดังนี้ :-

1. ลักษณะพีคของไนเฟดิพีน
2. ลักษณะของ Base Line

3. ความคงที่ของ Retention Time ของไนเฟดิพีน เมื่อทำการวิเคราะห์ในช่วงเวลาหนึ่งๆ

วิธีการ การเตรียมสารละลายไนเฟดิพีนของเมทานอล :-

ก. เตรียมสารละลายของไนเฟดิพีนในเมทานอล ความเข้มข้น 500 มคก./มล. โดยการชั่งไนเฟดิพีนมาตรฐาน อย่างถูกต้องแม่นยำ 25.0 มก. ละลายด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรให้ครบ 50 มล. ในฟลาสค์ปรับปริมาตร สารละลายนี้จะเตรียมใหม่ทุกๆ 1 สัปดาห์

ข. นำสารละลายของไนเฟดิพีนในเมทานอลจากข้อ ก. มาเจือจางด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 4.0 มคก./มล.

การเตรียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.1 ความเข้มข้น 1×10^{-2} โมลาร์

ชั่งแอมโมเนียมอะซีเตท จำนวน 0.7708 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ประมาณ 980 มล. นำไปปรับ pH ให้ได้ 6.10 ด้วยกรดอะซีติก 2 % ในน้ำแล้วจึงปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่นในฟลาสค์ปรับปริมาตร

การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.1 ความเข้มข้น 1×10^{-2} โมลาร์

ชั่งไดโพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ปราศจากน้ำมา 1.4198 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ประมาณ 980 มล. นำไปปรับ pH ให้ได้ = 6.1 ด้วยกรดฟอสฟอริกเจือจาง แล้วจึงปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่นในฟลาสค์ปรับปริมาตร

018664

<u>สภาวะทางโครมาโทกราฟี</u> :-

โครมาโทกราฟิกคอลัมน์ :- คอลัมน์ขนาดความยาว 25 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.6 มม. บรรจุด้วย Spherisorb ODS 2 ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน

การ์ดคอลัมน์ :- คอลัมน์ขนาดความยาว 5 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.0 มม. บรรจุด้วย Bondapak® C_{18}/Coracil ขนาดอนุภาค 37-50 ไมครอน

Mobile Phase :- อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.1:เมทานอล = 38:62

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.1:เมทานอล =38:62

(สำหรับการศึกษาคัดเลือกความยาวคลื่น ใช้อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.1:เมทานอล = 38:62)

Detector :- UV 247 นาโนเมตร

(สำหรับการศึกษาคัดเลือกความยาวคลื่น จะตรวจหาที่ 236, 247, 250, และ 358 นาโนเมตร)

อัตราการไหล (Flow Rate) :- 1.0 มล. / นาที

ปริมาตรสารที่ฉีดต่อตัวอย่าง

(Injection Volume) :- 20 มคล.

ส่วนที่2 การศึกษาทดลองวิธีการต่างๆที่จะทำให้ได้ตัวอย่างพลาสมาที่สะอาดมากพอที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทาง HPLC ได้

การที่จะทำให้ได้ตัวอย่างพลาสมาที่พร้อมที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยHPLC นั้น จะมีหลักการเลือกวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมที่สุด จาก

1. ลักษณะโครมาโทแกรมที่ได้ไม่ควรมีการรบกวนของ Endogenous Substance ที่มีอยู่ในพลาสมา

2. มีประสิทธิภาพของการแยกตัวยาเป็นที่ยอมรับได้ โดยคำนวณเป็นเปอร์เซนต์การกลับคืนของตัวยาที่ผ่านขั้นตอนการแยกจากพลาสมากับที่ฉีดเข้า HPLC โดยตรง ดังนี้ :-

$$\text{เปอร์เซนต์การกลับคืนของสาร} = \frac{PH_1 \times 100}{PH_2} \quad \ldots\ldots\ldots(1)$$

เมื่อ PH_1 เป็นความสูงของพีคของสารที่แยกจากตัวอย่างพลาสมา

PH_2 เป็นความสูงของพีคของสารในสารละลายมาตรฐาน

3. ขั้นตอนการทำไม่ยุ่งยาก

4. ไม่ใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างมากเกินไป

5. ไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย

การศึกษาครั้งนี้จะใช้หลักการการแยกพลาสมาโปรตีน ออกจากตัวอย่างพลาสมาดูก่อน ถ้าไม่ได้ผลดี จึงจะใช้หลักการการแยกตัวยาออกจากตัวอย่างพลาสมา

2.1 การแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา

2.1.1 การแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาในการศึกษานี้จะใช้ Miscible Organic Solvent ได้แก่ เมทานอล และแอซีโตไนไตรล์ ซึ่งสารทั้งสองตัวนี้เป็นสารที่นิยมใช้เป็นส่วนประกอบของ Mobile Phase ที่ใช้ใน Reverse Phase HPLC ขั้นตอนวิธีการทดลองเป็นดังนี้คือ:-

ผสมพลาสมา 0.5 มล. กับ สารละลายไนเฟดิพีนในเมทานอลจำนวน 20 มคล. (= 240.0 นาโนกรัม/มล.พลาสมา) ในหลอดทดลองฝาเกลียว

↓

เติมเมทานอล หรือแอซีโตไนไตรล์ จำนวน 2.0 มล., วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 2,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

↓

นำสารละลายส่วนใสในชั้นบนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยง มาฉีดเข้าHPLC จำนวน 20 มคล. โดยใช้สภาวะการทดลองที่ได้จากการทดลองในข้อ 1.2 (ใช้Mobile Phaseเป็นอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.1 ความเข้มข้น 0.01โมลาร์ :เมทานอล ในอัตราส่วน 38:62)

2.1.2 การทดลองสกัดแยก Endogenous Substance ที่อยู่ในตัวอย่างพลาสมาออกด้วยเฮกเซน ก่อนที่จะตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล และ แอซีโตไนไตรล์

จากการที่ Endogenous Substance ที่ปรากฏอยู่ในตัวอย่างพลาสมานั้นมักจะเป็นสารที่มีคุณสมบัติไม่มีขั้ว (Non-Polar) ดังนั้นถ้าสกัดแยกสารเหล่านี้ออกก่อนด้วยเฮกเซน ซึ่งมีคุณสมบัติไม่มีขั้วเช่นกันแล้ว อาจจะทำให้ตัวอย่างพลาสมามีความสะอาดมากขึ้นได้ ซึ่งมีขั้นตอนวิธีการทดลองเป็นดังนี้ คือ :-

ผสมพลาสมา 0.5 มล.กับสารละลายไนเฟดิพีนในเมทานอล จำนวน 20 มคล. (= 240.0 นาโนกรัม/มล.พลาสมา) ในหลอดทดลองฝาเกลียว

↓

เติม เฮกเซน 1.0 มล.,วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที

↓

ดูดชั้น เฮกเซน ซึ่งเป็นชั้นใสส่วนบนทิ้งไป แล้วจึงเติมเมทานอล หรือแอซีโตไนไตรล์ จำนวน 2.0 มล. ลงในสารผสมที่เหลือ ,วอร์เทกซ์ นาน 20 วินาที

↓

เหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

↓

นำสารละลายใสชั้นบนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยง มาฉีดเข้า HPLC จำนวน 20 มคล. โดยใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1

2.1.3 การใช้สารละลายอนินทรีย์ที่มีประจุร่วมกับเมทานอล หรือแอซีโตไนไตร์ลในการตกตะกอนพลาสมาโปรตีน

สารละลายอนินทรีย์ที่มีประจุที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ ซิงค์ซัลเฟตซึ่งจะให้ประจุบวกในการจับกับส่วนที่แสดงประจุลบบนพลาสมาโปรตีน พลาสมาโปรตีนจึงอาจถูกดึงออกจากตัวอย่างพลาสมาได้

วิธีการ การเตรียมสารละลายซิงค์ซัลเฟต 10 % ในน้ำ :-

ชั่งซิงค์ซัลเฟตแอนไฮดรัสมาอย่างถูกต้อง 10 กรัม ละลาย และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. ด้วยน้ำกลั่นในฟลาสค์ปรับปริมาตร

ผสมพลาสมา 0.5 มล.กับสารละลายไนเฟดิพีนกับเมทานอล จำนวน 20 มคล.(= 240.0 นาโนกรัม/มล.พลาสมา) ในหลอดทดลองฝาเกลียว

↓

เติมสารละลายซิงค์ซัลเฟต 10 %ในน้ำ จำนวน 0.1 มล.,วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เติมเมทานอล หรือแอซีโตไนไตรล์ จำนวน 1.0 มล.,วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

↓

นำสารละลายใสชั้นบนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยง มาฉีดเข้า HPLC

จำนวน 20 มคล. โดยใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1

2.1.4 การใช้ยูเรียแปลงสภาพ (Denature) พลาสมาโปรตีนก่อนแล้วจึงตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล หรือ แอซีโตไนไตร์ล

อาศัยหลักการที่ว่าสารละลายยูเรียเข้มข้น 8.0 โมลาร์ จะทำให้พลาสมาโปรตีนมีลักษณะผิดไปจากธรรมชาติของมันซึ่งอาจจะมีผลทำให้การจับของพลาสมาโปรตีนกับไนเฟดิพีน ซึ่งเกิดขึ้นอย่างเหนียวแน่นนั้นสั่นคลอนลงหรือเสียไป ซึ่งเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนออกโดย การตกตะกอนพลาสมาโปรตีนแล้วจะทำให้ตัวอย่างมีความสะอาดพอที่จะนำมาฉีดเข้า HPLC ได้

วิธีการ การเตรียมสารละลายยูเรียในน้ำความเข้มข้น 8.0 โมลาร์ :-

ชั่งยูเรียอย่างถูกต้องจำนวน 24 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น (ใช้แท่งแก้วช่วยคนด้วย เพื่อช่วยให้ละลายเร็วขึ้น) ปรับปริมาตรให้ครบ 50 มล. ด้วยน้ำกลั่น ในฟลาสค์ปรับปริมาตร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผสมพลาสมา 0.5 มล.กับสารละลายไนเฟดิพีนกับเมทานอล จำนวน 20 มคล. (= 240.0 นาโนกรัม/มล.พลาสมา) ในหลอดทดลองฝาเกลียว

↓

เติมสารละลายยูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์ จำนวน 1.0 มล.,วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เติมเมทานอล หรือแอซีโตไนไตรล์ จำนวน 2.0 มล.,วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

↓

นำสารละลายใสชั้นบนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยง มาฉีดเข้า HPLC จำนวน 20 มคล. โดยใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1

2.2 การแยกตัวยาออกจากตัวอย่างพลาสมา

เนื่องจากการใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีนที่กล่าวมาทั้งหมดไม่สามารถวิเคราะห์ไนเฟดิพีนได้ดี จึงได้ใช้หลักการ Liquid-Liquid Extraction โดยใช้ตัวทำละลายที่สามารถละลายตัวยาได้ดี หรือสารผสมของตัวทำละลายต่างๆ ในการสกัดตัวยา ตัวทำละลายที่เลือกมาทดลองใช้ควรมีคุณสมบัติไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำ (Immiscible) และมีจุดเดือดไม่สูงมากนัก เพื่อให้ระเหยตัวทำละลายออกได้ง่าย

2.2.1 การทดลองเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (Distribution Coefficient) ของไนเฟดิพีนในตัวทำละลายต่างๆ

ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (Distribution Coefficient, D) เป็นอัตราส่วนของความเข้มข้นของตัวยาที่ภาวะสมดุลย์ระหว่างชั้นตัวทำละลายอินทรีย์กับชั้นน้ำ ซึ่งค่านี้จะมีประโยชน์ในการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดตัวยาออกจากของเหลวชีวภาพ

ตัวทำละลายที่เลือกมาทดลองสกัดไนเฟดิพีน ได้แก่ เอทิลอะซีเตท (EA), คลอโรฟอร์ม (CF), ส่วนผสมของแอซีโตไนไตรล์ (ACN) และ เอทิลอะซีเตท อัตราส่วน 1:3 (ACN:EA=1:3), ส่วนผสมของอะซีโตไนไตรล์และคลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 1:3 (ACN:CF=1:3)

การนำแอซีโตไนไตรล์ มาเป็นตัวทำละลายที่ใช้ร่วมกับ EA หรือ CF เนื่องจากอาศัยหลักการที่ ACN มีคุณสมบัติตกตะกอนพลาสมาโปรตีนได้ด้วย ซึ่งน่าจะทำให้ตัวอย่างพลาสมาสะอาดมากขึ้นได้ และเลือกใช้อัตราส่วน ACN:EA หรือ CF = 1:3 ซึ่ง ACN จะผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับ EA หรือ CF ได้ทุก ๆ อัตราส่วนนั้น จากการที่การศึกษาครั้งนี้ต้องการนำสารละลายยูเรียมาใช้ในขั้นตอนการสกัดด้วย และอัตราส่วนที่ทำให้ สารละลายยูเรีย พลาสมา และส่วนผสมของ ACN:EA เกิดการผสมกันแล้วแยกเป็นสองชั้นคือ สารละลายยูเรีย 1 ส่วน ACN 1 ส่วน EA 3 ส่วน ถ้าอัตราส่วนที่ใช้ไม่เป็นดังนี้จะทำให้ส่วนผสมของสารละลายยูเรีย พลาสมา และ ส่วนผสมของ ACN:EA แยกเป็น 3 ชั้น และเมื่อทดลองใช้ ACN ผสมกับ CF ในอัตราส่วน=1:3 นำมาผสมรวมกับสารละลายยูเรียเข้มข้นและพลาสมา ผลการแยกชั้นก็เป็น 2 ชั้นเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ ยังได้ทำการศึกษาถึงการกระจายตัวของตัวยาระหว่างชั้นน้ำที่มีสภาพเป็นกรดหรือด่างกับชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งในที่นี้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ คือ ส่วนผสมของ ACN:EA=1:3 เพื่อให้ทราบถึงผลของสภาวะที่เป็นกรด หรือด่างต่อการกระจายตัวของไนเฟดิพีน ซึ่งจะสามารถนำ

ไปใช้ในการพัฒนาวิธีการแยกตัวยาออกจากตัวอย่างพลาสมาต่อไป

ก. การเตรียมสารละลายต่างๆ

ค่าการละลายในน้ำของไนเฟดิพีนตามรายงาน คือ ประมาณ 8 µg/ml (Schmid B.J. et al,1988)และ 11 µg/ml (Sugimoto et al,1980) ดังนั้น จึงเตรียมสารละลายไนเฟดิพีนในน้ำความเข้มข้น 8.0 มคก./มล. โดยชั่งไนเฟดิพีนมาตรฐานจำนวน 16.0 มก. อย่างแม่นยำละลายในน้ำและปรับปริมาตรให้ครบ 2,000 มล. ด้วยน้ำกลั่นในฟลาสค์ปรับปริมาตร

สำหรับสารละลายไนเฟดิพีน ในน้ำที่มีสภาวะเป็นกรด หรือด่างเตรียมตามวิธีการดังกล่าว เพียงแต่ละลาย และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปรับ pH ประมาณ 2 ด้วยกรดฟอสฟอริก หรือ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปรับpH ประมาณ 9 ด้วยโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ ตามลำดับ

ข. วิธีการทดลอง

ปิเปตสารละลายไนเฟดิพีนในน้ำ 20 มล. ใส่ลงใน Separatory Funnel ขนาด 125 มล. เติมตัวทำละลายที่จะใช้สกัดจำนวน 20 มล. ลงไปโดยการปิเปตได้แก่ EA , CF , ACN-EA = 1:3 , ACN-CF = 1:3 สกัดโดยเขย่าสารผสมจนถึงภาวะสมดุล (การเกิดสภาวะสมดุล นี้ดูได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตรของชั้นน้ำที่เวลา 5,15,20,30 นาที หลังจากการเขย่าสารผสมเมื่อเกิดภาวะสมดุลย์แล้วค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่าง ๆ จะมีค่าคงที่) วัดค่าการดูดกลืนแสงของชั้นน้ำที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร

การคำนวณสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (Smith and Stewart, 1981)

$$\text{ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว} = \frac{C_{org}}{C_{aq}} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots (2)$$

เมื่อ C_{org} และ C_{aq} เป็นความเข้มข้นของยาในตัวทำละลายอินทรีย์ และชั้นน้ำตามลำดับ

2.2.2 การกำหนดปริมาตรที่เหมาะสมของสารสกัดในการสกัดไนเฟดิพีน

ทำการทดลองใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ได้กล่าวมาแล้วในการสกัดพลาสมาที่ไม่มีตัวยา (Plasma Blank) ว่าพลาสมาจะสะอาดเพียงใด โดยเปรียบเทียบการสกัดตัวยาด้วยสารสกัดต่าง ๆ ที่ได้หาค่า D ไว้แล้วเพื่อคัดเลือกเอาเฉพาะสารสกัดที่เหมาะสมที่สุด และทำการเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาตรของสารสกัดที่เหมาะสมในการสกัดแยกไนเฟดิพีน

ประสิทธิภาพของการสกัดได้ถูกเปรียบเทียบระหว่างการสกัด 1 ครั้งด้วยสารสกัดจำนวน 4 มล. และการสกัด 2 ครั้งด้วยสารสกัดครั้งละ 2 มล. การกำหนดปริมาตรของสารสกัดเป็น 4 มล. เพื่อความสะดวกในการคิดเทียบการสกัด 1 ครั้ง กับการสกัด 2ครั้ง โดยที่ใช้ปริมาตรสารสกัดแต่ละครั้งเพียงครึ่งหนึ่งของการสกัด 1 ครั้ง ปริมาตรสารสกัดที่มากไปกว่านี้ จะทำให้เสียเวลาในขั้นตอนการระเหยสารสกัดออก

วิธีการ

นำ แบลงค์พลาสมา 0.5 มล. มาเติมสารสกัดจำนวน 4.0 มล. วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

↓

ปิเปตชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ (อยู่ชั้นบนเมื่อสกัดด้วยสารสกัด EA, อยู่ชั้นล่าง เมื่อสกัดด้วยสารสกัด CF) จำนวน 3.0 มล. ใส่ลงในหลอดทดลองใหม่

↓ *

ระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้กระแสของแก๊สไนโตรเจน

↓

ละลายสารที่เหลือจากการระเหยด้วยเมทานอล จำนวน 200 มคล.

↓

ฉีดสารละลายที่ได้จำนวน 20 มคล. เข้า HPLC โดยใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1

* กรณีสกัด 2 ครั้ง จะเติมสารสกัดลงในหลอดเดิม และ ทำการสกัดเหมือนครั้งแรก แยกชั้นตัวทำละลายอินทรีย์รวมกับที่ได้จากครั้งแรก ทำตามขั้นตอนข้างต้น

2.3 การคัดเลือกวิธีการแยกไนเฟดิพีนออกจากตัวอย่างพลาสมา

จากผลการศึกษาในข้อ 2.1 และ 2.2 จะทำให้ทราบถึงส่วนดีของแต่ละวิธีการ ซึ่งจะนำส่วนดีนั้นมารวบรวมเข้าด้วยกัน เพื่อสร้างเป็นกระบวนการวิเคราะห์ตัวยาไนเฟดิพีนในพลาสมาได้ต่อไป จากผลการศึกษาในข้อ 2.1 นั้นทำให้ทราบว่าการสกัด Endogenous Substance ในพลาสมาออกด้วย เฮกเซน จะช่วยทำให้ตัวอย่างพลาสมาสะอาดมากขึ้น สำหรับยูเรียนั้นแม้ว่าจะไม่ได้ช่วยทำให้ตัวอย่างพลาสมาสะอาดมากขึ้นในการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนก็ตาม แต่ในแง่ที่จะทำให้พลาสมาโปรตีนจับกับตัวยาได้อ่อนลงหรือเสียไป เพื่อให้ตัวยาหลุดออกมาในตัวอย่างก่อนสกัดได้มากขึ้น ก็เป็นที่น่าสนใจ และจากผลการศึกษาในข้อ 2.2 นั้น มีแนวโน้มว่าในสภาวะที่เป็นด่าง จะช่วยทำให้ตัวยาสามารถถูกสกัดเข้าไปในชั้นของสารสกัดได้ดีขึ้น และ % ที่สารถูกสกัดทั้งหมด ที่คำนวณได้ (% Total Extracted)ใน EA ที่มีค่าสูงพอที่จะยอมรับได้ (92.92 %) ประกอบกับลักษณะโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมาที่ได้จากการสกัดด้วย EA 1 ครั้ง ที่มีการรบกวนจาก Endogenous Substance น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบลักษณะโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมาที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการอื่น ๆ ที่ศึกษา EA จึงถูกเลือกเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาในขั้นตอนนี้ การศึกษานี้จึงได้ทำการสกัดตัวอย่างพลาสมาด้วย EA โดยมีการปรับสภาวะต่างๆ ก่อนที่จะสกัด แล้วเปรียบเทียบกันเพื่อให้ได้กระบวนการสมบูรณ์ ในการวิเคราะห์ไนเฟดิพีนในตัวอย่างพลาสมาที่เหมาะสมที่สุด โดยจะทำการวิเคราะห์ตัวอย่างไนเฟดิพีนในพลาสมา ด้วยการ :-

ก. สกัดด้วย EA จำนวน 4 มล. 1 ครั้ง

ข. ทำให้ตัวอย่างพลาสมามีความเป็นด่าง ด้วยโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ก่อนแล้วจึงสกัดด้วย EA

ค. ใช้ เฮกเซน สกัด Endogenous Substance ออกบางส่วนก่อน แล้วจึงสกัดด้วย EA

ง. ใช้ยูเรียแปลงสภาพพลาสมาโปรตีนก่อนแล้วจึงสกัดด้วย EA

จ. ทำให้ตัวอย่างพลาสมามีความเป็นด่าง และแปลงสภาพพลาสมาโปรตีนก่อน แล้วจึงสกัดด้วย EA

เปรียบเทียบลักษณะโครมาโทแกรมที่ได้ และลักษณะพีคของตัวยาที่ได้จากวิธีการต่าง ๆ ดังกล่าว ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้ :-

การเตรียมสารละลายกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 0.83 โมลาร์ :-

น้ำหนักโมเลกุลของ Orthophosphoric acid (H_3PO_4) = 98.00 และความถ่วงจำเพาะ = 1.75 ดังนั้นจึงต้องนำ H_3PO_4 มา 2.0335 กรัม หรือ 1.162 มล. แล้วละลาย และปรับปริมาตรให้ครบ 25 มล. ด้วยน้ำกลั่นในฟลาสค์ปรับปริมาตร

การเตรียมสารละลายโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ :-

ชั่งโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์มาอย่างถูกต้อง 11.22 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 200 มล. ด้วยน้ำกลั่นในฟลาสค์ปรับปริมาตร

การเตรียมสารละลายยูเรียเข้มข้น 8.0 โมลาร์ :-

เตรียมโดยวิธีการเดียวกับข้อ 2.1.4

วิธีทดลอง

วิธีการ ก.

ผสมพลาสมา 0.5 มล.กับสารละลายไนเฟดีพีนในเมทานอล จำนวน 20 มคล.(= 160.0 นาโนกรัม/มล.พลาสมา)ในหลอดทดลองฝาเกลียว

↓ **

เติม EA 4.0 มล.,วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

↓

ปิเปตตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งอยู่ชั้นบนมาจำนวน 3.5 มล.ใส่ลงในหลอดทดลองใหม่

↓

ระเหยตัวทำละลายออก โดยใช้กระแสของแก๊สไนโตรเจน

↓

ละลายสารที่เหลือจากการระเหยด้วยเมทานอล จำนวน 200 มคล.

↓

ฉีดสารละลายที่ได้จำนวน 20 มคล. เข้า HPLC โดยใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1

** วิธีการ ข. ให้เติมสารละลายโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์1.0โมลาร์ จำนวน 0.6 มล. วอร์เทกซ์นาน 15 วินาที แล้วทำตามขั้นตอนต่อไปในวิธีการ ก

** วิธีการ ค. เติมสารละลายกรดฟอสฟอริค 0.83 โมลาร์ จำนวน 0.5 มล. วอร์เทกซ์นาน 15 วินาที แล้วจึงเติมเฮกเซนจำนวน 1.0 มล. วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 2000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งชั้นเฮกเซนซึ่งอยู่ชั้นบนไป โดยการใช้ disposable pasteur pipet ต่อจากนั้นเติมสารละลายโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ จำนวน 0.6 มล. ลงในชั้นพลาสมา วอร์เทกซ์นาน 15 วินาที แล้วทำตามขั้นตอนต่อไปในวิธีการ ก

** วิธีการ ง. เติมสารละลายยูเรีย 8.0โมลาร์ จำนวน 1.0 มล. วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที แล้วทำตามขั้นตอนต่อไปในวิธีการ ก

** วิธีการ จ. เติมสารละลายโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 1.0โมลาร์ จำนวน 0.6 มล. วอร์เทกซ์นาน 15 วินาที แล้วเติมสารละลายยูเรีย 8.0 โมลาร์ จำนวน 1.0 มล. วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที แล้วทำตามขั้นตอนต่อไปในวิธีการ ก

ส่วนที่ 3 การคัดเลือก Internal Standard ที่เหมาะสม และ สรุปวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมา

การวิเคราะห์ไนเฟดิพีนในพลาสมาโดยเทคนิคทาง HPLC นั้น ควรจะใช้ Internal Standard (IS) ที่เหมาะสม เพื่อที่จะควบคุมความแปรปรวนต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นในระหว่างการสกัด หรือ การสูญเสียตัวยาจาก Oxidation หรือ Hydrolysis ในกระบวนการเตรียมตัวอย่าง มีสารหลายตัวที่ถูกนำมาใช้เป็น IS สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนที่

ปรากฏอยู่ในวารสารต่าง ๆ เช่น ไดอะซีแพม (Diazepam) (Dokladova et al 1982; Jakobsen, Pedersen, and Mikkelsen 1979; Hamann and Mc Allister 1983),4-ไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (4-Dimethyl-aminobenzaldehyde) (Pietta, Rova, and Biondi 1981), สารประกอบไดเอทิลเอสเตอร์ของ Dehydronifedipine (Diethyl ester homologue of Dehydronifedipine) (Kleinbloesem and Harten 1984; Kondo et al 1980; Suzuki et al 1985),ไตรฟลูเพอริดอล (Trifluperidol) (Testa et al 1979), ไนเทรนดิพีน (Nitrendipine) (Patrick et al 1989; Rosseel and Bogaert 1983; Schmid , Perry and Idel 1988; Snedden, Fernandez, and Nath 1986; Tucker, Minty, and MacGregor 1985), แอลฟาแนพทอล (α-Naphthol) (Sadanaga et al 1982), 11- คีโตโปรเจสเตอโรน (11-Ketoprogesterone) (Bach 1983), บิวแทมเบน (Butamben)(Miyazaki et al 1984), SQ 29987 (Sheridan, Clark, and Robinson 1989), เมทิลไนทราซีแพม (Methylnitrazepam)(Tanner, Romagnoli,and Kramer 1986), หรือบางรายงานก็ไม่มีการใช้ IS (Akira, Baba and Aoki 1988 ; Nitsch, Schutz, and Eichinger 1987)

ในทางทฤษฎีนั้น สารที่มีคุณสมบัติเป็น IS ที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้ (Smith and Stewart 1981) :-

1. ไม่เป็นสารที่อาจพบอยู่ในตัวอย่างที่จะวิเคราะห์
2. ต้องมีคุณสมบัติการรีเทนที่ใกล้เคียงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์
3. มีคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีใกล้เคียงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์
4. สามารถแยกออกจากพีคของสารอื่นๆทั้งหมดในโครมาโทแกรมได้ดี

ในการศึกษานี้ จะพิจารณาจากสารต่าง ๆ ที่ถูกนำมาใช้เป็น IS ดังกล่าวแล้ว เลือกทดลองใช้สารที่มีคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีใกล้เคียงกับไนเฟดิพีน และสามารถหามาได้ พร้อมทั้งมีความบริสุทธิ์ สารเคมีที่มีคุณสมบัติดังกล่าว เท่าที่สามารถหาได้มี 4 ตัว คือ 4 - ไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (IS_1), ไดอะซีแพม (IS_2), ไนเทรนดิพีน (IS_3) และ บิวแทมเบน (IS_4) คุณสมบัติและสเปคตรัมการดูดกลืนแสงช่วง UV ของสาร IS_1, IS_2, IS_3 และ IS_4 ดังแสดงในภาคผนวก นำสารทั้ง 4 ตัวที่เลือกมานี้ มาศึกษาถึงความสามารถในการแยกออกจากตัวยา เมื่อใช้สภาวะทางโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 1.2 สารที่มีการรีเทนใน HPLC คอลัมน์ใกล้เคียงกับไนเฟดิพีน และสามารถแยกจากพีคของยาได้ ในระยะเวลาที่ไม่มากเกินไป จะถูกเลือกนำมาทดลองต่อไปเพื่อใช้เป็น IS แต่ถ้าสารทั้ง 4 ตัวที่กล่าวมานี้ให้ผลการศึกษาที่ไม่ดี จะพิจารณาสารอื่นๆ เพื่อนำมาศึกษาอีกต่อไป

<u>วิธีการ</u>

การเตรียมสารละลายของInternal standard ในเมทานอล:-

ก. ชั่ง 4-ไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (IS_1) หรือ ไดอะซีแพม (IS_2) หรือไนเทรนดิพีน (IS_3) หรือ บิวแทมเบน (IS_4) มาตรฐานมาอย่างถูกต้องแม่นยำ อย่างละ 25.0 มก. ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 50 มล. ด้วยเมทานอลในฟลาสค์ปรับปริมาตร (ความเข้มข้น = 1.0 มก./มล.)

ข. ปิเปตส่วนหนึ่งของสารละลาย IS_1 หรือ IS_2 หรือ IS_3 หรือ IS_4 ในเมทานอลที่ได้ นำมาเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสม ซึ่งพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสง (Absorptivity) ของสารที่ความยาวคลื่นของ Detector คือ 247 นาโนเมตร ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IS_1, IS_2, IS_3, IS_4 คือ 10.0, 3.0, 6.0, 12.0 มคก./มล.ของเมทานอล ตามลำดับ

การศึกษาการแยกของสารที่จะนำมาใช้เป็น IS ในการวิเคราะห์ไนเฟดิพีน

ใช้วิธีการที่เห็นว่าเหมาะสมที่สุด (วิธีการจาก ข้อ 2.3) ในการสกัดแยกไนเฟดิพีนออกจากตัวอย่างพลาสมา โดยที่เติม IS_1 หรือ IS_2 หรือ IS_3 หรือ IS_4 ลงในพลาสมา และทำการสกัดตามวิธีการดังกล่าว และใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1

ส่วนที่ 4 การ Validate วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้

วิธีวิเคราะห์ในพลาสมาที่พัฒนาได้จะต้องผ่านขั้นตอนการ Validate ต่าง ๆ ต่อไปนี้ จึงจะเป็นที่ยอมรับและนำไปใช้ได้ ดังนี้ :-

4.1 การศึกษา Linearity

คือ การศึกษาความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนความสูงพีคของตัวยา ต่อ ความสูงพีคของ IS หรือ อัตราส่วนพื้นที่ของพีคยา ต่อ พื้นที่พีค IS กับ ความเข้มข้นของยาในพลาสมา

4.1.1 การเลือกใช้ค่าของ อัตราส่วนความสูงของพีคยา ต่อ IS (Peak Height Ratio, PHR) หรือ ค่าอัตราส่วนพื้นที่ของพีคยา ต่อ IS (Peak Area Ratio, PAR)

จากโครมาโทแกรมที่ศึกษาทดลองผ่านมานั้น ลักษณะพีคของไนเฟดิพีนและบิวแทมเบน ที่ได้มีความสมมาตร แคบ ซึ่งตามหลักการทางโครมาโทกราฟีแล้ว สามารถที่จะใช้ได้ทั้งค่า PHR หรือ PAR (Snyder and Kirkland, 1979) การศึกษานี้ ได้ทำการทดลองคัดเลือกการใช้ค่า PHR หรือ PAR โดยเตรียมตัวอย่างพลาสมาที่เติม (Spike) ไนเฟดิพีนลงไปให้มีความเข้มข้นในช่วงเดียวกัน กับ ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในกราฟมาตรฐาน และวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น ทำซ้ำในลักษณะเดียวกันอีก 3 ตัวอย่าง

คำนวณค่า PHR หรือ PAR ระหว่างไนเฟดิพีนและบิวแทมเบน และคำนวณเป็นค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation) ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ทำการศึกษา คือ ที่ 40.0, 80.0, 160.0 , และ 240.0 นาโนกรัม/มล. ของพลาสมา

4.1.2 การศึกษาความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่าง PHR กับ ความเข้มข้นของยา

จากผลการศึกษาในข้อ 4.1.1 ค่า PHR ได้ถูกคัดเลือกมาใช้

วิธีการทดลอง :-

วิเคราะห์พลาสมาที่เติมไนเฟดิพีน ในความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่จะตรวจพบไนเฟดิพีนในร่างกาย การศึกษานี้ได้ใช้ทั้งหมด 7 ความเข้มข้น ได้แก่ 7.0, 10.0, 40.0, 80.0, 120.0,160.0 และ 240.0 นาโนกรัม/มล.ของพลาสมา และ แบลงค์พลาสมา ตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้ พลอตหาความสัมพันธ์ระหว่าง อัตราส่วนความสูงพีคของไนเฟดิพีน ต่อ ความสูงพีคของ บิวแทมเบน (Peak Height Ratio, PHR) กับ ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา

4.2 การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ ที่จะสามารถตรวจพบปริมาณต่ำสุดของไนเฟดิพีนในตัวอย่างพลาสมา

การทดลองหาปริมาณต่ำสุดของไนเฟดิพีน ที่จะตรวจพบได้ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นมา โดยอาศัยหลักที่ว่า ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารที่ถือว่ายังสามารถตรวจพบได้ จะต้องให้สัญญาณของสารอย่างน้อยเป็น 2 เท่าของสัญญาณรบกวนปกติของการวิเคราะห์ (Signal to Noise Ratio; S/N $\geq$ 2:1)(Smith and Stewart, 1981) ซึ่งจะคำนวณโดยใช้อัตราส่วนของครึ่งหนึ่งของความสูงพีคยา (หน่วยเป็น มม.) กับ ครึ่งหนึ่งของความสูงของ

สัญญาณรบกวน (noise, หน่วยเป็น มม.)

วิธีการทดลอง :-

ก. ศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่จะตรวจพบได้ โดยการเตรียมตัวอย่างพลาสมา ให้มีความเข้มข้นของไนเฟดิพีน = 12.0 , 11.0 , 10.0, 9.0, 8.0, และ 7.0 นาโนกรัม/มล. แล้ววิเคราะห์ตามวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ใช้ความเข้มข้นต่ำสุดที่จะยังให้ค่าอัตราส่วนครึ่งหนึ่งของความสูงพีคยาต่อครึ่งหนึ่งของความสูงของสัญญาณรบกวน ไม่น้อยกว่า 2:1 เมื่อใช้ Attenuation ต่ำสุดของเครื่องบันทึก

ข. ทำการทดลองซ้ำ โดยใช้ความเข้มข้นนั้น อีก 6 ตัวอย่าง เพื่อหาสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

4.3 การศึกษาความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ของวิธีวิเคราะห์

ความจำเพาะเจาะจง จะดูจาก Retention Time ของไนเฟดิพีน และ บิวแทมเบน เมื่ออยู่ในตัวทำละลายเมทานอล กับ เมื่ออยู่ในพลาสมา และ ผ่านกระบวนการวิเคราะห์ตามที่พัฒนาได้ รวมทั้งเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา, โครมาโทแกรมของพลาสมา ที่มีเฉพาะบิวแทมเบน และ โครมาโทแกรมของพลาสมาเมื่อมีทั้งตัวยา และบิวแทมเบน เพื่อพิจารณาถึงการรบกวนของสารอื่น ๆ ที่อาจจะมีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมา

4.4 การศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสารซึ่งแสดงในเทอมของเปอร์เซนต์ของการกลับคืนของสาร

เป็นการศึกษาถึงประสิทธิภาพของขั้นตอนการสกัดตัวยา ที่ได้พัฒนาขึ้น โดยการวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีน และ บิวแทมเบน ที่ถูกเติม (Spike) ลงไปในพลาสมาในความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับการวิเคราะห์ไนเฟดิพีน และบิวแทมเบน ในสารละลายมาตรฐาน ที่มีปริมาณเท่ากับปริมาณที่

1179900

เติมลง (Spike) ในพลาสมา แต่ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัด

วิธีการทดลอง :-

ก. Spike สารละลายไนเฟดิพีนในเมทานอล ลงในพลาสมา 0.5 มล. ให้มีความเข้มข้นของไนเฟดิพีน = 7.0, 10.0, 40.0, 80.0, 120.0, 160.0, และ 240.0 นาโนกรัม/มล.ของพลาสมา เตรียมตัวอย่างพลาสมาเหล่านี้ และวิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ทำซ้ำแต่ละความเข้มข้น จำนวน 3 ตัวอย่าง (n = 3)

ข. ปิเปตสารละลายไนเฟดิพีนในเมทานอล ความเข้มข้นเช่นเดียวกันกับข้อ ก. ให้มีปริมาณไนเฟดิพีนและบิวแทมเบนเท่ากับปริมาณที่เติมลงในพลาสมา วิเคราะห์โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับข้อ ก. โดยที่ไม่ต้องมีขั้นตอนการสกัดมาเกี่ยวข้อง

การคำนวณเปอร์เซนต์การกลับคืนของสาร :-

เช่นเดียวกับการคำนวณในหน้า 17

4.5 การศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ในการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ ทำได้โดยเตรียมชุดความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมาในช่วง 7.0 - 240.0 นาโนกรัม/มล. จำนวน 3 ชุด (n = 3) และทำการวิเคราะห์หาปริมาณยาตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้ ให้เสร็จภายในวันเดียวกัน (Within-run Precision) และ วิเคราะห์ไนเฟดิพีนในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวข้างต้นในต่างวันกัน (Between-run Precision) โดยทำการทดลองจำนวน 4 วัน (n = 4) คำนวณอัตราส่วนความสูงพีคของไนเฟดิพีน ต่อ ความสูงพีคของบิวแทมเบน(PHR) ในแต่ละความเข้มข้น คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (Coefficient of Variation, C.V.) ของค่า PHR

ส่วนที่ 5 การศึกษาช่วงระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างพลาสมาที่มีไนเฟดิพีน ในช่องแช่แข็ง

ในการศึกษาหาปริมาณสารในของเหลวชีวภาพต่าง ๆ เช่น พลาสมา หรือ ซีรัม นั้น ตัวอย่างที่ได้มามักจะถูกเก็บไว้ในช่องแช่แข็งทันที จนกว่าจะถึงเวลาวิเคราะห์ ดังนั้นการศึกษาหาช่วงระยะเวลาที่สารในของเหลวชีวภาพยังคงสภาพเดิม ไม่เสื่อมสลาย หรือเกิดการเปลี่ยนแปลง จนกว่าจะถึงเวลาทำการวิเคราะห์ จึงเป็นสิ่งจำเป็น

การศึกษาครั้งนี้ จึงได้ทำการทดลองเพื่อทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของไนเฟดิพีนในพลาสมาที่เก็บไว้ในช่องแช่แข็ง และปราศจากแสง เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการกำหนดช่วงเวลาที่ต้องวิเคราะห์สารตัวอย่าง เพื่อให้ผลการศึกษาวิเคราะห์มีความถูกต้องตรงตามความเป็นจริงมากที่สุด

วิธีการทดลอง :-

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไนเฟดิพีนในพลาสมา ที่เก็บในช่องแช่แข็ง และปราศจากแสง โดยใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 3 ความเข้มข้น คือ 40.0, 120.0 และ 240.0 นาโนกรัม/มล.ของพลาสมา ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาที่มีไนเฟดิพีน ที่ วันที่เตรียม(0 วัน), 1, 3, 5, และ 7 วัน หลังจากเก็บในหลอดแก้วที่หุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียมและในช่องแช่แข็ง โดยใช้จำนวนตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น 3 ตัวอย่าง ($n=3$) ในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง พลอตค่าความสูงของพีคไนเฟดิพีนที่ได้จากการวิเคราะห์กับเวลาที่เก็บตัวอย่าง

ส่วนที่ 6 การวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในตัวอย่างพลาสมาของผู้ที่ได้รับยา

เพื่อเป็นการยืนยันว่า วิธีการวิเคราะห์ไนเฟดิพีนในพลาสมาที่พัฒนาได้นั้น สามารถนำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในตัวอย่างพลาสมาของผู้ที่ได้รับยาไนเฟดิพีน จึงได้ทำการทดลองโดยใช้อาสาสมัครเพศชาย จำนวน 3 คน อายุระหว่าง 20-30 ปี มีร่างกายแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัวใด ๆ มีขั้นตอนในการศึกษาดังนี้ :-

1. ตรวจร่างกายและตรวจเลือดอาสาสมัคร
2. อาสาสมัครไม่รับยาใด ๆ ภายใน 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง
3. ให้อาสาสมัครอดอาหาร 10-12 ชั่วโมง ก่อนการทดลอง พร้อมทั้ง งดเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์ และ Caffeine เช่น ชา, กาแฟ ฯลฯ เป็นต้น
4. ในวันทดลอง อาสาสมัครงดอาหารเช้า และเจาะเลือดก่อนที่จะรับประทานยา
5. ให้ Adalat® 10 มก. จำนวน 1 เม็ด แก่อาสาสมัคร กลืนพร้อมน้ำ 100-200 มล.
6. เจาะเลือดก่อนการทดลองและ หลังรับยาไป 10, 20, 30, 45, 60 นาที และ 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0 ชั่วโมง โดยเจาะเลือดครั้งละ 5 มล. ตัวอย่างเลือด จะถูกบรรจุในหลอดทดลองที่มี Heparin ผสมให้เข้ากัน แล้วเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที นาน 15 นาที เพื่อแยกพลาสมา เก็บตัวอย่างพลาสมาที่ได้ไว้ในช่องแช่แข็งและปราศจากแสง จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

การวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในตัวอย่างพลาสมาของอาสาสมัคร

นำตัวอย่างพลาสมาจำนวน 0.5 มล. วิเคราะห์ตามวิธีการที่พัฒนาได้ ควบคู่กับ กราฟมาตรฐานของตัวยา ที่เตรียมขึ้น ที่เตรียมขึ้นในช่วงความเข้มข้นของยา = 7.0, 10.0, 40.0, 80.0, 120.0, 160.0,และ 240.0 นาโนกรัม/มล.ของพลาสมา อัตราส่วนความสูงพีคของตัวยาต่อความสูงพีคของ IS (PHR) ที่ได้จากการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่าง จะนำมาคำนวณเป็นความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในแต่ละตัวอย่าง โดยใช้ค่า slope, intercept ที่ได้จากสมการของกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้นของตัวยาที่หาได้ นำมาพลอตเป็น Plasma Drug Concentration vs. Time profile