การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมาโดยเทคนิคทางไอเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

นางสาวกมลทิพย์ วิวัฒนวงศา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเภสัชเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2535

ISBN 974-581-876-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018664

The Development of Quantitative Determination of Nifedipine in Plasma by High-Performance Liquid Chromatographic Technique

MISS KAMOLTHIP WIWATTANAWONGSA

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmaceutical Chemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1992

ISBN 974-581-876-3

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมาโดยเทคนิคทางไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี
โดย	นางสาว กมลทิพย์ วิวัฒนวงศา
ภาควิชา	เภสัชเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการสอบ

(รองศาสตราจารย์ สุทธาทิพย์ จันทรสกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. พนิดา วยัมหสุวรรณ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. เยาวภา ไวรักษ์สัตว์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

กมลทิพย์ วิวัฒนวงศา : การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมา โดยเทคนิคทางไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (THE DEVELOPMENT OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF NIFEDIPINE IN PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUE) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ, 117 หน้า. ISBN 974-581-876-3

วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมา โดยใช้เทคนิคทางไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ที่พัฒนาขึ้นนี้ ทำได้โดยการสกัดแยกตัวยาออกจากพลาสมาด้วยเอทิล-อะซีเตท ภายหลังจากที่มีการปรับสภาวะของตัวอย่างพลาสมาให้เป็นด่าง และแปลงสภาพพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายยูเรียในน้ำ ใช้บิวแทมเบนเป็น Internal Standard โครมาโทกราฟีกคอลัมน์ที่ใช้มีขนาด 250 x 4.6 มม. บรรจุด้วย Spherisorb ODS 2, 5 ไมครอน Mobile Phase ประกอบด้วย อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.1 (1×10^{-2} โมลาร์) และ เมทานอล ในอัตราส่วน 38 : 62 ใช้อัตราการไหล 1.0 มล./นาที การตรวจวัดปริมาณไนเฟดิพีน และ Internal standard ใช้ UV detector ที่ 247 นาโนเมตร วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาได้นี้มีความจำเพาะสูง โดยปราศจากการรบกวน ความเข้มข้นต่ำสุดของไนเฟดิพีนที่สามารถวิเคราะห์ได้คือ 7.0 นาโนกรัม/มล. ของพลาสมา และใช้ตัวอย่างพลาสมาเพียง 0.5 มล. เปอร์เซนต์การกลับคืนในการประเมินประสิทธิภาพของการแยกตัวยาจากพลาสมา(%recovery) มีค่าเฉลี่ย 81,80%

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ใน 1 วัน และต่างวันในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา แสดงในรูปของค่าสัมประสิทธิ์ ความแปรปรวนมีค่าอยู่ระหว่าง 1.57 - 11.81% และ 1.10 - 11.85% ตามลำดับ กราฟมาตรฐานซึ่งได้จากการพลอตค่า log ของอัตราส่วนความสูงพีคของตัวยา ต่อความสูงพีคบิวแทมเบน กับค่า log ของความเข้มข้นของตัวยาในพลาสมา เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของยา = 7.0 - 240 นาโนกรัม/มล. ของพลาสมา ตัวอย่างพลาสมาที่มีไนเฟดิพีนสามารถเก็บไว้ในที่ปราศจากแสง และในช่องแช่แข็งได้ถึง 7 วัน โดยไม่มีการเสื่อมสลายของตัวยา
วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจหาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมาของอาสาสมัครที่รับประทานยาไนเฟดิพีน (Adalat®) ขนาด 10 มก. แม้ภายหลังรับยาไปแล้วถึง 7 ชม. ก็ตาม จึงเป็นการยืนยันถึงความจำเพาะเจาะจงและความไวที่เพียงพอของวิธีนี้ ในการที่จะนำไปศึกษาทางด้านคลินิกและเภสัชจลนศาสตร์ของตัวยาไนเฟดิพีน

ภาควิชา เภสัชเคมี ลายมือชื่อนิสิต กมลทิพย์ วิวัฒนวงศา

สาขาวิชา เภสัชเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม –

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C275242 : MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY
KEY WORD : NIFEDIPINE/QUANTITATIVE DETERMINATION IN PLASMA/HPLC
KAMOLTHIP WIWATTANAWONGSA : THE DEVELOPMENT OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF NIFEDIPINE IN PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUE. THESIS ADVISOR : ASSO.PROF. PHENSRI THONGNOPNUA, Ph.D. 117 pp. ISBN 974-581-876-3

The analytical method for determining nifedipine in human plasma was developed utilizing high-performance liquid chromatographic technique. Prior to extract nifedipine plasma sample with ethyl acetate, the sample was alkalinized following by the addition of aqueous urea as plasma protein denaturing agent. Butamben was used as an internal standard. Spherisorb ODS 2 (250 x 4.6 mm.id), 5 µm was selected as an analytical column. The mobile phase consists of acetate buffer pH 6.1 (1×10^{-2}M) and methanol in the ratio of 38 : 62 with the flow rate used of 1.0 ml/min. Nifedipine and internal standard were quantitated via UV detector at 247 nm. The developed method was specific and enable to determine the concentration of nifedipine in plasma as low as 7.0 ng/ml of plasma without any observed interference and requiring only 0.5 ml of plasma sample. The mean recovery of nifedipine was 81.80%.

Within-run precision and between-run precision over the calibration range expressed as coefficient of variation were between 1.57 - 11.81% and 1.10 - 11.85%, respectively. The calibration curve plotting from the values of log peak height ratio versus log plasma concentration was linear over the concentration range of 7.0 - 240.0 ng/ml. Plasma sample can be kept frozen in the dark for at least 7 days without any deterioration of the sample before analysis. The method developed was successfully used to determine the nifedipine concentration in volunteers' plasma sample up to 7 hrs after single oral dose of 10 mg Adalat®. The method has then proven to be sensitive and specific enough for clinical and pharmacokinetic studies of this compound.

ภาควิชา เภสัชเคมี ลายมือชื่อนิสิต กมลทิพย์ วิวัฒนวงศา

สาขาวิชา เภสัชเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Phensri Thongnopnua

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม –

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความรู้ ความเอาใจใส่ดูแล และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ต่อการวิจัยในครั้งนี้ด้วยดีและสม่ำเสมอตลอดการศึกษาวิจัย อีกทั้งยังกรุณาให้กำลังใจและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณแผนกพลาสมา ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ได้เอื้อเฟื้อพลาสมา เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ด้วยดีตลอดมา รวมทั้งบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาสนับสนุนทุนบางส่วน ในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความรู้ตลอดการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่เพื่อใช้เป็นห้องปฏิบัติการในการทำการวิจัย อีกทั้ง เอื้ออำนวยเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัย รวมถึงภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ยืมเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่จำเป็นต่อการวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบทุกท่านที่ได้ช่วยตรวจสอบ แก้ไขวิทยานิพนธ์เรื่องนี้ มีความถูกต้องสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และ น้อง ๆ ทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ กำลังใจ คำปรึกษา ในการทำวิจัยครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญรูป..... ฌ

สารบัญตาราง..... ฐ

คำอธิบายสัญญลักษณ์ และคำย่อ..... ฒ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ..... 8

วัสดุอุปกรณ์..... 8

วิธีการ..... 11

- การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์สารละลายของตัวยาโดยใช้ HPLC..... 12
- การศึกษาทดลองวิธีการต่างๆ ที่จะทำให้ได้ตัวอย่างพลาสมาที่สะอาดมากพอ ที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทาง HPLC ได้..... 17
- การคัดเลือก Internal standard ที่เหมาะสมและสรุปวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมา..... 30
- การ Validate วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้..... 33
- การศึกษาช่วงระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างพลาสมาที่มีไนเฟดิพีนในช่องแช่แข็ง..... 37

หน้า

- การวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีน ในตัวอย่างพลาสมาของผู้ที่ได้รับยา..... 38

3. ผลการทดลอง และการวิจารณ์ผล..... 40

4. สรุปผลการศึกษา..... 96

เอกสารอ้างอิง..... 99

ภาคผนวก

ก. วิธีการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยาและเปอร์เซนต์ที่ยาถูกสกัดทั้งหมด..... 109

ข. UV สเปกตรัมของ IS_1, IS_2, IS_3, และ IS_4 ในเมทานอล..... 112

ค. คุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของสารต่างๆที่จะนำมาใช้เป็น Internal Standard เปรียบเทียบกับไนเฟดิพีน..... 113

ง. ข้อมูลอัตราส่วนความสูงพีคของไนเฟดิพีนต่อบิวแทมเบนและความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา ในการสร้างกราฟมาตรฐาน..... 114

จ. ผลการตรวจทางชีวเคมีของอาสาสมัครชายไทย..... 115

ฉ. ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมาจากอาสาสมัครที่ได้รับประทานไนเฟดิพีนขนาด 10 มก.1เม็ด..... 116

ประวัติผู้เขียน..... 117

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างทางเคมีของไนเฟดิพีน.....	1
2	UV สเปกตรัมของไนเฟดิพีนในเมทานอล.....	42
3	โครมาโทแกรมของไนเฟดิพีนในเมทานอล เมื่อใช้ mobile phase เป็นสารผสมของ อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.1:เมทานอล = 38:62.....	44
4	โครมาโทแกรมของพลาสมาที่ได้ภายหลังจากการตกตะกอนแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลและแอซีโตไนไตรล์.....	46
5	โครมาโทแกรมของพลาสมาที่ได้ภายหลังจากการสกัด endogenous substance ออกก่อนด้วยเฮกเซน แล้วตกตะกอนแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล และแอซีโตไนไตรล์.....	47
6	โครมาโทแกรมของพลาสมาที่ได้ภายหลังจากการตกตะกอนแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล และแอซีโตไนไตรล์ ร่วมกับซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ.....	49
7	โครมาโทแกรมของพลาสมาที่ได้ภายหลังจากการแปลงสภาพพลาสมาโปรตีนก่อน จึงตกตะกอนแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอซีโตไนไตรล์.....	50

รูปที่ (ต่อ) หน้า

8 โครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมาที่ได้ภายหลังจากการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท..... 57

9 โครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมาที่ได้ภายหลังจากการสกัดด้วยสารผสมของ แอซีโตไนไตรล์ กับเอทิลอะซีเตท = 1:3..... 58

10 โครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมาที่ได้ภายหลังจากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม..... 59

11 โครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมาที่ได้ภายหลังจากการสกัดด้วยสารผสมของ แอซีโตไนไตรล์กับคลอโรฟอร์ม = 1:3..... 60

12 โครมาโทแกรมของตัวอย่างพลาสมาที่ได้ภายหลังจากการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท (2.3 ก)..... 65

13 โครมาโทแกรมของตัวอย่างพลาสมาที่ได้จากการสกัดด้วยเอทิล-อะซีเตทภายหลังจาก ปรับสภาพตัวอย่างด้วย โพแตสเซียม-ไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ (2.3 ข)..... 66

14 โครมาโทแกรมของตัวอย่างพลาสมาที่ได้จากการสกัดด้วยเอทิล-อะซีเตทภายหลังจากที่ได้สกัดสาร endogenous ออกบางส่วนด้วยเอกเซนแล้ว (2.3 ค)..... 67

15 โครมาโทแกรมของตัวอย่างพลาสมาที่ได้จากการสกัดด้วยเอทิล-อะซีเตทภายหลังจากที่เติมสารละลายยูเรียแล้ว(2.3 ง)... 70

รูปที่ (ต่อ) หน้า

16 โครมาโทแกรมของตัวอย่างพลาสมาที่ได้จากการสกัดด้วยเอทิล-อะซีเตทภายหลังจากปรับสภาพตัวอย่างด้วยโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ แล้ว..... 71

17 โครมาโทแกรมของไนเฟดิพีนและ IS_1 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น..... 74

18 โครมาโทแกรมของไนเฟดิพีนและ IS_2 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น..... 75

19 โครมาโทแกรมของไนเฟดิพีนและ IS_3 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น..... 76

20 โครมาโทแกรมของไนเฟดิพีนและ IS_4 ที่ได้จากการวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น..... 77

21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง อัตราส่วนความสูงของพีคของไนเฟดิพีนต่อบิวแทมเบนกับความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา 82

22 โครมาโทแกรมแสดง ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมาโดยเทคนิค HPLC..... 84

23 ความสัมพันธ์ระหว่างความสูงพีคของไนเฟดิพีน(หน่วยเป็น มม.)กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างพลาสมาที่มีไนเฟดิพีนไว้..... 91

รูปที่ (ต่อ) หน้า

24 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยาในพลาสมาของอาสาสมัคร 3 คน กับ เวลา ภายหลังที่ได้รับไนเฟดิพีนขนาด 10 มก. โดยการรับประทานเพียงครั้งเดียว..... 94

25 โครมาโทแกรมที่ได้จากอาสาสมัคร ภายหลังรับประทานยาไนเฟดิพีน 10 มก. เพียงครั้งเดียว..... 95

26 UV สเปกตรัมของ IS_1, IS_2, IS_3, และ IS_4 ในเมทานอล 112

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่าเฉลี่ยพื้นที่พีคของไนเฟดิพีนที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวยา ที่ความยาวคลื่นต่างๆ.....	43
2	การแยกพลาสมาโปรตีนออกจากพลาสมาโดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล.....	51
3	การแยกพลาสมาโปรตีนออกจากพลาสมาโดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยแอซีโตไนไตรล์.....	53
4	ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว(Distribution coefficient ,D) ของไนเฟดิพีน และเปอร์เซนต์ที่ยาถูกสกัดทั้งหมด....	56
5	การสกัดแบลงค์พลาสมาด้วยสารสกัดชนิดต่างๆเพียง 1 ครั้ง (4 x 1 มล.).....	61
6	การสกัดแบลงค์พลาสมาด้วยสารสกัดชนิดต่างๆ 2 ครั้ง (2 x 2 มล.).....	62
7	การเปรียบเทียบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมา เมื่อคำนวณโดยการใช้อัตราส่วนพื้นที่พีคกับอัตราส่วนความสูงพีค.....	81

ตารางที่ (ต่อ) หน้า

8 ค่า S/N เมื่อทำการวิเคราะห์ไนเฟดิพีนในพลาสมาที่ความเข้มข้น 7.0 นาโนกรัม/มล. 83

9 เปอร์เซนต์การกลับคืนของไนเฟดิพีนและบิวแทมเบนในการแยกออกจากพลาสมา (Physical Recovery) ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 86

10 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมา ภายใน 1 วัน (Within-run Precision) 88

11 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมา ต่างวัน (Between-run Precision)..... 89

12 ความสูงพีคไนเฟดิพีนเมื่อเก็บตัวอย่างพลาสมาที่มีไนเฟดิพีนไว้ที่เวลาต่างๆ..... 92

13 คุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของสารต่างๆที่จะนำมาใช้เป็น Internal Standard เปรียบเทียบกับไนเฟดิพีน..... 113

14 อัตราส่วนความสูงพีคของไนเฟดิพีน ต่อ ความสูงพีคของบิวแทมเบนและความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน..... 114

15 ผลการตรวจทางชีวเคมีของอาสาสมัครชายไทย..... 115

ตารางที่ (ต่อ) หน้า

16 ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมาของอาสาสมัคร ภาย
หลังรับประทาน Adalat ® 10 มก. 1 เม็ด..... 116

คำอธิบายสัญญลักษณ์ และคำย่อ

กก.	กิโลกรัม
มก.	มิลลิกรัม
มล.	มิลลิลิตร
มม.	มิลลิเมตร
มคล.	ไมโครลิตร
มคก.	ไมโครกรัม
°ซ	องศาเซลเซียส
%	เปอร์เซนต์
nm	nanometer
ml	milliliter
dl	deciliter
µg	microgram
M	molar
min	minute
mg	milligram
ng	nanogram
g	gram
L	liter
U	unit
t_R	retention time