การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมา โดยการทำอนุพันธ์กับ 4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน ก่อนทำการแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ปริญญานิพนธ์
ของ
วรรณา เอี่ยมอาจ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
มีนาคม 2557

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมา โดยการทำอนุพันธ์กับ 4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน ก่อนทำการแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ปริญญานิพนธ์
ของ
วรรณา เอี่ยมอาจ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
มีนาคม 2557
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมา โดยการทำอนุพันธ์กับ 4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน ก่อนทำการแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

บทคัดย่อ

ของ

วรรณา เอี่ยมอาจ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
มีนาคม 2557

วรรณา เอี่ยมอาจ. (2557). *การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมาโดยการทำอนุพันธ์กับ 4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน ก่อนทำการแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.* ปริญญานิพนธ์ วท.ม.(วิทยาการเภสัชภัณฑ์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี, รองศาสตราจารย์ สุพีชา วิทยเลิศปัญญา.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พรีกาบาลินในพลาสมามนุษย์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ต่อกับตัวตรวจวัดสัญญาณชนิดฟลูออเรสเซนส์ โดยการทำให้เกิดอนุพันธ์กับ 4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน (NBD-Cl) และใช้กาบาเพนตินเป็นสารมาตรฐานภายใน เตรียมตัวอย่างโดยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตไนไตรล์ จากนั้นนำส่วนใสมาทำปฏิกิริยากับ NBD-Cl ซึ่งจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดอนุพันธ์คือ ใช้ปริมาณของสาร NBD-Cl ความเข้มข้น 2.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวกลางที่เป็นเบสที่พีเอชเท่ากับ 11 ภายใต้อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ วิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้คอลัมน์ชนิด C_{18} โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วยอะซิโตไนไตรล์และโปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 2.5 ในอัตราส่วน 50 : 50 โดยปริมาตร อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดปริมาณสารด้วยตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนส์ โดยกำหนดความยาวคลื่นเร้าอิเล็กตรอน 460 นาโนเมตรและความยาวคลื่นฟลูออเรสเซนต์ 558 นาโนเมตร ใช้เวลาในรอบการวิเคราะห์ 11 นาที อนุพันธ์ที่เตรียมขึ้นมีความคงตัวมากกว่าร้อยละ 96 เป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณพรีกาบาลินในพลาสมาได้ในช่วงความเข้มข้น 20-10,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า $R^2 > 0.9999$ โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณเท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรในการวิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร และไม่พบการรบกวนขององค์ประกอบอื่นๆ ของพลาสมา การทดสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์พรีกาบาลินภายในวันเดียวกันและระหว่างวันให้ค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์เท่ากับ 0.22-5.41% และ 1.84-5.19% ตามลำดับ และให้ค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์พรีกาบาลินภายในวันเดียวกันและระหว่างวันเท่ากับ 95.87-106.89% และ 98.25-101.86% ตามลำดับ วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความไว มีความจำเพาะเจาะจง มีความถูกต้องและแม่นยำตามมาตรฐานการวิเคราะห์สารทางชีวภาพของ United States Food and Drug Administration (US FDA) guideline 2013 และ European Medicines Agency (EMEA) guideline 2011

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF PREGABALIN DETERMINATION IN HUMAN PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY USING PRE-COLUMN DERIVATIZATION WITH 4-CHLORO-7-NITRO-BENZOFURAZAN

AN ABSTRACT

BY

WANNA EIAMART

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science in Pharmaceutical Product Development

at Srinakharinwirot University

March 2014

Wanna Eiamart. (2014). *Development and Validation of Pregabalin Determination in Human Plasma by Highperformance Liquid Chromatography using Pre-Column Derivatization with 4-Chloro-7-Nitro-Benzofurazan*. Master thesis, M.S. (Pharmaceutical Product Development). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr.Weerasak Samee., Assoc. Prof. Supeecha Wittayalertpanya.

The objectives of this study were to develop and validate method for quantitative determination of pregabalin (PGB) in human plasma by HPLC equipped with fluorescence detecter. 4-Chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) and gabapentin (GB) were used as derivatizing agent and internal standard, respectively. Sample preparation required plasma protein precipitating using acetonitrile. The supernatant was then aliquoted and pre-column derivatized with NBD-Cl. The optimum derivatization conditions established were 2.24 mg/ml of NBD-Cl, pH 11 and 80˚C. After 15 min, the reaction was terminated using 0.02 M HCl. The chromatographic separation was carried out on a Phenomenex C_{18} column. Mobile phase, a mixture of KH_2PO_4 buffer (10 mM; pH2.5) and acetonitrile (50:50, v/v), was eluted at the flow rate of 1.2 ml/min. The fluorescent derivatives were monitored at the excitation and emission wavelengths of 460 and 558 nm, respectively. The obtained derivatives were found to be stable (>96%) remaining for at least 48 hours at 20˚C. The developed assay for pregabalin was linear over the range of 20-10,000 ng/ml in plasma (R^2 >0.9999). The lower limit of quantification was 20 ng/ml when 20 µl injection volume was applied. No interferences were found from pregabalin and gabapentin. The intra-day and inter-day precision values were 0.22-5.41% and 1.84-5.19%, respectively and the intra-day and inter-day accuracies were 95.87-106.89% and 98.25-101.86%, respectively. The proposed method, proved to be sensitive, selective, precise and accurate, meets the standards of bioanalysis method validation accepted by United States Food and Drug Administration (US FDA) 2013 and the European Medicines Agency (EMEA) guideline 2011.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมา
โดยการทำอนุพันธ์กับ 4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน
ก่อนทำการแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ของ

วรรณา เอี่ยมอาจ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่ .....เดือน มีนาคม พ.ศ 2557

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

.....ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี)

.....ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ สุพีชา วิทยเลิศปัญญา)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชรวีร์ นันท์ธนะวานิช)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สุพีชา วิทยเลิศปัญญา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา เพชรกระจ่าง)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณา ช่วยเหลือ พร้อมทั้งข้อเสนอแนะเพื่อแก้ปัญหา ปรับปรุงให้ปริญญานิพนธ์มีความสมบูรณ์และถูกต้อง ตลอดจนดูแลเอาใจใส่การดำเนินงานวิจัยทุกขั้นตอนอย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์สุพีชา วิทยเลิศปัญญา ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม พร้อมทั้งเป็นผู้ให้ความรู้ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้อย่างดียิ่ง ให้คำปรึกษาเพื่อนำไปพัฒนางานวิจัยให้มีความสมบูรณ์และทรงคุณค่าสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในสังคมได้ รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือในการทำงานวิจัยครั้งนี้ด้วย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ทั้งสองท่าน ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่าทุ่มเทให้กับงานด้านการวิจัยและพัฒนาอย่างไม่เหน็ดเหนื่อย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชรวีร์ นันท์ธนะวานิช ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา เพชรกระจ่าง ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้แก่ผู้วิจัยในการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ ซึ่งทำให้ผู้วิจัยมีความรู้อย่างเต็มเปี่ยม

ขอกราบขอบพระคุณหัวหน้าห้องปฏิบัติการ Chula Pharmacokinetic Research Center คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และบุคลากรในห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่เป็นกำลังใจและคอยช่วยเหลือมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้โอกาส ให้การสนับสนุน ตลอดจนเป็นกำลังใจในการศึกษากับผู้วิจัยเป็นอย่างดีเยี่ยมเสมอมา

วรรณา เอี่ยมอาจ

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ภูมิหลัง	1
	วัตถุประสงค์ สมมติฐานการวิจัย ปัจจัยและตัวแปรที่ศึกษา	5
	ขอบเขตของงานวิจัย	5
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
2	**แนวคิด ทฤษฎี และ งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	7
	พรีกาบาลิน	7
	เทคนิคเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	7
	องค์ประกอบของเครื่อง HPLC	7
	หลักการของเทคนิค HPLC	8
	การใช้ HPLC ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ	11
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการวิเคราะห์พรีกาบาลินโดยใช้เทคนิค HPLC	12
	วิธีการสกัดพรีกาบาลินออกจากพลาสมาด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีน	13
	พลาสมา	13
	การตกตะกอนโปรตีน	14
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการสกัดพรีกาบาลินโดยใช้วิธีการตกตะกอนโปรตีน	15
	การใช้สาร 4-Chloro-7-Nitrobenzofurazan ในการทำให้เกิดอนุพันธ์กับพรีกาบาลินและกาบาเพนติน	16
	การเตรียมเป็นสารอนุพันธ์	16
	4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน	17
	กาบาเพนติน	17
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการวิเคราะห์พรีกาบาลินและกาบาเพนตินโดยใช้ NBD-Cl	18
	การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	19
	ความหมายของ Method Validation	19
	พารามิเตอร์ที่ใช้ในการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	20

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 วิธีดำเนินการวิจัย	22
อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี	22
การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในงานวิจัย	24
วิธีการทดลอง	26
ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสาร	26
ศึกษาการสกัดพรีกาบาลินออกจากตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีน	28
ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำอนุพันธ์กับ NBD-Cl และการหยุดปฏิกิริยา	29
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	30
4 ผลการทดลอง	34
ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินในพลาสมา	34
ผลการศึกษาการสกัดสารออกจากตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีน	42
ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างพรีกาบาลินกับสาร NBD-Cl	45
ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	52
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ	67
บรรณานุกรม	76
ภาคผนวก	82
ภาคผนวก ก ตารางแสดงเกณฑ์การยอมรับค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำ	83
ภาคผนวก ข ภาพประกอบแสดงข้อมูลโครมาโทแกรมเพิ่มเติมของงานวิจัย	85
ประวัติย่อผู้วิจัย	88

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 แสดงข้อบ่งใช้ของพรีกาบาลินที่ได้รับการรับรอง (Approved) โดยประเทศต่างๆ 1

2 แสดงรายงานการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินโดยใช้เทคนิคต่างๆ 3

3 แสดงความแตกต่างของ Normal phase และ Reverse phase 9

4 เกณฑ์การยอมรับค่าจากการตรวจสอบความเหมาะสมของพารามิเตอร์ 11

5 แสดงค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการวิเคราะห์พรีกาบาลินและกาบาเพนตินโดยใช้ Phosphate buffer ต่างชนิดกัน 37

6 แสดงค่าพารามิเตอร์ต่างๆในการวิเคราะห์พรีกาบาลินและกาบาเพนตินที่ความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ต่างกัน 38

7 แสดงค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการวิเคราะห์พรีกาบาลินและกาบาเพนตินเมื่อใช้ KH_2PO_4 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชต่างกัน 39

8 แสดงค่าพารามิเตอร์ต่างๆในการวิเคราะห์พรีกาบาลินและกาบาเพนตินที่อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ต่างกัน 41

9 สรุปสภาวะของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์พรีกาบาลิน 42

10 แสดงผลของการสกัดพรีกาบาลินและกาบาเพนตินออกจากพลาสมาโดยใช้ชนิดของสารแตกต่างกัน (n=3) 43

11 แสดงค่า %Recovery ที่ได้จากการใช้อัตราส่วน Plasma : ACN เท่ากับ 1 : 2 44

12 แสดงค่า %Recovery ที่ได้จากการใช้อัตราส่วน Plasma : ACN เท่ากับ 1 : 2.5 45

13 แสดงค่า %Recovery ที่ได้จากการใช้อัตราส่วน Plasma : ACN เท่ากับ 1 : 3 45

14 แสดงค่า %Recovery ที่ได้จากการใช้อัตราส่วน Plasma : ACN เท่ากับ 1 : 3.5 45

15 แสดงค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินหลังจากเติมกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นต่างๆที่เวลา 1 ชั่วโมง..... 46

16 แสดงค่าพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินที่ความเข้มข้นของ NBD-Cl ต่างกัน 48

17 แสดงค่าพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินที่พีเอชของ Borate buffer ต่างกัน 49

18 แสดงค่าพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินในการทำปฏิกิริยาที่เวลาต่างกัน 51

19 สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์..... 52

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

20 แสดงค่าพื้นที่ใต้พีคของ Blank plasma ที่ Retention time ของการวิเคราะห์พรีกาบาลินและกาบาเพนติน 54

21 แสดงค่า Signal to noise ของพรีกาบาลินที่จุดความเข้มข้นของ LLOD และ LLOQ (n=5) 55

22 แสดงผลการศึกษากราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้นของพรีกาบาลิน 20-10,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (n=5) 56

23 แสดงสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและค่า R^2 (n=5) 57

24 แสดงค่าความถูกต้องและความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์พรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (LLOQ) ในพลาสมา (n=15) ในวันเดียวกันเป็นจำนวน 3 วัน 58

25 แสดงค่าความถูกต้องและความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์พรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (LLOQ) ในพลาสมา (n=15) ในระหว่างวันเป็นจำนวน 3 วัน..... 59

26 แสดงค่าความถูกต้องและความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์พรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Low quality control) ในพลาสมา (n=5) ในวันเดียวกันเป็นจำนวน 3 วัน 59

27 แสดงค่าความถูกต้องและความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์พรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 5000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Medium quality control) ในพลาสมา (n=5) ในวันเดียวกันเป็นจำนวน 3 วัน 60

28 แสดงค่าความถูกต้องและความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์พรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (High quality control) ในพลาสมา (n=5) ในวันเดียวกันเป็นจำนวน 3 วัน 60

29 แสดงค่าความถูกต้องและความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์พรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 60, 5000 และ7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในพลาสมา (n=15) ในระหว่างวันเป็นจำนวน 3 วัน 61

30 แสดงค่า %Recovery ของการสกัดพรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 60, 5000 และ 7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในพลาสมา (n=5) 61

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

31 แสดงค่า %Recovery ของการสกัดกาบาเพนติน 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในพลาสมา 62

32 แสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพรีกาบาลินที่เวลาเริ่มต้นของการเตรียมและเมื่อตั้งทิ้งไว้ในเครื่องฉีดสารอัตโนมัติ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 63

33 แสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินที่เวลาต่างๆ 64

34 แสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพรีกาบาลินในพลาสมาที่ผ่านการแช่แข็ง-ละลาย เป็นจำนวน 3 รอบ 65

35 แสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพรีกาบาลินในพลาสมาที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0 , 3 และ 6 ชั่วโมง 66

36 แสดงค่าความแม่นยำที่ยอมรับได้ในการเตรียมตัวอย่างที่ไม่ผ่านการสกัด 84

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของพรีกาบาลิน..... 7

2 แสดงส่วนประกอบของเครื่อง HPLC 8

3 แสดงกราฟความแตกต่างของ Isocratic elution และ Gradient elution 10

4 แสดงส่วนประกอบของเลือด..... 14

5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ NBD-Cl 17

6 แสดงโครงสร้างทางเคมีของกาบาเพนติน..... 18

7 แสดงหลักการหาค่า Signal to noise 20

8 แสดงโครมาโทแกรมของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินในระบบที่ไม่ผ่านการสกัด โดย (a) เป็นโครมาโทแกรมที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น ACN : KH_2PO_4, (b) MeOH : KH_2PO_4 และ (c) ACN : H_2O 35

9 แสดงโครมาโทแกรมของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินในพลาสมา โดย (a) เป็นโครมาโทแกรมที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น ACN : Na_2HPO_4, (b) ACN : NaH_2PO_4, (c) ACN : KH_2PO_4 และ (d) ACN : K_2HPO_4 36

10 แสดงโครมาโทแกรมของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินในพลาสมา โดย (a) เป็นโครมาโทแกรมที่ใช้ KH_2PO_4 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ (b) 5 มิลลิโมลาร์ 38

11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชกับค่าพารามิเตอร์ในการแยกของพรีกาบาลิน (RT คือ Retention time, Rs คือ Resolution, T คือ Tailing factor และ N คือ Theoretical Plates) 40

12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ ACN กับค่าพารามิเตอร์ในการแยกของพรีกาบาลิน (RT คือ Retention time, R_S คือ Resolution, T คือ Tailing factor, N คือ Theoretical Plates และ A คือ Peak area) 41

13 แสดงสารละลายที่ได้หลังจากการตกตะกอนโปรตีนในพลาสมาด้วยชนิดของสารที่แตกต่างกัน 43

14 แสดงโครมาโทแกรมของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินที่ใช้ MeOH และTCA ในการตกตะกอนโปรตีนโดย (a) เป็นโครมาโทแกรมที่ใช้ MeOH ในการตกตะกอนโปรตีนและ (b) 20% TCA 44

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ HCl กับร้อยละการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนติน 47

16 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินกับความเข้มข้นของ NBD-Cl ที่ต่างกัน 48

17 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินกับ pH ของ Borate buffer 50

18 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินกับเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา..... 51

19 แสดงสีของตัวอย่างหลังหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริก (เมื่อให้ความร้อนในช่วง 5-25 นาที) 52

20 แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์พรีกาบาลินและกาบาเพนตินในพลาสมา โดย (a) เป็นโครมาโตแกรมของพรีกาบาลินกับกาบาเพนตินในพลาสมา (b) กาบาเพนตินในพลาสมาและ (c) Blank plasma 53

21 แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์พรีกาบาลินที่จุดความเข้มข้นของ LLOQ (20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) 55

22 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเฉลี่ย (n=5) ที่ความเข้มข้นของพรีกาบาลิน 20-10,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 57

23 แสดงปฏิกิริยา Derivatization ระหว่างพรีกาบาลินกับ NBD-Cl 70

24 แสดงสีของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นเมื่อให้ความร้อนเป็นเวลา 15 นาที (ก่อนหยุดปฏิกิริยาด้วยกรด HCl) 71

25 แสดงโครมาโทแกรมของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินในพลาสมาโดยไม่เติม NBD-Cl 86

26 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายแบลงค์ที่ไม่ผ่านการสกัด 86

27 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายต่างๆ ที่ไม่ผ่านขั้นตอนการทำให้เกิดอนุพันธ์ ... 87

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

พรีกาบาลิน (Pregabalin) เป็นยาที่ถูกคิดค้นและจดสิทธิบัตรโดยบริษัทไฟเซอร์ (Pfizer) (Pfizer Canada Inc. 2013: Online) พัฒนามาจากกาบาเพนติน (Gabapentin) ออกฤทธิ์โดยจับกับ $\alpha 2\delta$ (Alpha2delta) ซึ่งเป็น Subunit ของ Voltage-gated calcium channels ส่งผลให้ลดการหลั่งสารสื่อประสาทจึงลดการกระตุ้นเซลล์ประสาท ทำให้มีฤทธิ์ในการลดปวด นอกจากนั้นพรีกาบาลินยังไม่จับกับโปรตีนในกระแสเลือดจึงมีรูปแบบทางเภสัชจลนศาสตร์เป็นเส้นตรง (Linear pharmacokinetic) และไม่จับกับเอนไซม์ CYP450 จึงลดปัญหาการเกิดปฏิกิริยากับยาอื่น การรับประทานยายังไม่ ต้องคำนึงถึงมื้ออาหารเนื่องจากอาหารไม่มีผลต่อการดูดซึมยา (Arain. 2009: 407-413) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของพรีกาบาลินกับกาบาเพนตินพบว่า พรีกาบาลินสามารถบรรเทาความเจ็บปวดได้ดีกว่าและมีค่าชีวประสิทธิผล (Oral bioavailability) ที่สูงกว่า (Bockbrader; et al. 2010: 661-669) ปัจจุบันพรีกาบาลินได้รับการรับรองให้ใช้ในการรักษาโรคได้หลายชนิดดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 แสดงข้อบ่งใช้ของพรีกาบาลินที่ได้รับการรับรอง (Approved) โดยประเทศต่างๆ

Approved indication	Thai FDA	US FDA	European Commission
Postherpetic neuralgia	✓	✓	✓
Diabetic peripheral neuropathy	✗	✓	✓
Adjunct in partial seizures	✓	✓	✓
Fibromyalgia	✓	✓	✗
Anxiety	✓	✗	✓

ที่มา: ปัณณวิชย์ ชื่นอารมณ์; และคนอื่นๆ. (2554: ออนไลน์).

เนื่องจากพรีกาบาลินมีคุณสมบัติที่ดีในการบำบัดรักษาโรคได้หลายชนิด ทำให้มีบริษัทยาหลายแห่งทำการผลิตยาเลียนแบบขึ้นมาอย่างแพร่หลาย หรือเรียกยาเลียนแบบนั้นว่ายาสามัญ (Generic drugs) การศึกษาเพื่อพิสูจน์ว่ายาสามัญและยาต้นแบบ (Original drugs) ให้ผลการรักษาที่เท่าเทียมกัน (Therapeutic equivalence) คือ การศึกษาชีวสมมูล (Bioequivalence) (ศูนย์บริการภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2555: ออนไลน์) ซึ่งเป็นวิธีที่ยอมรับว่ามีความถูกต้องและใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุด ดังนั้นการวิเคราะห์ระดับพรีกาบาลินในพลาสมาจึงมีความสำคัญเพื่อนำผลที่ได้มาใช้เปรียบเทียบความสามารถของยาสามัญว่าดูดซึมและออกฤทธิ์ได้ไม่แตกต่างจากยาต้นแบบ เพื่อเป็นข้อมูลยืนยันว่าสามารถใช้แทนกันได้ (Interchangeability) ซึ่งทำให้ประชาชนมีโอกาสได้ใช้ยาราคาถูกและลดการนำเข้ายาต้นแบบที่มีราคาสูงจากต่างประเทศ (อิสริยา เตชะธนะวัฒน์. 2552: 11-13)

ปัจจุบันไม่มีวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลิน (Gujral; Haque; & Shanker. 2009: 422) แต่ได้มีรายงานการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณพรีกาบาลินโดยเทคนิคต่างๆ (ตาราง 2) ได้แก่ ESI-MS/MS, LC/MS /MS , UPLC-MS, GC/MS และ CE/ NMR ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความแม่นยำในการวิเคราะห์แต่ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูง การใช้เทคนิคแกสโครมาโทกราฟี (Gas chromatography, GC) ไม่นิยมเนื่องจากพรีกาบาลินเป็นสารที่ไม่ระเหย ต้องทำให้เป็นอนุพันธ์ที่สามารถระเหยและทำให้ทนความร้อนได้สูง ซึ่งสาร Derivatizing agent ที่ใช้ทำให้เกิดอนุพันธ์มีจำนวนน้อย การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโตรฟลูออโรเมทรี (Spectrofluorometry) และสเปกโตรโฟโทเมทรี (Spectrophotometry) เป็นเทคนิคที่ง่าย ราคาถูก แต่เทคนิค ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโทเมทรี (UV-VISspectrophotometry) มีความไวในการวิเคราะห์ต่ำไม่สามารถวิเคราะห์สารผสมได้และไม่เป็นระบบการวิเคราะห์แบบอัตโนมัติ เทคนิคนี้จึงยังไม่เป็นที่ยอมรับในการวิเคราะห์ระดับยาเพื่อใช้ในการศึกษาชีวสมมูล เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) เป็นเทคนิคที่ให้ความไวและความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์สูงเมื่อใช้ตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescence detector) สามารถวิเคราะห์สารผสมและสารปริมาณน้อยได้ เป็นระบบอัตโนมัติ และสามารถวิเคราะห์ซ้ำซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำ

ตาราง 2 แสดงรายงานการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินโดยใช้เทคนิคต่างๆ

เทคนิคการวิเคราะห์พรีกาบาลิน	อ้างอิง
ESI-MS/MS	Shah; Ghosh; & Thaker. 2010: 354-357
LC-MS/MS	Nirogi; et al. 2009: 3899-3906 Heltsley; et al. 2011: 357-359 Uma; et al. 2011: 108-112 Vaidya; et al. 2007: 925-928 Mandal; et al. 2008: 237-243
UPLC-MS	Dahl; Olsen; & Strand. 2012: 37-42
GC-MS	Mudiam; et al. 2012: 310-319
CE/NMR	Beni; et al. 2010: 842-852
GC	Thejaswini; Gurupadayya; & Raja. 2012: 3112-3115
Spectrofluorometry	Abdel; & Shaalan. 2010: 250-267 Onal; & Sagirli. 2009: 68-71
Spectrophotometry	Abdel; & Shaalan. 2010: 250-267 Bali; & Gaur. 2011: 1-7 Gujral; Haque & Shanker. 2009: 421-427 Onal; & Sagirli. 2009: 68-71
HPLC	Gujral; Haque ; & Kumar. 2009: 327-334 Vermeij; & Edelbroek. 2004: 297-303 Mercolinia; et al. 2010: 62-67 Mishra; Gurupadhyya; & Verma. 2012: 130 Dousa; Gibala; & Lemr. 2010: 717-722

ในการวิเคราะห์ตัวอย่างทางด้านชีวสมมูลหรือเภสัชจลนศาสตร์ ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์เป็นตัวอย่างพลาสมาจึงไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ได้โดยตรงต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้สะอาดหรือบริสุทธิ์โดยการสกัดยาออกจากพลาสมาก่อนนำไปวิเคราะห์ นอกจากนี้ตัวอย่างทางด้านการศึกษาชีวสมมูลในแต่ละครั้งมีตัวอย่างจำนวนมาก การเลือกวิธีการสกัดที่เหมาะสมจึงมีความจำเป็นเพื่อนำไปสู่ผลการวิเคราะห์ที่มีความรวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีหลายวิธีที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสกัดยาได้ เช่น Solid-phase extraction (SPE), Enzymatic digestion, Ultra-filtration, Dialysis, Liquid-liquid extraction (LLE) และ Protein precipitation เป็นต้น (ชนกพร โปติบุตร; และวิระชัย สมัย. 2554: ออนไลน์)

การตกตะกอนโปรตีน (Protein precipitation) ถือเป็นวิธีการสกัดที่ง่าย รวดเร็ว มีราคาถูก เหมาะกับการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก แต่ต้องมีการเลือกชนิดและปริมาณสารที่ใช้ในการตกตะกอนให้เหมาะสมเพื่อลดปัญหาการสูญเสียสารสำคัญในระหว่างการสกัดและสามารถสกัดซ้ำได้ผลแม่นยำ

จากการศึกษาโครงสร้างของพรีกาบาลินพบว่าไม่มีโครโมฟอร์ (Chromophore) และฟลูออโรฟอร์ (Fluorophore) ทำให้พรีกาบาลินไม่สามารถตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์ได้โดยตรง ดังนั้นการทำให้เกิดอนุพันธ์ (Derivatization) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดโดยการทำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างพรีกาบาลินกับ Derivatizing agent เพื่อเปลี่ยนหรือปรับปรุงคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารให้สามารถตรวจวัดได้ โดยสาร Derivatizing agent ที่เคยมีผู้ศึกษาเพื่อนำมาใช้ในการทำปฏิกิริยากับพรีกาบาลิน คือ o-Phtaldialdehyde (Vermeij; & Edelbroek. 2004: 297-303) (Dousa; Gibala; & Lemr. 2010: 717-722) อนุพันธ์ที่เกิดขึ้นมีความคงตัวสั้น, Fluorescamine (Abdel; & Shaalan. 2010: 250-267) เป็นสารที่มีราคาแพง, 2,4-Dinitrofluorobenzene (Abdel; & Shaalan. 2010: 250-267), 2,3,5,6-Tetrachloro-1,4-benzoquinone (Abdel; & Shaalan. 2010: 250-267), 1,2-Naphthoquinone-4-sulphonate sodium (NQS) (Mercolinia; et al. 2010: 62-67) และ Ninhydrin (Bali; & Gaur. 2011: 1-7) ใช้ตัวตรวจวัดชนิดยูวี-วิสิเบิล ทำให้ความไวในการวิเคราะห์ต่ำ นอกจากรีเอเจนต์ต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นยังพบว่ามีสาร Derivatizing agent ที่ใช้ในการวิเคราะห์พรีกาบาลินและสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดี คือ 4-Chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) (Onal; & Sagirli. 2009: 68-71) ซึ่งเป็นรีเอเจนต์ที่มีราคาถูก อนุพันธ์ที่เกิดขึ้นสามารถตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์ได้ มีความไวในการวิเคราะห์สูงและมีความคงตัวดี (Elbashir; Suliman; & Aboul-Enein. 2011: 222-241) (Hao; et al. 2004: 77-85)

จากข้อมูลที่ได้กล่าวมาในเบื้องต้นพบว่าการพัฒนาการวิเคราะห์พรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมา เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีความไวในการวิเคราะห์สูง เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์สั้นและให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำ รวมถึงต้นทุนในการวิเคราะห์ต่ำ ต้องพัฒนาในส่วนของเทคนิคในการวิเคราะห์ เทคนิคในการสกัดสารและเทคนิคในการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัด การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นศึกษาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณพรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมาด้วยเทคนิค

HPLC ร่วมกับตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์ ใช้กาบาเพนตินเป็นสารมาตรฐานภายใน (Internal standard) สกัดยาออกจากพลาสมาโดยใช้วิธีการตกตะกอนโปรตีน แล้วทำให้เกิดอนุพันธ์กับสาร NBD-Cl ก่อนที่จะนำสารอนุพันธ์ไปแยกด้วยคอลัมน์ชนิด C_{18} ซึ่งเป็นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ยังไม่เคยมีรายงานวิจัยการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้มาก่อน จากนั้นทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) โดยหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ตามข้อกำหนดของ United States Food and Drug Administration guideline (US FDA guideline) (Food and Drug Administration. 2013: Online) และ European Medicines Agency guideline (EMEA guideline) (European Medicines Agency. 2011: Online) เพื่อยืนยันว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์พรีกาบาลินในพลาสมาเพื่อศึกษาชีวสมมูลได้ ซึ่งปัจจุบันมีรายงานค่อนข้างน้อยเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์พรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมาด้วยเทคนิค HPLC เพื่อศึกษาชีวสมมูล

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณพรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมาให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ถูกต้องตามเกณฑ์มาตรฐานของ US FDA และ EMEA guideline

สมมติฐานการวิจัย

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถวิเคราะห์หาปริมาณพรีกาบาลินได้ถูกต้องตามเกณฑ์มาตรฐานของ US FDA และ EMEA guideline

ปัจจัยและตัวแปรที่ศึกษา

ตัวแปรอิสระ : วิธีการวิเคราะห์พรีกาบาลิน

ตัวแปรตาม : ปริมาณพรีกาบาลิน และ Method validation parameter

ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลองมุ่งศึกษาการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมาด้วยเทคนิค HPLC ที่ใช้กาบาเพนตินเป็นสารมาตรฐานภายใน โดยขั้นตอนการพัฒนาวิธีวิเคราะห์คือ ศึกษาสภาวะของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ได้แก่ ชนิดของเฟสเคลื่อนที่,ความเข้มข้นของ Phosphate buffer, พีเอชของเฟสเคลื่อนที่และอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่โดยใช้ Reverse phase system ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพรีกาบาลินออกจากตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีน โดยศึกษาชนิดและปริมาณสารที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดอนุพันธ์ระหว่างพรีกาบาลินกับ NBD-Cl โดยศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของ NBD-Cl พีเอชที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาและความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา ตลอดจนตรวจสอบความ

ถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นตามเกณฑ์การยอมรับของ US FDA guideline และ EMEA guideline

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีใหม่ในการวิเคราะห์ระดับยาพรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมาของมนุษย์ที่มีความจำเพาะเจาะจงและมีความไวในการวิเคราะห์สูง ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์สั้น ผลการทดลองที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องและแม่นยำ โดยที่ใช้ต้นทุนในการวิเคราะห์ต่ำ

2. ตัวอย่างที่เตรียมได้มีความคงตัว ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจำนวนมากได้โดยไม่ทำให้ตัวอย่างที่รอการวิเคราะห์เสื่อมสภาพ

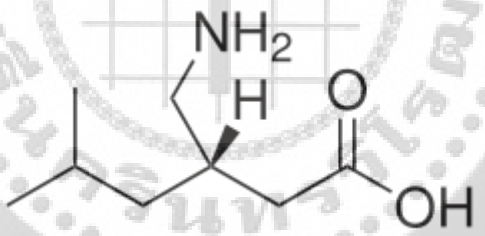
3. สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินในตัวอย่างจริงสำหรับการศึกษาชีวสมมูลหรือการศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี และ งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. พรีกาบาลิน

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของพรีกาบาลิน

พรีกาบาลิน มีชื่อทางเคมี (Chemical name) คือ (*S*)-3-(Aminomethyl)-5-methylhexanoic acid มีสูตรโมเลกุล (Molecular formula) $C_8H_{17}NO_2$ โดยมีน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) เท่ากับ 159.23 ค่า pKa1 เท่ากับ 4.2 และ pKa2 เท่ากับ 10.6 มีสมบัติทางเคมีกายภาพ (Physicochemical properties) เป็นผลึกของแข็งสีขาว เป็นสารประกอบที่มีขั้วสูงสามารถละลายได้ดีในน้ำ (Uma; et al. 2011: 108) โครงสร้างทางเคมี (ภาพประกอบ 1) ประกอบด้วยสายไฮโดรคาร์บอนชนิดอิ่มตัวจึงมีค่าความยาวคลื่นที่พรีกาบาลินสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้สูงสุด (λ_{max}) ที่ช่วงความยาวคลื่นสั้น (196.2 นาโนเมตร) (Bali; & Gaur. 2011: 2) นอกจากนี้พรีกาบาลินยังไม่สามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เนื่องจากโครงสร้างไม่คงรูป (Rigid) และมีพันธะคู่เพียงพันธะเดียว โดยโครงสร้างของพรีกาบาลินประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่แสดงความเป็นกรด คือ หมู่ Carboxylic (-COOH) และหมู่ฟังก์ชันที่แสดงความเป็นเบส คือหมู่ Primary amine ($-NH_2$)



ภาพประกอบ 1 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของพรีกาบาลิน

ที่มา: Dahl; Olsen; & Strand. (2012: 38).

2. เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

2.1 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC

ส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC ดังแสดงในภาพประกอบ 2 ประกอบด้วย

1. เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง มีสถานะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่คอลัมน์เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์

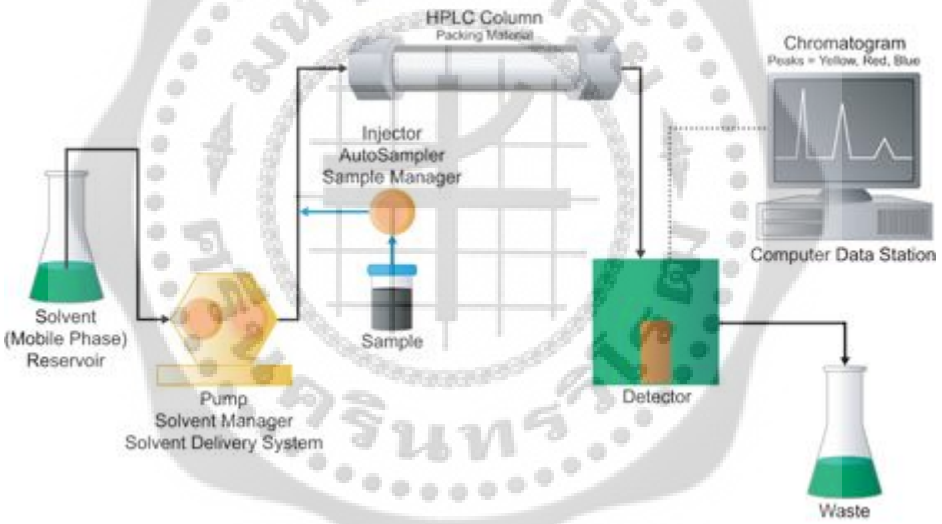
2. ปั๊ม (Pump) ทำหน้าที่ ดึงเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบ HPLC

3. ช่องฉีดสาร (Injector/Autosampler) ทำหน้าที่ ฉีดสารตัวอย่างเพื่อเข้าสู่ระบบ HPLC

4. คอลัมน์ (Column) หรือจะเรียกว่าเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) ภายในบรรจุด้วยเฟสที่อยู่กับที่ มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล ทำให้เกิดกระบวนการแยกองค์ประกอบของสารที่สนใจ โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสอยู่กับที่

5. ตัวตรวจวัดสัญญาณ (Detector) ทำหน้าที่ ตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก ซึ่งชนิดของตัวตรวจวัด ได้แก่ Photodiode array detector, Fluorescence detector, Refractive index detector เป็นต้น การเลือกใช้ตัวตรวจวัดขึ้นกับตัวอย่างที่สนใจว่าสามารถตอบสนองกับตัวตรวจวัดชนิดไหนได้ดี

6. เครื่องบันทึกสัญญาณ (Recorder) ทำหน้าที่ รับสัญญาณที่ออกจากตัวตรวจวัดสัญญาณ ซึ่งเป็นสัญญาณไฟฟ้าและประมวลผลการวิเคราะห์ออกมาเป็นโครมาโทแกรม



ภาพประกอบ 2 แสดงส่วนประกอบของเครื่อง HPLC

ที่มา: จีรนันท์ ชัยวาฤทธิ์. (2555: ออนไลน์).

2.2 หลักการของเทคนิค HPLC

เทคนิค HPLC เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับแยกสารที่สนใจภายใต้ความดันของเหลว โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่หรือคอลัมน์กับเฟสเคลื่อนที่โดยใช้หลักการที่สารแต่ละชนิดมีความชอบต่อเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันทำให้สารถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน โดยสารประกอบตัวใดที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเฟสเคลื่อนที่สารนั้นก็จะถูก

แยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่หรือเข้ากันได้ดีกับเฟสอยู่กับที่ก็จะถูกแยกออกมาภายหลัง

เทคนิค HPLC เป็นเทคนิคการแยกสารผสมแบบใช้เครื่องสูบแรงดันสูง (High pressure pump) สูบเฟสเคลื่อนที่พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสารผ่านอนุภาคที่เป็นเฟสอยู่กับที่ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารผสมตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยกออกมาแล้วเข้าสู่เครื่องตรวจวัดในเวลาที่ต่างกัน สัญญาณที่วัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่วัดได้ จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณและสัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีคที่เรียกว่าโครมาโทแกรม

1. กลไกในการแยกสารโดยใช้โครมาโทกราฟี

สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลไกขึ้นอยู่กับอันตรกิริยาที่เกิดระหว่างสารที่สนใจวิเคราะห์กับคอลัมน์ ได้แก่

1.1 การกระจายตัว (Partition liquid chromatography) เป็นการใช้หลักการแยกสารตัวอย่างตามความชอบการกระจายตัวหรือละลายในเฟสคงที่หรือเฟสเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน

1.2 การดูดซับ (Adsorption liquid chromatography) แยกสารโดยใช้หลักการดูดซับของสารตัวอย่างบนเฟสคงที่ที่มีขั้ว อาศัยความแตกต่างความมีขั้วของสารตัวอย่างที่แตกต่างกัน

1.3 การแลกเปลี่ยนไอออน (Ion-exchange chromatography) เป็นการแยกสารที่แตกตัวเป็นประจุหรือสารประกอบไอออนิก โดยอาศัยความแตกต่างของความแรงของประจุของสารแต่ละชนิด

1.4 การแยกโดยใช้ความแตกต่างของขนาดสาร (Size exclusion chromatography) เป็นการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล ขนาดและรูปร่างของสาร (แม้น อมรสิทธิ์; และคนอื่นๆ. 2555: 397-405)

รูปแบบการแยกสารโดยเทคนิค HPLC ที่ใช้โดยทั่วไปมี 2 ประเภทตามความมีขั้วของเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ ได้แก่ Normal phase และ Reverse phase ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 แสดงความแตกต่างของ Normal phase และ Reverse phase

Separation mode (solvent)	**Stationary phase (packing materials)**	**Mobile phase**
Normal phase	Polar	Non-polar
Reverse phase	Non-polar	Polar

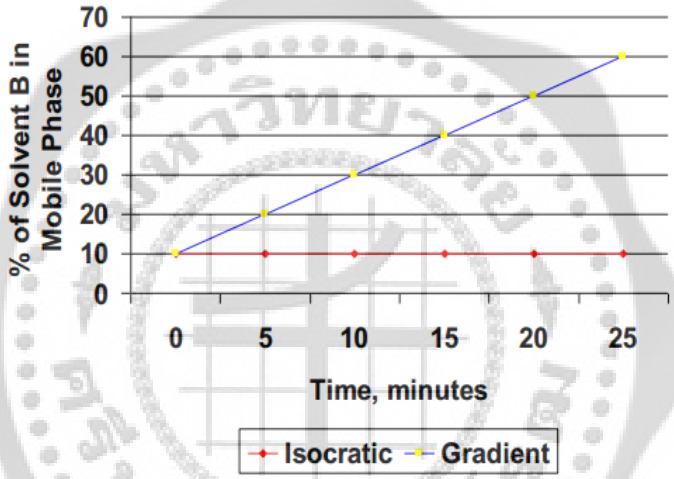
ที่มา: Waters. (2014: Online).

2. การชะสารออกจากคอลัมน์ (Elution)

การใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่ในการชะสารออกจากคอลัมน์พบได้ 2 ลักษณะ ดังแสดงในภาพประกอบ 3 คือ

2.1 Isocratic elution เป็นการใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่คงที่ตลอดทั้งรอบการวิเคราะห์อาจใช้เฟสเคลื่อนที่ชนิดเดียวหรือหลายชนิดผสมกันก็ได้ แต่สัดส่วนคงที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดการวิเคราะห์เหมาะกับการวิเคราะห์สารเพียงชนิดเดียวหรือสารผสมก็ได้

2.2 Gradient elution เป็นการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในระหว่างการวิเคราะห์ ซึ่งต้องใช้ชนิดของเฟสเคลื่อนที่อย่างน้อย 2 ชนิด เหมาะกับตัวอย่างที่เป็นสารผสม



ภาพประกอบ 3 แสดงกราฟความแตกต่างของ Isocratic elution และ Gradient elution

ที่มา: Ravi, Sankar. (2013: Online).

3. พารามิเตอร์พื้นฐานที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของเทคนิค HPLC

3.1 Theoretical plate (N) เป็นค่าที่บ่งชี้ประสิทธิภาพของคอลัมน์ ค่า N มากแสดงถึงประสิทธิภาพในการแยกดี

3.2 Capacity factor (k') เป็นค่าที่แสดงว่าสารถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์ได้ดีเพียงใด

3.3 Tailing factor (T) เป็นค่าที่บอกถึงลักษณะพีคของสารว่ามีความสมมาตรมากน้อยเพียงใด

3.4 Resolution (R_S) เป็นค่าที่แสดงว่าพีคของสารสองพีคที่อยู่ติดกัน แยกออกจากกันมากน้อยเพียงใด

เกณฑ์การยอมรับค่าพารามิเตอร์พื้นฐานเพื่อแสดงประสิทธิภาพการแยกของระบบตามมาตรฐาน US FDA guideline ดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 เกณฑ์การยอมรับค่าจากการตรวจสอบความเหมาะสมของพารามิเตอร์

Parameters	US FDA guidline
N	> 2000
k'	> 2
T	≤ 2
R_S	> 2

ที่มา: Food and Drug Administration. (1994: Online).

2.3 การใช้ HPLC ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ

1. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Qualitative analysis)

การตรวจสอบชนิดของสารว่าเป็นสารที่สนใจหรือไม่ โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน มีการยืนยันชนิดของสารได้ 2 วิธี ได้แก่

1.1 เปรียบเทียบค่า Retention time (RT) กับสารมาตรฐาน โดยสารตัวอย่างและสารมาตรฐานต้องทำการวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน ถ้าสารตัวอย่างและสารมาตรฐานมี RT เท่ากัน แสดงว่าเป็นสารเดียวกันและอาจวิเคราะห์เพิ่มเติมโดยเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์และ/หรือเฟสเคลื่อนที่

1.2 เติมสารมาตรฐานเข้มข้นปริมาณเล็กน้อยลงในสารละลายตัวอย่าง ซึ่งเรียกว่าการ Spike ถ้าเป็นสารชนิดเดียวกันจะทำให้พื้นที่พีคหรือความสูงเพิ่มขึ้น

2. การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis)

เป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารสามารถวัดปริมาณของสารได้โดยวัดความสูงของพีคหรือวัดพื้นที่พีคเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยการเตรียมกราฟมาตรฐานสามารถทำได้ 2 วิธี ได้แก่

2.1 External standard method

ใช้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 3-5 ระดับความเข้มข้น นำมาวิเคราะห์แล้วเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้น (แกนนอน) กับพื้นที่พีคหรือความสูงของพีค (แกนตั้ง)

2.2 Internal standard method

เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างโดยการเติมสารมาตรฐานชนิดที่ไม่มีในตัวอย่างเรียกว่าสารมาตรฐานภายในลงในสารตัวอย่างและสารมาตรฐานในปริมาณที่เท่ากัน นำมาวิเคราะห์และเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกนนอน) กับอัตราส่วนพื้นที่พีคของสารมาตรฐานกับพื้นที่พีคของสารมาตรฐานภายใน(แกนตั้ง) การวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยวิธีนี้ให้ความแม่นยำและความเที่ยงตรงสูง โดยสารมาตรฐานภายในควรมีคุณสมบัติ ดังนี้

- เป็นสารที่ไม่มีในตัวอย่าง
- เป็นสารในกลุ่มเดียวกันมีคุณสมบัติคล้ายกันกับสารตัวอย่าง
- ไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารใดๆ ในคอลัมน์ และสารละลายตัวชะ
- ให้ Retention time ใกล้เคียงกับพีคของตัวอย่างและแยกออกจากพีคของตัวอย่าง อย่างชัดเจน (แม้น อมรสิทธิ์; และคนอื่นๆ. 2555: 430-431)

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการวิเคราะห์พรีกาบาลินโดยใช้เทคนิค HPLC

เทคนิค HPLC สามารถตรวจวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพวิเคราะห์และเชิงปริมาณวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ส่วนใหญ่นิยมใช้วิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยยาก (Low volatile substances) หรือมีน้ำหนักโมเลกุลสูง (High molecular weight compounds) ซึ่งปัจจุบันเทคนิค HPLC เข้ามามีบทบาทในการวิเคราะห์ยามากขึ้นทั้งในด้านของการตรวจสอบคุณภาพของวัตถุดิบยา (Active pharmaceutical ingredients) การประเมินและควบคุมคุณภาพของยาสำเร็จรูป (Finished products) หรือการวิเคราะห์ระดับยาในตัวอย่างที่เป็นชีววัตถุ (Biological fluid) เช่น เลือด ปัสสาวะ พลาสมา เป็นต้น (ธัญนันท์ พรายงาม. 2554: 10-12) มีรายงานการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินโดยใช้เทคนิค HPLC ดังนี้

กูจรัล; แฮกค์; และคูมาร์ (Gujral; Haque; & Kumar. 2009: 327-334) ได้ศึกษาวิธีการวิเคราะห์พรีกาบาลิน ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ยา 5 ชนิดและในปัสสาวะของมนุษย์ โดยใช้ระบบ Isocratic reverse phase HPLC ร่วมกับตัวตรวจวัดยูวีที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร สภาวะที่ใช้ คือ คอลัมน์ชนิด C_{18} ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Hypersil คอลัมน์ขนาด 250 มิลลิเมตร × 4.6 มิลลิเมตร ระบบเฟสเคลื่อนที่ คือ เมทานอล (MeOH) : อะซิโตไนไตรล์ (ACN) : ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอชเท่ากับ 7 ในอัตราส่วน 3 : 1 : 16 โดยปริมาตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า 10 นาที ซึ่งสามารถวิเคราะห์พรีกาบาลินได้อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.75 - 6.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาพบว่างานวิจัยนี้สามารถวิเคราะห์พรีกาบาลินได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการทำให้เกิดเป็นสารอนุพันธ์โดยใช้ตัวตรวจวัดยูวี ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น แต่จากผลการทดลองพบว่ายังเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ความไวในการวิเคราะห์ต่ำ เนื่องจากใช้ตัวตรวจวัดยูวีและความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์ ยังไม่ใช่ความยาวคลื่นการดูดกลืนแสงสูงสุดของพรีกาบาลิน

เวอเมจ; และ อีเดลโบร็ค (Vermeij; & Edelbroek. 2004: 297-303) ได้ศึกษาวิธีการวิเคราะห์สารผสมของยา 3 ชนิด ได้แก่ พรีกาบาลิน กาบาเพนติน และ วิกาบาทริน ในตัวอย่างซีรั่มของมนุษย์ โดยใช้ระบบ Isocratic reversed phase HPLC ร่วมกับตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์และใช้เทคนิคในการวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธี Internal standard method เตรียมตัวอย่างโดยใช้สารละลาย Trichloroacetic acid (TCA) ในการกำจัดโปรตีนและนำส่วนใสมาทำให้เกิดอนุพันธ์กับสาร o-Phthaldialdehyde (OPA) และ 3-Mercaptopropionic acid ก่อนที่จะนำสารนั้นไปแยกด้วคอลัมน์ชนิด C_{18} โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น MeOH : ACN : Phosphate buffer ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอชเท่ากับ 7 ในอัตราส่วน 8.0 : 17.5 : 74.5 โดยปริมาตร อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วทำการตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์ ช่วงที่ใช้ในการวิเคราะห์ของพรีกาบาลิน คือ 0.13 - 63 มิลลิลิตรต่อลิตร กาบาเพนติน 0.53 - 40 มิลลิลิตรต่อลิตรและวิกาบาทริน 0.06 - 62 มิลลิลิตรต่อลิตร ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 25 นาทีต่อ 1 ตัวอย่าง จากการศึกษาพบว่างานวิจัยนี้ใช้ตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์ สามารถวิเคราะห์สารผสมได้อย่างจำเพาะเจาะจง แต่ยังเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ความไวในการวิเคราะห์ต่ำ เวลาในการวิเคราะห์นานและต้องใช้เฟสเคลื่อนที่ในการแยกสารหลายชนิด

ดอเซ; กิบาลา; และเอลเมอ (Dousa; Gibala; & Lemr. 2010: 717-722) ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์พรีกาบาลินในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ยาด้วยระบบ Isocratic reversed phase HPLC ร่วมกับตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์ ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น MeOH : Acetate buffer ที่ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอชเท่ากับ 5.0 ในอัตราส่วน 15 : 85 โดยปริมาตร แยกด้วยคอลัมน์ชนิด C_{18} หลังจากนั้นทำให้เกิดอนุพันธ์กับ OPA และ 2-mercaptoethanol ก่อนที่จะนำสารไปตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนต์ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 15 นาที ซึ่งผลการวิเคราะห์พรีกาบาลินซ้ำ 8 ครั้ง มีค่า %RSD (Relative standard deviation) ของ Retention time และพื้นที่ใต้พีคเท่ากับ 0.06% และ 0.51% ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่างานวิจัยนี้เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง ให้ผลการวิเคราะห์ซ้ำที่แม่นยำ แต่ต้องเพิ่มอุปกรณ์ในการผสมสาร คือ Capillary coil หลังจากผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ และเพิ่มขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้พรีกาบาลินกับสาร Derivatizing agent เกิดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ใน Capillary coil ก่อนทำการตรวจวัด

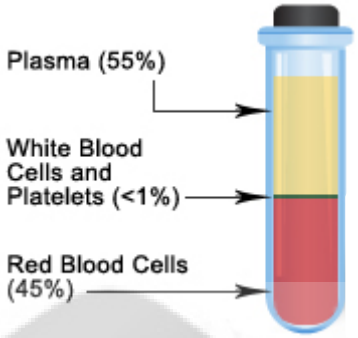
3. วิธีการสกัดพรีกาบาลินออกจากพลาสมาด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีน

ในตัวอย่างพลาสมามีโปรตีนและสารอื่นปนอยู่เป็นจำนวนมาก ก่อนการวิเคราะห์จึงต้องแยกสารที่ต้องการออกจากสารที่รบกวนการวิเคราะห์เพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์และสามารถวิเคราะห์สารได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

3.1 พลาสมา (Plasma)

พลาสมา คือ ส่วนประกอบของเลือดที่เป็นของเหลวดังแสดงในภาพประกอบ 4 ลักษณะเป็นสีเหลืองใส มีสัดส่วนคิดเป็น 55 เปอร์เซ็นต์ในเลือด พลาสมาประกอบด้วยน้ำประมาณ

92 เปอร์เซ็นต์และมีโปรตีนที่สำคัญ 7 ชนิด เช่น Albumin, Gamma globulin, Fibrinogen และ Anti-Hemophilic factor เป็นต้น นอกจากนี้อีก 1 เปอร์เซ็นต์ยังมีน้ำตาล ไขมัน ฮอร์โมน วิตามิน รวมทั้งแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ เป็นส่วนประกอบอีกด้วย



ภาพประกอบ 4 แสดงส่วนประกอบของเลือด

ที่มา: American Red cross. (2014: Online).

3.2 การตกตะกอนโปรตีน (Protein Precipitation)

โดยปกติโปรตีนสามารถละลายอยู่ในน้ำได้มีเหตุผลหลักสองประการคือ โมเลกุลของโปรตีนในส่วนที่ชอบน้ำ สามารถเกิดอันตรกิริยา (Interaction) กับน้ำได้จึงสามารถเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้าเอาโมเลกุลของน้ำมาล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนได้ อีกสาเหตุหนึ่งคือ บนโมเลกุลของโปรตีนมีประจุไฟฟ้าสุทธิ (Electrostatic repulsion) สูงกว่าแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิตทำให้โมเลกุลของโปรตีนอยู่ห่างกันจึงไม่สามารถรวมตัวเข้ามาอยู่ใกล้กันแล้วตกตะกอนลงมาได้ ดังนั้นปัจจัยใดก็ตามที่สามารถเพิ่มอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยกันเอง (Protein - protein interaction) หรือการลดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและน้ำ (Protein - Water interaction) ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนลดลง ส่งผลให้โปรตีนตกตะกอนได้ ซึ่งการตกตะกอนโปรตีนมีหลายวิธี ได้แก่ การตกตะกอนที่จุดไอโซอิเลคทริค (Isoelectric pH) เรียกวิธีนี้ว่า Isoelectric precipitation การตกตะกอนโปรตีนโดยการเพิ่มความแรงอิออนด้วยวิธีการตกตะกอนแบบลำดับส่วนด้วยเกลือ (Ionic strength หรือ Salt fractionation precipitation) และการตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำ (Organic solvent precipitation) เป็นต้น (ชรินทร์ เตชะพันธุ์. 2542: Online)

1. การตกตะกอนที่จุดไอโซอิเลคทริค

โปรตีนแต่ละชนิดมีค่าพีเอชที่ทำให้สมดุลของประจุสุทธิบนโมเลกุลเป็นศูนย์เรียก ว่าค่านี้ว่าจุดไอโซอิเลคทริค (Isoelectric point; pI) เป็นค่าเฉพาะตัวของโปรตีนแต่ละชนิด เมื่อใดก็ตามที่ทำการปรับค่าพีเอชของสารละลายโปรตีนผสมจนกระทั่งมีค่าเท่ากับค่า pI ของโปรตีนที่ต้องการแยกโปรตีนชนิดนั้นจะเกิดการรวมตัวกันแล้วตกตะกอนลงมาเนื่องจากบนโมเลกุลของ

โปรตีนนั้นมีประจุสุทธิเป็นศูนย์จึงไม่มีแรงผลักดันไฟฟ้าสถิตย์ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเอง ดังนั้น โปรตีนจึงเข้าใกล้กันมากพอที่จะเกิดการรวมตัวกัน (Aggregration) ตกตะกอนลงมาได้

2. การตกตะกอนโดยอาศัยหลักการเพิ่มค่าความแรงของอิออนโดยใช้เกลือ

เป็นการตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูงซึ่งเรียกวิธีการนี้ว่า " Salting out " เป็นการเติมเกลือลงไปในสารละลายโปรตีนผสมเพื่อเพิ่มความแรงไอออน (Ionic strength) ของสารละลายให้สูงขึ้นจนกระทั่งอิออนของเกลือไปแย่งโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนออกมาล้อมรอบโมเลกุลของเกลือเอง ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเป็นการแข่งขันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและโมเลกุลของเกลือในการเกิดแรงกริยาทางไฟฟ้ากับโมเลกุลของน้ำนั่นเองเมื่อใดก็ตามที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับน้ำมีค่าเหลือน้อยกว่าแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับโปรตีน โปรตีนก็จะจับตัวกันตกตะกอนลงมา

3. การตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลาย

เป็นการตกตะกอนโปรตีนโดยตัวทำละลายอินทรีย์จะไปลดค่าความสามารถในการละลายน้ำของสารโดยไปลดค่าคงที่ไดอิเลคตริค (Dielectric constant) ของสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายทำให้ความสามารถในการเป็นตัวทำละลายของน้ำลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์มากขึ้นเรื่อยๆ จนถึงจุดที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีน (พลังงานไฟฟ้าสถิตบนโมเลกุลโปรตีน) สูงกว่าแรงกระทำระหว่างโปรตีนกับน้ำ ทำให้เกิดการเข้ามารวมตัวกันของโมเลกุลโปรตีนและตกตะกอนลงมาได้ (ชรินทร์ เตชะพันธุ์. 2542: Online)

3.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการสกัดพรีกาบาลินโดยใช้วิธีการตกตะกอนโปรตีน

จากการศึกษารายงานวิจัยที่เคยใช้วิธีการตกตะกอนโปรตีนในการสกัดพรีกาบาลินมีดังนี้

เมนเดล; และคนอื่นๆ (Mandal; et al. 2008: 237-243) ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์และตรวจสอบวิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับใช้ในการวิเคราะห์พรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมาของมนุษย์ โดยใช้กาบาเพนตินเป็นสารมาตรฐานภายใน เตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการใช้สารละลาย 20% TCA ในการกำจัดโปรตีน แล้วนำสารละลายใสที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS-MS ช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ 0.1-15.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า Correlation coefficient เท่ากับ 0.9998 ค่า %Recovery ที่ได้จากการสกัดพรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมาอยู่ในช่วง 80.45-89.12% (%Coefficient of variation หรือ %CV = 6.11, 4.26, 3.08) และกาบาเพนตินมีค่าเท่ากับ 87.56% (%CV = 4.92)

เวีย์ดยา; และคนอื่นๆ (Vaidya; et al. 2007: 925-928) ได้ใช้เทคนิค LC-MS-MS ในการศึกษาวิธีการวิเคราะห์พรีกาบาลินในพลาสมาของมนุษย์ เตรียมตัวอย่างโดยใช้วิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วย ACN แล้วนำสารละลายใสที่ได้วิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS-MS ผลการทดลองพบว่าช่วงความเป็นเส้นตรงที่วิเคราะห์ได้อยู่ในช่วง 10-10,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า

%Recovery เฉลี่ยของการสกัดเท่ากับ 69.99 % (%CV = 5.05) วิธีการที่พัฒนาขึ้นนำมาใช้ในการศึกษาชีวสมมูลของยาแคปซูลพรีกาบาลินขนาด 150 มิลลิกรัม

แทง; และคนอื่นๆ (Tang; et al. 1999: 125-129) ได้ศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกาบาเพนตินในตัวอย่างซีรั่มของมนุษย์โดยใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์และเตรียมตัวอย่างโดยใช้วิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วย MeOH แล้วนำสารละลายใสที่ได้มาทำให้เกิดอนุพันธ์กับ OPA ผลการทดลองพบว่าช่วงความเข้มข้นที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้ คือ 0.1-10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการวิเคราะห์ซ้ำ (Repeatability) ให้ค่า %CV น้อยกว่า 6% ค่า %Recovery ที่ได้จากการสกัดอยู่ในช่วง 96.2-103.9%

เวอเมจ; และ อีเดลโบร็ค (Vermeij; & Edelbroek. 2004: 297-303) ได้ศึกษาวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์สารผสมพรีกาบาลิน กาบาเพนตินและวิกาบาทรินในตัวอย่างซีรั่มของมนุษย์ใช้วิธีการสกัดพรีกาบาลินออกจากซีรั่มด้วยสารละลาย 20%TCA ในการตกตะกอนโปรตีนและนำส่วนใสมาทำให้เกิดอนุพันธ์ก่อนที่จะนำสารนั้นไปแยกในคอลัมน์ (Pre-Column derivatization) ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์และจากผลการทดลองพบว่าโครมาโทแกรมไม่มีสารรบกวนเกิดขึ้นในตำแหน่งของยาแต่ละชนิดและตรงตำแหน่งของสารมาตรฐานภายในและได้ %Recovery ใกล้เคียง 100%

เดอจาส์วานี; กูรูพาดาย์ยา; และ ราจา (Thejaswini; Gurupadayya;& Raja. 2012: 3112-3115) ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์พรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมา ด้วยเทคนิคแกสโครมาโทกราฟีและเตรียมตัวอย่างด้วยการเติม 10% Orthophosphoric acid ในพลาสมา แล้วศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ ACN, MeOH, Ethylchloroformate, Pyridine และ Chloroform แล้วทำให้เกิดอนุพันธ์กับ Ethylchloroformate เพื่อให้เกิดเป็นสารระเหยได้แล้วทำการตรวจวัดด้วย Flame ionization detector (FID) ผลการทดลองพบว่าการใช้ ACN ในการตกตะกอนโปรตีนไม่มีสารรบกวนการวิเคราะห์จากตัวอย่างพลาสมาเกิดขึ้นและให้ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 96.75-102.4% (%CV อยู่ในช่วง 1.65-3.78%)

จากการทบทวนวรรณกรรมเพื่อศึกษาการสกัดพรีกาบาลินออกจากพลาสมาด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีน พบว่าปัจจุบันสารที่นิยมนำมาใช้ในการตกตะกอนโปรตีน ได้แก่ ACN, MeOH และ TCA

4. การใช้สาร 4-Chloro-7-Nitrobenzofurazan ในการทำให้เกิดอนุพันธ์กับพรีกาบาลินและกาบาเพนติน

4.1 การเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ (Derivatization)

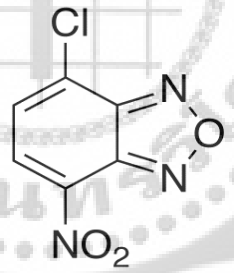
สารบางชนิดไม่สามารถตอบสนองต่อตัวตรวจวัดของ HPLC หรือมีการตอบสนองต่ำจนไม่สามารถตรวจวัดได้จึงจำเป็นต้องเตรียมเป็นสารประกอบตัวใหม่เพื่อทำให้มีหมู่ฟังก์ชันที่ตอบสนองต่อเครื่องตรวจวัดเรียกว่าสารอนุพันธ์ (Derivatizative) ในการเตรียมสารอนุพันธ์จะใช้สารที่

ต้องการวิเคราะห์ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารที่มีหมู่ฟังก์ชันที่มีสภาพไวต่อการตรวจวัด เรียกว่า Derivatizing agent เกิดเป็นสารประกอบใหม่ซึ่งมีสมบัติต่างไปจากสารเดิม เช่น การดูดกลืนแสง การวาวแสง ในการเตรียมสารอนุพันธ์สามารถทำได้ก่อนนำสารเข้าสู่คอลัมน์เพื่อให้เกิดการแยก เรียกว่า Pre-Column derivatization หรือทำหลังจากสารออกจากคอลัมน์แยกสาร เรียกว่า Post-Column derivatization (แม้น อมรสิทธิ์; และคนอื่นๆ. 2555: 435)

4.2 4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน (4-Chloro-7-Nitrobenzofurazan)

คุณสมบัติของ 4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน

4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน (NBD-Cl) เป็นรีเอเจนต์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายกับยาที่ในโครงสร้างมีหมู่เอมีน (Amine group) เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจวัดให้ดีขึ้น หรือทำให้เกิดโครโมฟอร์และฟลูออโรฟอร์ที่สามารถถูกตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดยูวี-วิสิเบิลและฟลูออเรสเซนต์ได้ (Elbashir; Suliman; & Aboul-Enein. 2011: 222-241) NBD-Cl มีชื่อตาม IUPAC Name คือ 4-Chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole มีชื่อพ้อง (Synonyms) คือ 7-Chloro-4-nitrobenzofurazan หรือ 7-Chloro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazole เป็นต้น มีโครงสร้างทางเคมีดังภาพประกอบ 5 มีสูตรโมเลกุล $C_6H_2ClN_3O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 199.551 มีลักษณะเป็นของแข็ง ผงละเอียดสีเหลืองอ่อน สามารถละลายได้ใน Dimethyl sulfoxide, Dimethyl formamide, MeOH, ACN และ Chloroform (FluoProbes®. 2012: Online)



ภาพประกอบ 5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ NBD-Cl

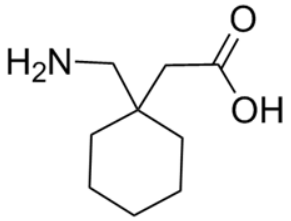
ที่มา: FluoProbes®. (2012: Online).

4.3 กาบาเพนติน

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของกาบาเพนติน

กาบาเพนติน มีชื่อทางเคมี (Chemical name) คือ 1-(Aminomethyl) cyclohexaneacetic acid มีสูตรโมเลกุล (Molecular formula) $C_9H_{17}NO_2$ โดยมีน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight) เท่ากับ 171.24 มีค่า pKa1 เท่ากับ 3.7 และ pKa2 เท่ากับ 10.7 สมบัติทางเคมีกายภาพ (Physicochemical properties) เป็นผลึกของแข็ง สีขาว เป็นสารประกอบที่มีขั้ว สามารถ

ละลายได้ดีในน้ำ โครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่แสดงความเป็นกรด คือ Carboxylic (-COOH) และหมู่ฟังก์ชันที่แสดงความเป็นเบส คือหมู่ Primary amine (-NH_2) ดังแสดงใน ภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 แสดงโครงสร้างทางเคมีของกาบาเพนติน

ที่มา: Pubchem Compound. (2005: Online)

4.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการวิเคราะห์พรีกาบาลินและกาบาเพนตินโดยใช้ NBD-Cl

โครงสร้างทางเคมีของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินมีหมู่ Primary amine อยู่ในโครงสร้างจึงสามารถทำปฏิกิริยากับสาร NBD-Cl เพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่สามารถเรืองแสงฟลูออเรสซนต์ได้

จากการศึกษาข้อมูลย้อนหลังพบว่าเคยมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์พรีกาบาลินโดยใช้ NBD-Cl เป็น Derivatizing agent เพียง 1 รายงานโดย โอนอล; และ แซกกิร์ลี (Onal ;& Sagirli. 2009: 68-71) ได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินในตัวอย่างวัตถุดิบยาและยาเม็ดแคปซูลโดยใช้ NBD-Cl เป็น Derivatizing agent เพื่อทำให้พรีกาบาลินเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น Fluorogenic และ Chromogenic ส่งผลให้สามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค Spectrofluorometry และ Spectrophotometry โดยจากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดอนุพันธ์พบว่าอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นมีความคงตัวนาน 12 ชั่วโมง และวิธีดังกล่าวสามารถใช้ในการวิเคราะห์พรีกาบาลินในช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเท่ากับ 0.5-7.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อวิเคราะห์ด้วยใช้เทคนิค Spectrophotometry และ 40-400 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อวิเคราะห์โดยใช้ Spectrofluorimetry เมื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Spectrophotometry และ Spectrofluorometry ที่พัฒนาขึ้นพบว่าได้ค่า %Recovery เท่ากับ 99.93% และ 99.96% ตามลำดับ จากการศึกษางานวิจัยนี้พบว่าอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นมีความคงตัวดี และสามารถนำมาวิเคราะห์ได้ทั้งเทคนิค Spectrophotometry และ Spectrofluorometry โดยเทคนิค Spectrofluorometry ให้ความไวในการวิเคราะห์สูงกว่า แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ก็ยังไม่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์สารผสมได้ จึงสนใจนำเฉพาะวิธีการเตรียมตัวอย่างไปประยุกต์ใช้กับเทคนิค HPLC เพื่อให้สามารถวิเคราะห์พรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมาได้

NBD-Cl ถูกนำมาใช้เป็น Derivatizing agent ในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกาบาเพนตินโดยจากรายงานวิจัยของ บาฮรามี; และมูฮัมมาดี (Bahrami ;& Mohammadi. 2006: 24-28) ได้ศึกษาวิธีการวิเคราะห์กาบาเพนตินในตัวอย่างซีรั่มของมนุษย์โดยใช้เทคนิค HPLC เพิ่มความไวด้วยการทำให้เกิดอนุพันธ์กับ NBD-Cl ในสภาวะที่เป็นเบส (พีเอช 11) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที อนุพันธ์มีความคงตัวอย่างน้อย 24 ชั่วโมง และทำการแยกด้วยคอลัมน์ C_{18} ตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์ ใช้ความยาวคลื่นในการเกิด Excitation ที่ 470 นาโนเมตรและความยาวคลื่นในการเกิด Emission ที่ 537 นาโนเมตรตามลำดับ ขีดจำกัดการวิเคราะห์ 0.002 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถวิเคราะห์ความเป็นเส้นตรงได้ในช่วง 0.002-15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษางานวิจัยนี้พบว่ากาบาเพนตินสามารถเกิดปฏิกิริยากับ NBD-Cl เป็นสารอนุพันธ์ที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับอนุพันธ์ระหว่างพรีกาบาลินกับ NBD-Cl โดยมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาที่เหมือนกัน ทำให้สามารถนำกาบาเพนตินมาใช้เป็นสารมาตรฐานภายในของระบบการวิเคราะห์ได้

5. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

5.1 ความหมายของ Method validation

Method validation หมายถึง เป็นกระบวนการตรวจสอบความถูกต้องและความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นก่อนนำวิธีวิเคราะห์นั้นมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำ คงทน และช่วยให้ทราบถึงคุณสมบัติ เงื่อนไข หรือข้อจำกัดของวิธีวิเคราะห์นั้นๆ (เอกวรรณ อยู่สกุล. 2556: 17)

5.2 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ตามมาตรฐานองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration. 2013: Online) และองค์การยาแห่งสหภาพยุโรป (European Medicines Agency. 2011: Online) มีข้อกำหนดว่าก่อนดำเนินการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงให้ทำการตรวจสอบความถูกต้องหรือความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น โดยตรวจสอบตามค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

1. ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity หรือ Selectivity)

หมายถึง การทดสอบความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการวิเคราะห์แยกตัวอย่างที่ต้องการศึกษาออกจากตัวอย่างชีวภาพ ซึ่งมีส่วนประกอบที่อาจไปรบกวนผลการวิเคราะห์ได้

เกณฑ์การยอมรับ: ผลการวิเคราะห์ต้องตรวจไม่พบสิ่งรบกวนที่ตำแหน่งเดียวกับสารที่ต้องการตรวจวัด

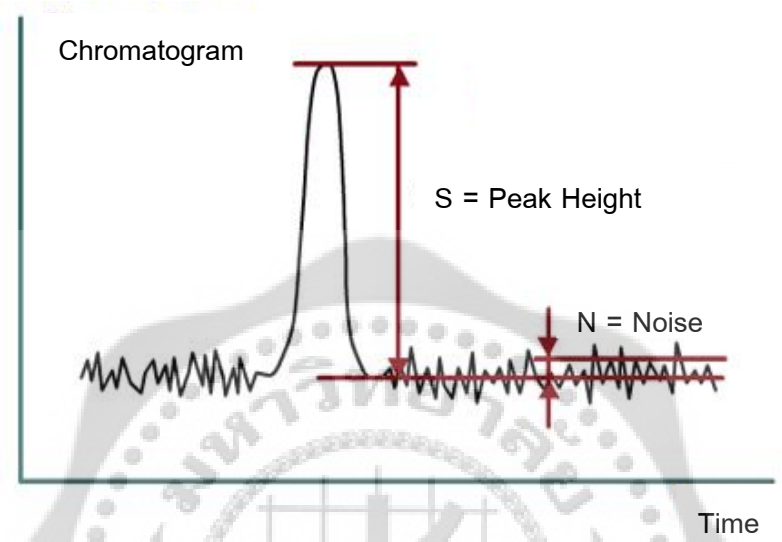
2. ขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ (Lower limit of quantification, LLOQ)

หมายถึง การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณได้

เกณฑ์การยอมรับ: ต้องเป็นความเข้มข้นที่ให้ค่า Signal to noise ≥ 5

วิธีการคำนวณ

$$\text{S/N ratio} = \frac{\text{Peak Height of pregabalin}}{\text{Noise in RMS}}$$



ภาพประกอบ 7 แสดงหลักการหาค่า Signal to noise

ที่มา: Shimadzu. (2014: Online).

3. ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

หมายถึง กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคของสารที่ต้องการตรวจวัดกับสารมาตรฐานภายใน (Area ratio) โดยความเข้มข้นที่ใช้เป็นจุดของกราฟมาตรฐานต้องไม่ต่ำกว่า 6 จุดความเข้มข้นและจุดความเข้มข้นต่ำสุดต้องเป็นความเข้มข้นที่ระดับ LLOQ

เกณฑ์การยอมรับ: แสดงค่าเป็น Coefficient determination (R^2) ซึ่งต้องมีค่ามากกว่า 0.990 และความเข้มข้นแต่ละจุดของกราฟมาตรฐานต้องให้ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 85-115% ยกเว้นที่ความเข้มข้น LLOQ ต้องอยู่ในช่วง 80-120%

4. ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

หมายถึง ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่วัดค่าได้ใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุด

เกณฑ์การยอมรับ: แสดงค่าเป็น %Recovery ต้องอยู่ในช่วง 85-115% ยกเว้นที่ความเข้มข้น LLOQ ต้องอยู่ในช่วง 80-120%

5. ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

หมายถึง ความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำหลายๆ ครั้ง โดยการทดสอบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกัน (Intra day) และระหว่างวัน (Inter day) เกณฑ์การยอมรับแสดงค่าเป็น %CV ต้องไม่เกิน 15% ยกเว้นที่ความเข้มข้น LLOQ ต้องไม่เกิน 20%

6. ค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของวิธีการสกัด (%Recovery)

หมายถึง การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดว่าวิธีการสกัดที่ใช้สามารถสกัดตัวอย่างที่ต้องการศึกษาออกมาจากตัวอย่างชีวภาพได้อย่างสม่ำเสมอ แม่นยำและสามารถทำซ้ำได้

เกณฑ์การยอมรับ: แสดงค่าเป็น %Recovery ของการสกัด ซึ่ง %Recovery ไม่จำเป็นต้องเท่ากับ 100% แต่ควรมีความคงที่ แม่นยำ

7. การทดสอบความคงตัว (Stability)

7.1 การทดสอบความคงตัวของอนุพันธ์ (Post-preparative stability)

ทดสอบความคงตัวของอนุพันธ์เมื่อตั้งทิ้งไว้ในเครื่องฉีดสารอัติโนมัติตามอุณหภูมิที่กำหนดเพื่อรอการวิเคราะห์ เกณฑ์การยอมรับ ค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ต้องเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 15%

7.2 การทดสอบความคงตัวต่อการแช่แข็ง-ละลาย (Freeze & Thaw stability)

ทดสอบความคงตัวของพรีกาบาลินในพลาสมาที่เตรียมแล้วนำตัวอย่างดังกล่าวจัดเก็บที่อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างทดสอบ ให้เกิดการแข็งตัวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เกิดการละลาย (เท่ากับ 1 รอบ) เป็นจำนวน 3 รอบ เกณฑ์การยอมรับค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ต้องเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 15% เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้น

7.3 ความคงตัวในระยะสั้น (Short term stability)

ทดสอบความคงตัวของพรีกาบาลินในพลาสมาที่เตรียมขึ้น แล้วนำตัวอย่างดังกล่าวจัดเก็บที่อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างทดสอบให้เกิดการแข็งตัวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาละลายโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาที่ 0, 3 และ 6 ชั่วโมง เกณฑ์การยอมรับค่าความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ต้องเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 15% เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้น

7.4 การทดสอบความคงตัวของสารละลายมาตรฐาน (Stock-solution stability)

ทดสอบความคงตัวของสารละลายมาตรฐานตามสภาวะที่จัดเก็บและวิเคราะห์เปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของ Stock solution ที่เก็บไว้ตามระยะเวลาที่กำหนดกับพื้นที่ใต้พีคของ Stock solution ที่เตรียมขึ้นใหม่ เกณฑ์การยอมรับ ค่าพื้นที่ใต้พีคของ Stock solution ที่เก็บไว้ต้องเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 5%

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี (Materials, Instrument and Reagents)

1.1 สารเคมี

1. สารมาตรฐาน

Pregabalin	HETERO DRUGS LIMITED, India
Gabapentin	HIKAL, India

2. สารเคมีอื่นๆ ที่ใช้

4-Chloro-7-nitrobenzofurazan (analytical grade)	Sigma-Aldrich, Germany
Boric acid (analytical grade)	BDH Chemicals Ltd., Poole, England
Potassium chloride (analytical grade)	Merck, Germany
Sodium hydroxide (analytical grade)	Merck, Germany
Hydrochloric acid 37% (analytical grade)	Merck, Germany
di-Potassium hydrogen phosphate (analytical grade)	Merck, Germany
Potassium di-hydrogen phosphate (analytical grade)	Merck, Germany
di-Sodium hydrogen phosphate (analytical grade)	Merck, Germany
Sodium di-hydrogen phosphate (analytical grade)	Merck, Germany
o-Phosphoric acid 85%(analytical grade)	Merck, Germany
Acetonitrile (HPLC grade)	Merck, Germany
Methanol (HPLC grade)	Merck, Germany
Trichloroacetic acid (analytical grade)	Merck, Germany
พลาสมา	สภากาชาดไทย, ประเทศไทย

1.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Shimazu รุ่น 10A บริษัท Shimadzu Corporation, KYOTO, Japan ซึ่งประกอบด้วย

- Column Oven : CTO-10AVP
- Detector : RF-10AXL (Xenon lame)
- Auto sampler : SIL-20ACHT
- Pump : LC-10ADVP
- System controller : SCL-10AVP
- โปรแกรมที่ใช้เป็นคำสั่งในการวิเคราะห์และประมวลผล คือ LC solution software

เครื่องหมุนเหวี่ยง	Hettich Zentrifugen/Andreas HeHich GmbH&Co.Hg, Germany
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Sartorious, Germany
เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง	Sartorious, Germany
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	SCHOTT/Schott-GerategbbH, Germany
ตู้อบ	Memmert/Memmert GmbH+Co.Kg, Schwabach, Germany
ตู้เย็น 0-4 องศาเซลเซียส	Sunyo, Thailand
ตู้แช่แข็ง – 30 องศาเซลเซียส	Sunyo Electric Biomedical Co.,Ltd., Japan
เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์	ELgA/Vivendi Water Systems ltf., Benelux, USA
Autopipette	Accumax PRO/TUV NORD,TUV India Privvate Ltd., India
Vortex	Mixer Uzusio/ScientificIndustries, INC, USA
HPLC column (C_{18}, 250 ×4.6 mm, 5 µm)	Phenomenex, USA
Guard column (C_{18} , 4.0×10 mm, 5 µm)	Inertsil, USA
Filter cellulose acetate (ขนาด 0.2 µm)	Whatman Limited Maidstone, England
Nylon membrane filter (ขนาด 0.2 µm)	Whatman Limited Maidstone, England

2. การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในงานวิจัย

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของพรีกาบาลิน

เตรียม Stock solution ของพรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร โดยชั่งพรีกาบาลิน น้ำหนัก 0.01003 กรัม ละลายด้วยน้ำและปรับปริมาตรให้ครบ 10.0 มิลลิตร ในขวดปรับปริมาตรจากนั้นเตรียมสารมาตรฐานของพรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 200, 120, 60, 30, 15, 4, 1 และ 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานและเตรียมสารมาตรฐานของพรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 150, 100 และ1.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับทำชุดตัวอย่างควบคุมคุณภาพ โดยทำ Serial dilution ดังนี้

1. ปิเปต Stock solution ของพรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10.0 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. ปิเปต Stock solution ของพรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 1.2 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10.0 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. ปิเปตสารละลายพรีกาบาลินความเข้มข้น 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10.0 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. ปิเปตสารละลายพรีกาบาลินความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10.0 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5. ปิเปตสารละลายพรีกาบาลินความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10.0 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6. ปิเปตสารละลายพรีกาบาลินความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 200 ไมโครลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10.0 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. ปิเปตสารละลายพรีกาบาลินความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 2.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10.0 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

8. ปิเปตสารละลายพรีกาบาลินความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10.0 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

9. ปิเปต Stock solution ของพรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10.0 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

10. ปิเปตสารละลายพรีกาบาลินความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10.0 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

11. ปิเปตสารละลายพรีกาบาลินความเข้มข้น 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 100 ไมโครลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10.0 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 การเตรียมตัวอย่างพรีกาบาลินในพลาสมา

เตรียม Blank plasma 200 ไมโครลิตรและเติมสารละลายมาตรฐานของพรีกาบาลินความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 ความเข้มข้นละ 10 ไมโครลิตร ลงใน Blank plasma หากต้องการเตรียมตัวอย่างพรีกาบาลินในพลาสมาที่ปริมาตรมากกว่าที่ระบุไว้ให้คำนวนโดยใช้วิธีเทียบบัญญัติไตรยางศ์กับปริมาตรเริ่มต้น

2.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกาบาเพนตินความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน

เตรียม Stock solution ของกาบาเพนติน โดยชั่งสารปริมาณ 0.00375 กรัม ละลายด้วยน้ำและปรับปริมาตรให้ครบ 50.0 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

2.4 การเตรียมสารละลาย NBD-Cl ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง NBD-Cl ปริมาณ 0.75 กรัม ใส่ใน ขวดปรับปริมาตร ละลายด้วย ACN และปรับปริมาตรให้ครบ 25.0 มิลลิลิตร

2.5 การเตรียมสารละลาย borate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ชั่ง Boric acid น้ำหนัก 0.62 กรัม และ Potassium chloride (KCl) น้ำหนัก 0.75 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรอันเดียวกัน ละลายด้วยน้ำและปรับปริมาตรจนครบ 100.0 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วย o-Phosphoric acid หรือ NaOH ให้ได้พีเอชตามต้องการ

2.6 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ได้แก่ KH_2PO_4, K_2HPO_4, NaH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

1. ชั่ง KH_2PO_4, K_2HPO_4, NaH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 น้ำหนัก 2.7216, 3.4836, 2.3996 และ 2.8392 กรัม ตามลำดับ

2. ละลายสารแต่ละชนิดด้วยน้ำและปรับปริมาตรให้ครบ 1.0 ลิตร ในขวดปรับปริมาตร

3. ปรับพีเอชของสารละลายด้วย o-Phosphoric acid หรือ Sodium hydroxide ให้ได้พีเอชตามต้องการ

4. กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง (Membrane filter) ที่มีขนาดของ Pore size ไม่เกิน 0.45 ไมโครเมตรและกำจัดฟองอากาศด้วย Sonicator เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที

5. ในกรณีที่ต้องการเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้นหรือปริมาตรอื่น ให้คำนวนโดยใช้วิธีเทียบบัญญัติไตรยางศ์กับปริมาณสารเดิมที่ระบุไว้

2.7 การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 2 โมลาร์

ตวงสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 16.67 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำและปรับให้มีปริมาตร 100.00 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

2.8 การเตรียมสารละลาย TCA ความเข้มข้น 20% w/v

ชั่ง TCA น้ำหนัก 1 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร ละลายด้วยน้ำและปรับปริมาตรให้ครบ 5.00 มิลลิลิตร

3. วิธีการทดลอง (Methods)

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณพรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมา แบ่งออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่

- ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสาร
- ศึกษาการสกัดพรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีน
- ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำอนุพันธ์กับ NBD-Cl ตลอดจนการหยุดปฏิกิริยา
- ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นโดยประเมินผลตามเกณฑ์การยอมรับของ US FDA guideline 2013 และ EMEA guideline 2011

3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสาร

เกณฑ์มาตรฐานของค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่เหมาะสมในการแยกสาร ได้แก่ Resolution >2, Tailing factor ≤ 2 และ Theoretical plates (N) >2000

3.1.1 วิธีการเตรียมตัวอย่าง

วิธีการเตรียมตัวอย่างดัดแปลงมาจากวิธีของ โอนอล; และ แซกกิร์ลี (Onal A.; & Sagirli O. 2009: 68-71) และวิธีการตกตะกอนโปรตีนดัดแปลงมาจากวิธีของ เวีย์ดยา; และคนอื่นๆ (Vaidya; et al. 2007: 925-928) โดยมีขั้นตอน ดังนี้

1. ปิเปตพลาสมา 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายพรีกาบาลินความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเติมสารละลายกาบาเพนตินความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง (หรือใช้ KH_2PO_4 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ แทนพลาสมาในกรณีที่ไม่สกัด)

2. เติม ACN ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน 20 วินาทีและปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที

3. นำส่วนของสารละลายใสที่ได้มาเติม Borate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 9.5 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติม NBD-Cl ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปิดปากหลอดด้วยฟรอยด์นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

4. นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม HCl ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำสารที่เตรียมได้ไปตรวจวัดระดับพรีกาบาลินด้วยเครื่อง HPLC

สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- อัตราการไหล : 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที
- ตัวตรวจวัดสัญญาณ : Fluorescence detector (460-558 นาโนเมตร)
- คอลัมน์ : Phenomenex C_{18} (250 มิลลิลิตร × 4.6 มิลลิลิตร)
- อุณหภูมิ Auto sampler : 20 องศาเซลเซียส
- อุณหภูมิ Oven : 40 องศาเซลเซียส
- ปริมาตรที่ใช้ในการฉีด : 50 ไมโครลิตร

3.1.2 การศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

1. นำตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยมีการเปลี่ยนแปลงชนิดของเฟสเคลื่อนที่ซึ่งชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่นำมาใช้ในการศึกษา คือตัวทำละลายอินทรีย์ กับ Phosphate buffer (โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ Phosphate buffer เท่ากับ 20 มิลลิโมลาร์, พีเอช เท่ากับ 2.5 และอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 50 : 50 ปริมาตรต่อปริมาตร เป็นตัวแปรคงที่)

- ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ ACN และ MeOH
- Phosphate buffer ได้แก่ K_2HPO_4, KH_2PO_4, NaH_2PO_4 และ Na_2HPO_4

2. การเลือกชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมจะพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ Retention time, Resolution, Tailing factor และ Theoretical plate ที่ได้เปรียบเทียบกันตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้

3.1.3 การศึกษาความเข้มข้นของ Phosphate buffer ที่เหมาะสม

1. จากการศึกษาในข้อ 3.1.2 เมื่อได้ชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมแล้ว กำหนดชนิดของเฟสเคลื่อนที่ให้คงที่และทำการทดลองเหมือนข้อ 3.1.2 แต่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Phosphate buffer เป็น 5, 10, 20 และ 50 มิลลิโมลาร์

2. การเลือกความเข้มข้นของ Phosphate buffer ที่เหมาะสม จะพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ Retention time, Resolution, Tailing factor และ Theoretical plate ที่ได้เปรียบเทียบกัน ตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้

3.1.4 การศึกษาพีเอชของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

1. จากการศึกษาในข้อ 3.1.3 เมื่อได้ความเข้มข้นของ Phosphate buffer ที่เหมาะสมแล้วให้กำหนดค่าที่ได้ให้คงที่และทำการทดลองเหมือนข้อ 3.1.3 แต่มีการเปลี่ยนแปลงพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เป็นพีเอช 2.5, 3, 4, 5 และ 7

2. การเลือกพีเอชของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมจะพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ Retention time, Resolution, Tailing factor และ Theoretical plate ที่ได้เปรียบเทียบกันตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้

3.1.5 ศึกษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

1. จากการศึกษาในข้อ3.1.4 เมื่อได้ pH ของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมแล้วกำหนดค่าที่ได้ให้คงที่ และทำการทดลองเหมือนข้อ 3.1.4 แต่มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ : Phosphate buffer ให้เป็น 40 : 60, 45 : 55, 50 : 50, 55 : 45 และ 60 : 40

2. การเลือกอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ Peak area, Retention time, Resolution, Tailing factor และ Theoretical plate ที่ได้เปรียบเทียบกันตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้

3.2 ศึกษาการสกัดพรีกาบาลินออกจากตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีน

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสารตามการทดลองในข้อ 3.1 แล้วให้ใช้สภาวะดังกล่าวสำหรับการวิเคราะห์ในหัวข้อต่อไปนี้

3.2.1 ศึกษาชนิดของสารที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

1. เตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 โดยมีการเปลี่ยนชนิดของสารที่ใช้ในการตกตะกอน ได้แก่ ACN, MeOH และ TCA ความเข้มข้น 20%

2. ชนิดของสารที่เหมาะสมจะพิจารณาจากค่า %Recovery ของการสกัดพรีกาบาลินและ %RSD

วิธีการคำนวณหาค่า %Recovery และ %RSD จากสูตร

$$\%\text{Recovery ของการสกัด} = \frac{\text{พื้นที่ใต้พีคของยาในพลาสมา}}{\text{พื้นที่ใต้พีคของยาในสารละลาย}} \times 100$$

$$\%\text{RSD} = (\text{SD} / \text{Mean}) \times 100$$

3.2.2 ปริมาณสารที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

1. จากการศึกษาใน 3.2.1 เมื่อได้ชนิดของสารที่ใช้ในการตกตะกอนที่เหมาะสมแล้วกำหนดให้คงที่ และทำการทดลองเหมือนข้อ 3.2.1 แต่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารที่ใช้ในการ

สกัดโดยอัตราส่วนที่ได้ทำการศึกษา คือ ปริมาณพลาสมา : ปริมาณสารที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 1 : 2, 1 : 2.5, 1 : 3 และ 1 : 3.5

2. ปริมาณสารที่ใช้ในการตกตะกอนที่เหมาะสมในการสกัดจะพิจารณาจากค่า %Recovery ของการสกัดพรีกาบาลินและ %RSD

3.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำอนุพันธ์กับ NBD-Cl และการหยุดปฏิกิริยา

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์พรีกาบาลินโดยใช้เทคนิค HPLC จากข้อ 3.1 และการสกัดพรีกาบาลินออกจากตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนจากข้อ 3.2 ให้นำผลที่ได้มาใช้ในการวิเคราะห์หัวข้อต่อไปนี้

3.3.1 ศึกษาความเข้มข้นของ HCl ที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา

1. ศึกษาความเข้มข้นของ HCl ที่สามารถหยุดปฏิกิริยาได้โดยเติม HCl ลงในตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 0, 0.01, 0.02 และ 0.03 โมลาร์ แล้วนำไปวิเคราะห์ทันทีเปรียบเทียบกับตัวอย่างหลังหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดแล้วตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงสังเกตการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ใต้พีค

2. เกณฑ์การพิจารณาโดยเลือกความเข้มข้นของ HCl ที่ให้ร้อยละการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ใต้พีคของอนุพันธ์น้อยที่สุดเมื่อทิ้งสารอนุพันธ์หลังหยุดปฏิกิริยาแล้ว 1 ชั่วโมง

วิธีการคำนวณหาค่า %Change จากสูตร

$$\%Change = 100 - \left(\frac{\text{พื้นที่ใต้พีคหลังหยุดปฏิกิริยาแล้ว 1 ชั่วโมง} \times 100}{\text{พื้นที่ใต้พีคที่วิเคราะห์หลังหยุดปฏิกิริยาทันที}} \right)$$

3.3.2 ศึกษาปริมาณสาร NBD-Cl ที่เหมาะสม

1. จากการศึกษาในข้อ 3.3.1 เมื่อหาความเข้มข้นของ HCl ที่สามารถหยุดปฏิกิริยาได้แล้ว กำหนดค่าที่ได้ให้คงที่และทำการทดลองเหมือนข้อ3.3.1 แต่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณสาร NBD-Cl เป็น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 ไมโครลิตร

2. ปริมาณ NBD-Cl ที่เหมาะสม พิจารณาจากพื้นที่ใต้พีคของอนุพันธ์ระหว่างพรีกาบาลินกับ NBD-Cl ที่ให้ค่ามากที่สุด แต่ใช้ปริมาณสาร NBD-Cl น้อยที่สุด

3.3.3 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

1. จากการศึกษาปริมาณสาร NBD-Cl ในหัวข้อ 3.3.2 เมื่อได้ปริมาณสารที่เหมาะสมในการเกิดอนุพันธ์แล้วให้กำหนดปริมาณสาร NBD-Cl ให้คงที่และทำการทดลองเหมือนข้อ 3.3.2 แต่เปลี่ยนแปลงพีเอชเป็น 8, 9, 10, 11, 12 และ 13

2. พีเอชที่เหมาะสมพิจารณาจากพื้นที่ใต้พีคของอนุพันธ์ระหว่างพรีกาบาลินกับ NBD-Cl มีค่ามากที่สุด

3.3.4 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา Derivatization

1. จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาจากหัวข้อ 3.3.3 แล้วให้กำหนดพีเอชให้คงที่ ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.3.3 แต่เปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการให้อุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียสเป็น 5, 10, 15, 20 และ 25 นาที

2. เวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพิจารณาจากเวลาที่ทำให้พื้นที่ใต้พีคของอนุพันธ์ระหว่างพรีกาบาลินกับ NBD-Cl มีค่ามากที่สุด โดยใช้เวลาน้อยที่สุดและตัวอย่างไม่เสียสภาพเมื่อให้ความร้อนนานเกินไป

3.4 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

นำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ตามข้อกำหนดและเกณฑ์การยอมรับดังนี้

1. Specificity / Selectivity

สกัดและวิเคราะห์ Blank plasma จำนวน 6 ตัวอย่างที่แตกต่างกัน โดยผลการวิเคราะห์ Blank plasma ทั้ง 6 ตัวอย่างต้องไม่พบพีคที่เวลาเดียวกับพีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินจึงสามารถนำ Blank plasma นั้นมาใช้ในการวิเคราะห์ได้

2. Lower limit of quantification (LLOQ)

สกัดและวิเคราะห์พรีกาบาลินใน Blank plasma ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ระดับความเข้มข้น LLOQ จำนวน 5 ตัวอย่าง แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณค่า Signal to noise โดยใช้โปรแกรม LC solution ซึ่งนำค่า Peak height ของพรีกาบาลินเทียบกับสัญญาณรบกวน (Noise)

วิธีการคำนวณหาค่า Signal to noise จากสูตร

$$\text{S/N ratio} = \frac{\text{Peak Height of Pregabalin}}{\text{Peak Height of Noise}}$$

3. Linearity

ทำการสกัดและวิเคราะห์พรีกาบาลินใน Blank plasma ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ความเข้มข้น 8 ระดับ โดยความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟมาตรฐานเป็นความเข้มข้นที่ระดับ LLOQ แล้วหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) ระหว่างสัญญาณ กับความเข้มข้นของยาที่ระดับต่างๆ และคำนวณหาสมการเส้นตรง ($y = mx+c$) และค่า Coefficient of determination (r^2) ด้วยโปรแกรม LC solution จากนั้นทำการวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวันเป็นจำนวน 5 วัน นำจุดความเข้มข้นแต่ละจุดของกราฟมาตรฐานมาคำนวณค่า %Recovery และ %CV

วิธีการคำนวณหาค่า %Recovery และ %CV จากสูตร

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ค่าความเข้มข้นของพรีกาบาลินที่วัดได้}}{\text{ค่าความเข้มข้นของพรีกาบาลินที่แท้จริง}} \times 100$$

$$\% \text{ CV} = \frac{\text{Standard Deviation}}{\text{Mean}} \times 100$$

การกำหนดความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ ความเข้มข้นต่ำ (Low quality control ; LQC), ความเข้มข้นกลาง (Medium quality control ; MQC) และความเข้มข้นสูง (High quality control ; HQC) ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานเพื่อใช้เป็นตัวแทนในการตรวจสอบหัวข้อการทดสอบพารามิเตอร์ต่างๆ ตามข้อกำหนด โดยกำหนดความเข้มข้นที่จุดต่ำ (Low) คือ ความเข้มข้นที่เท่ากับ 3 เท่าของ LLOQ (60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ความเข้มข้นที่จุดกลาง (Medium) คือ ความเข้มข้นที่เท่ากับ 50% ของกราฟมาตรฐาน (5000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และความเข้มข้นที่จุดสูง (High) คือ ความเข้มข้นที่เท่ากับ 75% ของกราฟมาตรฐาน (7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

4. Accuracy

ทำการสกัดและวิเคราะห์พรีกาบาลินใน Blank plasma โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ LLOQ, ต่ำ (LQC), กลาง (MQC) และ สูง (HQC) ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่างภายในวันเดียวกันและระหว่างวันเป็นเวลา 3 วัน นำผลที่ได้มาคำนวณค่า %Recovery

5. Precision

ทำการสกัดและวิเคราะห์พรีกาบาลินใน Blank plasma โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ LLOQ, ต่ำ (LQC), กลาง (MQC) และ สูง (HQC) ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่างภายในวันเดียวกันและระหว่างวันเป็นเวลา 3 วัน แล้วคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation; CV)

6. Stability

6.1 Post-preparative stability

ทำการสกัดและวิเคราะห์พรีกาบาลินใน Blank plasma ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ ต่ำ (LQC) และสูง (HQC) ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง เปรียบเทียบการวิเคราะห์ความเข้มข้นของตัวอย่างในพลาสมาที่ผ่านกระบวนการสกัดที่เวลาเริ่มต้นกับตัวอย่างที่ตั้งไว้ในเครื่องฉีดสารอัตโนมัติที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำผลที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลง (%Change)

วิธีการคำนวณหาค่า %Change จากสูตร

$$\%\ \text{Change} = 100 - \left(\frac{\text{ความเข้มข้นพรีกาบาลินที่ตั้งไว้ในเครื่องฉีดสารอัติโนมัติ 48 ชั่วโมง} \times 100}{\text{ค่าความเข้มข้นของพรีกาบาลินที่เวลาเริ่มต้น}} \right)$$

6.2 Stock-solution stability

ทำการวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินในสารละลายที่ความเข้มข้นกลาง (MQC) และ Internal standard โดยวิเคราะห์แยกกันจำนวน 3 ตัวอย่างแล้วเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของ Stock solution ที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายที่เตรียมขึ้นใหม่กับ Stock solution ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ 2 สัปดาห์ 3 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ นำผลที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลง

วิธีการคำนวณหาค่า %Change จากสูตร

$$\%\text{Change} = 100 - \left(\frac{\text{พื้นที่ใต้พีค ของ Stock solution ที่เวลาต่างๆ} \times 100}{\text{พื้นที่ใต้พีคของ Stock solution ที่เวลาเริ่มต้น}} \right)$$

6.3 Freeze & Thaw stability

เตรียมตัวอย่างพรีกาบาลินในพลาสมาความเข้มข้น 2 ระดับ คือ ต่ำ (LQC) และสูง (HQC) แล้วทำการสกัดและวิเคราะห์ยาใน Blank plasma ทันทีหลังจากการเตรียมด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่างเปรียบเทียบการวิเคราะห์ความเข้มข้นของตัวอย่างในพลาสมาที่เตรียมขึ้นและถูกจัดเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสให้เกิดการแข็งตัวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เกิดการละลาย (เท่ากับ 1 รอบ) เป็นจำนวน 3 รอบนำผลที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลง

วิธีการคำนวณหาค่า % Change จากสูตร

$$\%\ \text{Change} = 100 - \left(\frac{\text{ความเข้มข้นพรีกาบาลินที่เก็บไว้จำนวน 3 รอบ} \times 100}{\text{ความเข้มข้นพรีกาบาลินที่วิเคราะห์เวลาเริ่มต้น}} \right)$$

6.4 Short term stability

เตรียมตัวอย่างพรีกาบาลินในพลาสมาความเข้มข้น 2 ระดับ คือ ต่ำ (LQC) และสูง (HQC) แล้วทำการสกัดและวิเคราะห์ยาใน Blank plasma ทันทีหลังจากการเตรียม ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่างเปรียบเทียบการวิเคราะห์ความเข้มข้นของตัวอย่างในพลาสมา

ที่เตรียมขึ้นและถูกจัดเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ให้เกิดการแข็งตัวเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและนำมาละลายแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง (ที่เวลา 0 ชั่วโมง คือ เวลาที่ตัวอย่างพลาสมาละลายเป็นของเหลวทั้งหมด) นำผลที่ได้มาคำนวณค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลง

วิธีการคำนวณหาค่า %Change จากสูตร

$$\%\text{Change} = 100 - \left(\frac{\text{ความเข้มข้นพรีกาบาลินที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องที่เวลาต่างๆ} \times 100}{\text{ความเข้มข้นพรีกาบาลินที่วิเคราะห์ที่เวลาเริ่มต้น}} \right)$$

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินในพลาสมา

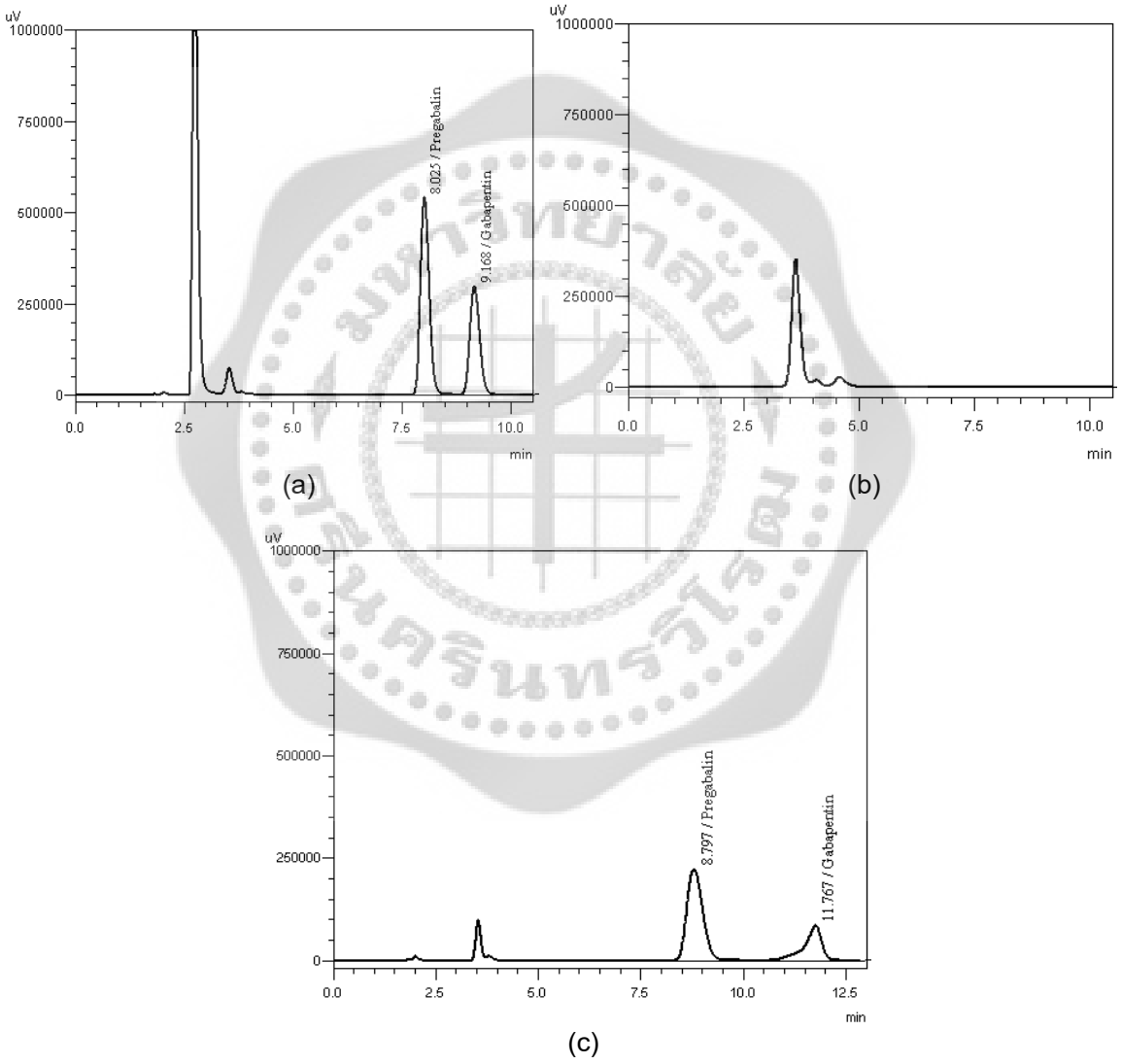
แนวทางในการเลือกความเหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสารพิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ตามเกณฑ์มาตรฐานการยอมรับของ US FDA guideline ได้แก่ Theoretical Plates (N) > 2000, Tailing factor (T) ≤ 2, Resolution (R_S) > 2 (Food and Drug Administration. 1994: Online) และเวลาในการวิเคราะห์น้อย โดยตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ คือ วิธีการสกัดพรีกาบาลินออกจากตัวอย่างพลาสมาดัดแปลงมาจากเวีย์ดยา; และคนอื่นๆ (Vaidya; et al. 2007: 925-928) ส่วนวิธีการทำให้เกิดอนุพันธ์ดัดแปลงมาจากวิธีของ โอนอล; และแซกกิร์ลี (Onal; & Sagirli. 2009: 68-71) ซึ่งสามารถสรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างได้ดังนี้

ปิเปตสารละลายพรีกาบาลินความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และปิเปตสารละลายกาบาเพนตินความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในพลาสมาที่มีปริมาตร 200 ไมโครลิตร (หรือใช้ KH_2PO_4 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.7 แทนพลาสมาในกรณีที่ไม่สกัด) เติม ACN ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน 20 วินาที และปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนของสารละลายใสที่ได้มาทำปฏิกิริยา Derivatization กับ NBD-Cl ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในสภาวะที่เป็นเบสโดยใส่Borate buffer พีเอช 9.5 ความเข้มข้น 0.1โมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติม HCl ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำสารที่เตรียมได้ไปตรวจวัดด้วยเครื่อง HPLC เพื่อดำเนินการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินในพลาสมา

1.1 ชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

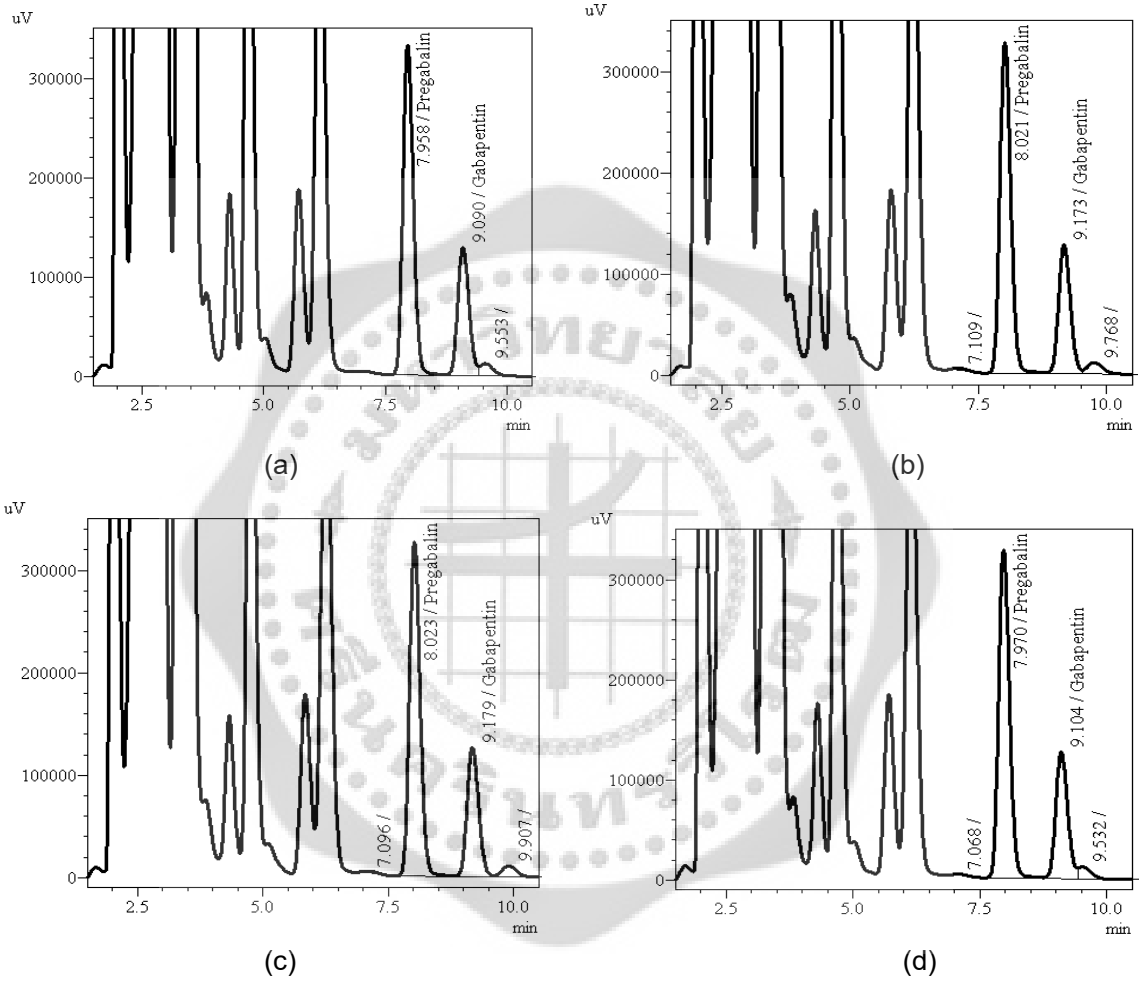
ในการวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินจำเป็นต้องเลือกใช้ชนิดของเฟสเคลื่อนที่ให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ เนื่องจากเฟสเคลื่อนที่เป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถพาสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากคอลัมน์เพื่อทำให้เกิดการแยกได้ดังนั้นจึงได้ศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม โดยชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่นำมาใช้ในการศึกษา คือ เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ ACN และ MeOH ผสมกับเฟสเคลื่อนที่ที่มีขั้ว ได้แก่ H_2O, KH_2PO_4, K_2HPO_4, NaH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตาราง 5, ภาพประกอบ 9 (a), (b) ,(c) และภาพประกอบ 10 (a), (b), (c) และ (d) ในระบบที่วิเคราะห์ตัวอย่างแบบผ่านและไม่ผ่านการสกัดโดย

ถ้าใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็น ACN : KH_2PO_4 เป็นเฟสเคลื่อนที่พบว่าสามารถพาพรีกาบาลินและกาบาเพนตินออกจากคอลัมน์ได้ภายในระยะเวลา10 นาที ดังแสดงในภาพประกอบ 8 (a) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็น MeOH : KH_2PO_4 พบว่าไม่สามารถพาพรีกาบาลินและกาบาเพนตินออกจากคอลัมน์ได้ภายในระยะเวลา 10 นาที ดังแสดงในภาพประกอบ 8 (b) และจากการศึกษา Phosphate buffer ชนิดอื่น ได้แก่ K_2HPO_4, NaH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 พบว่า โครมาโทแกรมไม่แตกต่างจากการใช้ KH_2PO_4 แต่เมื่อเปลี่ยน KH_2PO_4 เป็นน้ำ (H_2O) พบว่าสารเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ช้า ฐานพีคกว้างขึ้น และความสมมาตรของพีคลดลงซึ่งแสดงในภาพประกอบ 8 (c)



ภาพประกอบ 8 แสดงโครมาโทแกรมของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินในระบบที่ไม่ผ่านการสกัด โดย (a) เป็นโครมาโทแกรมที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น ACN : KH_2PO_4, (b) MeOH : KH_2PO_4 และ (c) ACN : H_2O

ในระบบการวิเคราะห์พรีกาบาลินในพลาสมาโดยใช้ Phosphate buffer ต่างชนิดกัน พบว่า Retention time ของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินไม่แตกต่างกัน แต่ถ้าใช้ Phosphate buffer เป็น K_2HPO_4, NaH_2PO_4 และ Na_2HPO_4 ดังแสดงในภาพประกอบ 9 (a), 9(b) และ 9(d) จะมีพีครบกวนการวิเคราะห์ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับกาบาเพนติน ในขณะที่การใช้ KH_2PO_4 สามารถแยกพีคของกาบาเพนตินกับพีครบกวนได้ดังแสดงในภาพประกอบ 9 (c)



ภาพประกอบ 9 แสดงโครมาโทแกรมของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินในพลาสมา โดย

(a) เป็นโครมาโทแกรมที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น ACN : Na_2HPO_4, (b) ACN : NaH_2PO_4,

(c) ACN : KH_2PO_4 และ (d) ACN : K_2HPO_4

จากผลการทดลองในตาราง 5 แสดงให้เห็นว่าการใช้ Phosphate buffer ต่างชนิดกัน ส่งผลให้ค่าพารามิเตอร์ของการแยกสารระหว่างพรีกาบาลินและกาบาเพนตินแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แต่มีผลต่อการแยกกาบาเพนตินออกจากพีครบกวนซึ่งพบว่า KH_2PO_4 เป็น Phosphate buffer ที่สามารถแยกสารรบกวนออกจากกาบาเพนตินได้ดีที่สุด ซึ่งสังเกตได้จากค่า R_S ของกาบาเพนตินที่มีค่ามากที่สุด

ตาราง 5 แสดงค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการวิเคราะห์พรีกาบาลินและกาบาเพนตินโดยใช้ Phosphate buffer ต่างชนิดกัน

พารามิเตอร์	ชนิดของ Phosphate buffer							
	Na_2HPO_4		NaH_2PO_4		KH_2PO_4		K_2HPO_4	
	PGB	GB	PGB	GB	PGB	GB	PGB	GB
RT (นาที)	7.958	9.090	8.021	9.173	8.023	9.179	7.970	9.104
R_S	2.719	0.784	2.787	1.177	2.798	1.484	2.724	0.559
T	1.172	-	1.167	1.168	1.165	1.157	1.173	-
N (*10^3)	6.386	6.992	6.569	7.256	6.567	7.265	6.414	7.020

PGB = pregabalin, GB = gabapentin

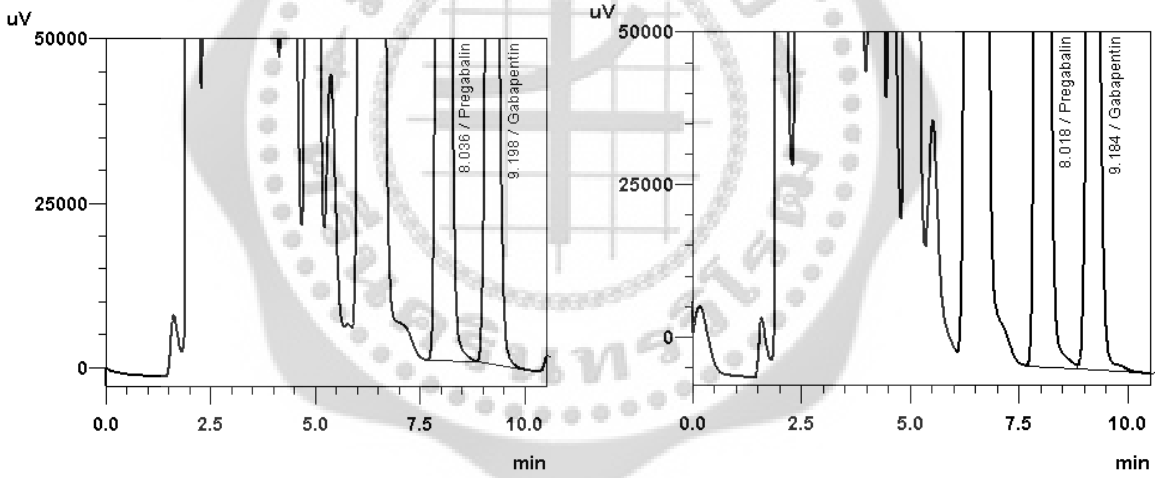
จากผลการทดลองพบว่าชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่สามารถพาสารที่ต้องการตรวจวัดออกจากคอลัมน์และแยกสารได้ดีที่สุดคือ ACN ผสมกับ KH_2PO_4 จึงนำสารดังกล่าวไปใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 การศึกษาความเข้มข้นของ Phosphate buffer (KH_2PO_4)

เนื่องจากความเข้มข้นของ Phosphate buffer มีผลต่อความสามารถให้การพาสารออกจากคอลัมน์และการแยกของสารผสมออกจากกัน ถ้าหากใช้ความเข้มข้นของ Phosphate buffer น้อยเกินไปอาจส่งผลให้สารผสมเกิดการแยกได้ไม่ดี แต่ถ้าหากใช้ความเข้มข้นของ Phosphate buffer มากเกินไปจะทำให้สิ้นเปลือง นอกจากนี้ความเข้มข้นของ Phosphate buffer ที่มากเกินไปยังส่งผลให้เกลือของบัฟเฟอร์เกิดการอุดตันในส่วนต่างๆ ของเครื่องมือวิเคราะห์ได้ ฉะนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาความเข้มข้น Phosphate buffer ในช่วง 5-50 มิลลิโมลาร์ พบว่าการใช้ความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ในช่วงดังกล่าวให้ผลการทดลองแสดงดังตาราง 6 ซึ่งให้ค่าพารามิเตอร์ที่ทำการศึกษาใกล้เคียงกันและผ่านเกณฑ์การยอมรับ แต่เมื่อสังเกตลักษณะโครมาโทแกรมของพรีกาบาลินและกาบาเพนติน ที่ใช้ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ พบว่าฐานพีคของสารทั้งสองชนิดยังแยกออกจากกันไม่ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่ 10 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงในภาพประกอบ10 ดังนั้นจึงเลือก KH_2PO_4 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตาราง 6 แสดงค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการวิเคราะห์พรีกาบาลินและกาบาเพนตินที่ความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ต่างกัน

พารามิเตอร์	ความเข้มข้นของ KH_2PO_4 (มิลลิโมลาร์)							
	5		10		20		50	
	PGB	GB	PGB	GB	PGB	GB	PGB	GB
RT (นาที)	8.018	9.184	8.036	9.198	8.029	9.182	7.935	9.136
R_S	2.723	2.723	2.659	2.659	2.737	1.432	2.616	1.202
T	1.174	1.183	1.185	1.203	1.165	1.162	1.184	1.199
N (*10^3)	6.196	6.702	5.962	6.448	6.378	6.946	6.015	6.478



(a) (b)

ภาพประกอบ 10 แสดงโครมาโทแกรมของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินในพลาสมา โดย (a) เป็นโครมาโทแกรมที่ใช้ KH_2PO_4 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ (b) 5 มิลลิโมลาร์

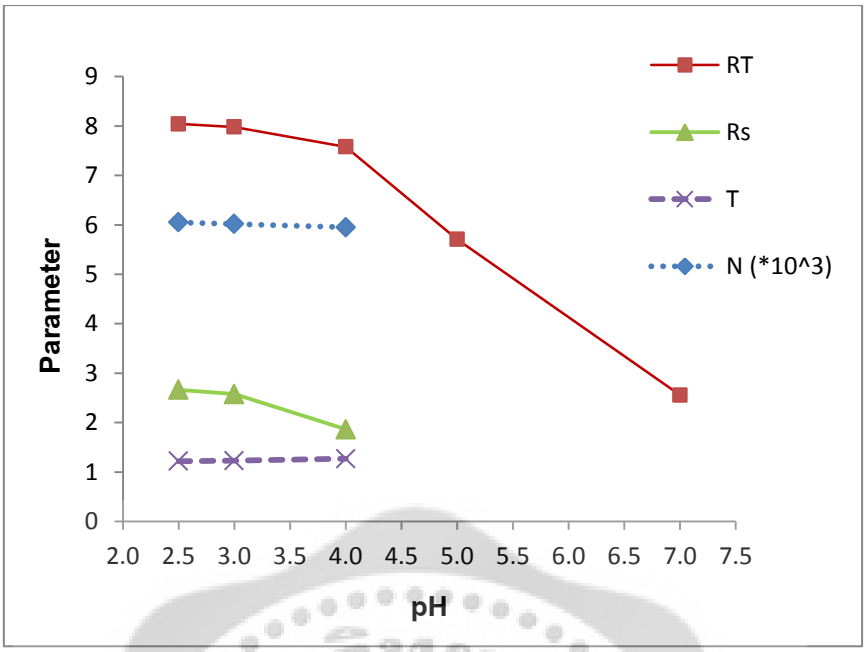
1.3 การศึกษาพีเอชของเฟสเคลื่อนที่

พีเอชของเฟสเคลื่อนที่มีผลต่อการแยกของสาร เนื่องจากโมเลกุลของสารอนุพันธ์ในงานวิจัยนี้มีหมู่ฟังก์ชันที่แสดงความเป็นกรดและเป็นเบส สามารถแตกตัวในพีเอชที่แตกต่างกัน ดังนั้นพีเอชจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่เป็นตัวกำหนดว่าสารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ได้เร็วหรือช้า และการแยกจะเป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพดีหรือไม่ การทดลองนี้จึงทำการศึกษาพีเอชของเฟสเคลื่อนที่ในช่วง 2.5-7 ผลการทดลองที่ได้แสดงตาราง 7 ซึ่งพบว่าเมื่อทำการเพิ่มพีเอชของ

เฟสเคลื่อนที่จากพีเอช 2.5-7 ส่งผลให้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินมีแนวโน้มเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์เร็วขึ้นเรื่อยๆ เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นจนเกิดการซ้อนทับเป็นพีคเดียวกันที่พีเอชตั้งแต่พีเอช 5 จนถึงพีเอช 7 จากภาพประกอบ 11 สังเกตได้ว่าค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการแยกมีแนวโน้มลดลงตามพีเอชที่สูงขึ้น ดังนั้นจึงเลือกพีเอชของ KH_2PO_4 เท่ากับ 2.5 เนื่องจากค่าพามิเตอร์ผ่านเกณฑ์การยอมรับและสามารถแยกสารผสมออกจากกันได้ดีที่สุด จึงนำค่าพีเอชดังกล่าวไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตาราง 7 แสดงค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการวิเคราะห์พรีกาบาลินและกาบาเพนติน เมื่อใช้ KH_2PO_4 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชต่างกัน

พารามิเตอร์	พีเอชของ KH_2PO_4 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์									
	2.5		3		4		5		7	
	PGB	GB	PGB	GB	PGB	GB	PGB	GB	PGB	GB
RT (นาที)	8.043	9.205	7.980	9.098	7.579	8.337	5.708		2.558	
R_S	2.665	2.665	2.577	2.577	1.864	1.864	รวมเป็นพีคเดียวกัน		รวมเป็นพีคเดียวกัน	
T	1.219	1.235	1.228	1.243	1.269	1.264	-		-	
N (*10^3)	6.050	6.454	6.018	6.363	5.951	6.311	-		-	



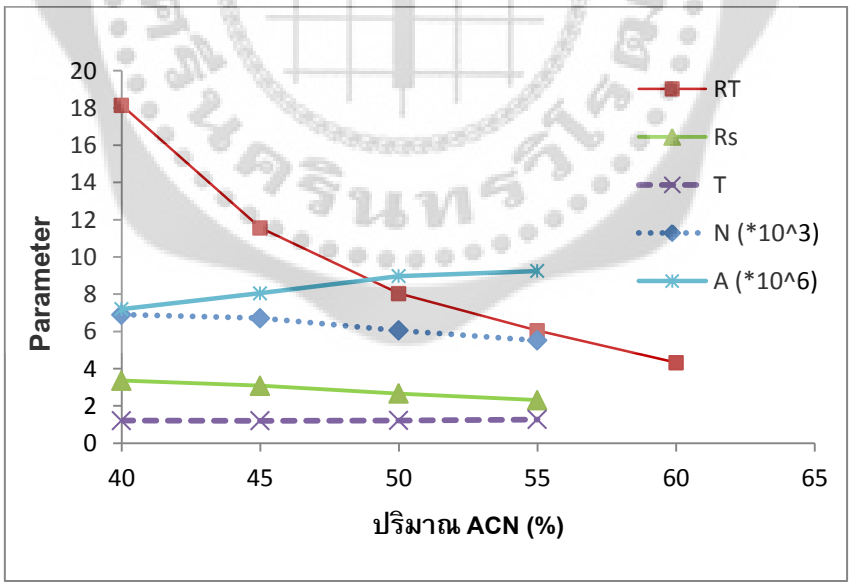
ภาพประกอบ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชกับค่าพารามิเตอร์ในการแยกของพรีกาบาลิน (RT คือ Retention time, Rs คือ Resolution, T คือ Tailing factor และ N คือ Theoretical Plates)

1.4 การศึกษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่

การศึกษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่มีผลต่อการชะสารตัวอย่างออกมาจากคอลัมน์ เนื่องจากสารตัวอย่างมีความชอบกระจายตัวอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ได้แตกต่างกัน ซึ่งการปรับเพิ่มหรือลดความมีขั้วของเฟสเคลื่อนจึงส่งผลต่อความเร็วในการเคลื่อนที่ของสารออกจากคอลัมน์ การแยกและปริมาณสารที่ถูกพาออกจากคอลัมน์ การทดลองนี้จึงทำการศึกษาอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ของสารผสมระหว่าง ACN : KH_2PO_4 ในอัตราส่วน 40 : 60, 45 : 55, 50 : 50 และ 55 : 45 ผลการทดลองที่ได้แสดงในตาราง 8 พบว่าเมื่อทำการเพิ่มอัตราส่วนของอะซิโตไนไตรล์ขึ้นไปเรื่อยๆ ส่งผลให้สารถูกพาออกจากคอลัมน์ได้มากและพีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินมีแนวโน้มเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เร็ว ซึ่งในทางกลับกันก็ส่งผลให้การแยกสารลดลงด้วย ซึ่งสามารถแสดงได้ดังภาพประกอบ 12 ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนของ ACN : KH_2PO_4 เท่ากับ 50 : 50 ไปใช้ในการทดลองต่อไปเพราะสามารถแยกสารผสมได้ดีที่สุดโดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่เกิน 10 นาที

ตาราง 8 แสดงค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในการวิเคราะห์พรีกาบาลินและกาบาเพนตินเมื่อใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ต่างกัน

พารามิเตอร์	อัตราส่วนของสารผสมระหว่าง ACN : KH_2PO_4									
	40:60		45:55		50:50		55:45		60:40	
	PGB	GB	PGB	GB	PGB	GB	PGB	GB	PGB	GB
A (*10^6)	7.201	4.199	8.050	4.641	8.973	5.243	9.249	5.680	13.912	
RT (นาที)	18.143	21.324	11.559	13.417	8.043	9.205	6.044	6.825	4.317	
R_S	3.357	3.357	3.080	3.080	2.665	2.665	2.311	2.311	รวมเป็นพีคเดียวกัน	
T	1.211	1.237	1.200	1.220	1.219	1.235	1.273	1.222	-	
N (*10^3)	6.898	6.979	6.712	6.979	6.050	6.454	5.514	6.085	-	



ภาพประกอบ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ ACN กับค่าพารามิเตอร์ในการแยกของพรีกาบาลิน (RT คือ Retention time, R_S คือ Resolution, T คือ Tailing factor, N คือ Theoretical Plates และ A คือ Peak area)

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการวิเคราะห์พรีกาบาลินในพลาสมาสามารถสรุปได้ดังแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 สรุปสภาวะของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์พรีกาบาลิน

สภาวะที่ทำการศึกษา	ผลที่ได้
ชนิดของเฟสเคลื่อนที่	ACN : KH_2PO_4
ความเข้มข้นของฟอสเฟตบัฟเฟอร์	10 mM
พีเอชของฟอสเฟตบัฟเฟอร์	2.5
อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่	50 : 50
เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์	11 นาที
ปริมาตรสารที่ใช้วิเคราะห์	20 ไมโครลิตร

2. ผลการศึกษาการสกัดสารออกจากตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีน

เนื่องจากการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาโดยใช้เทคนิค HPLC ไม่สามารถนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ได้โดยตรง จึงจำเป็นต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้มีความบริสุทธิ์ก่อนฉีดสารเข้าสู่เครื่อง HPLC ดังนั้นการเลือกใช้ชนิดและปริมาณสารที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนจึงมีความสำคัญเพื่อให้ได้ผลการสกัดที่สูญเสียสารสำคัญในระหว่างการสกัดน้อยที่สุดและสามารถสกัดซ้ำได้ผลอย่างแม่นยำ การทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษาชนิดและปริมาณของสารที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

2.1 ศึกษาชนิดของสารที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

การศึกษาชนิดของสารที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ ACN, MeOH และ 20% TCA ผลการทดลองที่ได้แสดงในภาพประกอบ 13 และตาราง 10 พบว่า ACN (หลอดที่1) สามารถตกตะกอนโปรตีนได้สารละลายหลังจากการตกตะกอนที่ใสในขณะที่เมื่อใช้ MeOH (หลอดที่ 2) และ 20%TCA (หลอดที่ 3) ได้สารละลายที่ขุ่น นอกจากนี้การใช้ MeOH ในการตกตะกอนโปรตีนยังเกิดพีครบกวนการวิเคราะห์ที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับพรีกาบาลินดังภาพประกอบ 14(a) ซึ่งแสดงโครมาโทแกรมเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างแบลงค์พลาสมา (โครมาโทแกรมเส้นสีดำ) กับตัวอย่างพรีกาบาลินและกาบาเพนตินที่ไม่ผ่านการสกัด (โครมาโทแกรมเส้นสีชมพู) เกิดพีคซ้อนทับกันส่งผล

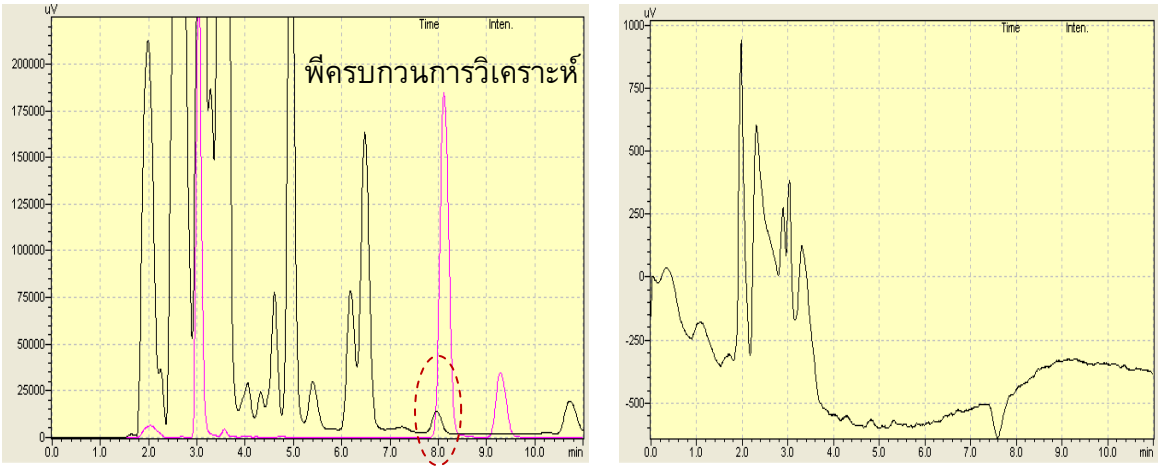
ให้การวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินไม่ถูกต้องและการตกตะกอนโปรตีนด้วย 20%TCA สารในระบบไม่สามารถทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุพันธ์ได้ ดังภาพประกอบ 14(b) ซึ่งไม่แสดงโครมาโทแกรมของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินจึงไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณพรีกาบาลินได้ ดังนั้นจึงเลือก ACN ไปใช้ในการทดลองต่อไป

หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3
ACN	MeOH	TCA

ภาพประกอบ 13 แสดงสารละลายที่ได้หลังจากการตกตะกอนโปรตีนในพลาสมาด้วยชนิดของสารที่แตกต่างกัน

ตาราง 10 แสดงผลของการสกัดพรีกาบาลินและกาบาเพนตินออกจากพลาสมา โดยใช้ชนิดของสารแตกต่างกัน (n=3)

ชนิดของสาร	Recovery (Mean±SD)		พื้นที่ใต้พีคของสารรบกวน	ความใสของ Supernatant
	พรีกาบาลิน	กาบาเพนติน		
ACN	74.98 ± 0.57	56.20 ± 0.62	ไม่พบ	ใส
MeOH	-	-	พบพีครบกวนที่เวลาใกล้เคียงกับพรีกาบาลิน	ขุ่น
20% TCA	ไม่พบพื้นที่ใต้พีคของ PGB และ GB (ไม่เกิดปฏิกิริยา)			ขุ่น



(a) (b)

ภาพประกอบ 14 แสดงโครมาโทแกรมของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินที่ใช้ MeOH และ TCA ในการตกตะกอนโปรตีนโดย (a) เป็นโครมาโทแกรมที่ใช้ MeOH ในการตกตะกอนโปรตีน และ (b) 20% TCA

2.2 ศึกษาอัตราส่วนของสารที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

การตกตะกอนโปรตีนในพลาสมาด้วย ACN ในอัตราส่วนระหว่างพลาสมา : ACN เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:2.5, 1:3 และ 1:3.5 โดยปริมาตรพบว่าอัตราส่วน 1:1 ไม่สามารถนำสารที่เหลือหลังจากตกตะกอนโปรตีนมาทำปฏิกิริยาต่อได้ เนื่องจากสารที่ได้ยังคงมีความขุ่นจึงไม่เหมาะสมที่จะฉีดเข้าเครื่อง HPLC ซึ่งผลการทดลองที่ใช้อัตราส่วนอื่นในการศึกษาให้ผลการทดลองแสดงในตาราง 11-14 จากผลการศึกษาการสกัดพรีกาบาลินและกาบาเพนตินออกจากตัวอย่างพลาสมาพบว่าที่อัตราส่วน 1 : 2.5 ให้ %Recovery ของการสกัดพรีกาบาลินและกาบาเพนติน เท่ากับ 74.86 และ 55.80% ตามลำดับ โดยเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของ ACN จะทำให้ %Recovery เพิ่มขึ้นแต่พื้นที่ใต้พีคลดลงเพราะความเข้มข้นของสารที่ทำการวิเคราะห์ลดลง แต่เมื่อสังเกตที่ %RSD พบว่าที่อัตราส่วน 1:2.5 มี %RSD น้อยที่สุด (ไม่เกิน 2%) ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนนี้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตาราง 11 แสดงค่า %Recovery ที่ได้จากการใช้อัตราส่วน Plasma : ACN เท่ากับ 1 : 2

สาร	อัตราส่วน Plasma : ACN	%Recovery (Mean±SD)	%RSD
PGB	1 : 2	66.32 ± 4.76	7.18
GB		47.02 ± 4.37	9.29

ตาราง 12 แสดงค่า %Recovery ที่ได้จากการใช้อัตราส่วน Plasma : ACN เท่ากับ 1 : 2.5

สาร	อัตราส่วน Plasma : ACN	%Recovery (Mean±SD)	%RSD
PGB	1 : 2.5	74.86 ± 0.42	0.56
GB		55.80 ± 0.82	1.47

ตาราง 13 แสดงค่า %Recovery ที่ได้จากการใช้อัตราส่วน Plasma : ACN เท่ากับ 1 : 3

สาร	อัตราส่วน Plasma : ACN	%Recovery (Mean±SD)	%RSD
PGB	1 : 3	77.73 ± 2.66	3.42
GB		59.51 ± 2.36	3.97

ตาราง 14 แสดงค่า %Recovery ที่ได้จากการใช้อัตราส่วน Plasma : ACN เท่ากับ 1 : 3.5

สาร	อัตราส่วน Plasma : ACN	%Recovery (Mean±SD)	%RSD
PGB	1 : 3.5	81.39 ± 3.61	4.44
GB		59.90 ± 3.53	5.89

3. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างพรีกาบาลินกับสาร NBD-Cl

วิธีการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาสำหรับงานวิจัยนี้พัฒนามาจากวิธีการศึกษาของ โอนอล; และแซกกิร์ลี (Onal; & Sagirli. 2009: 68-71)

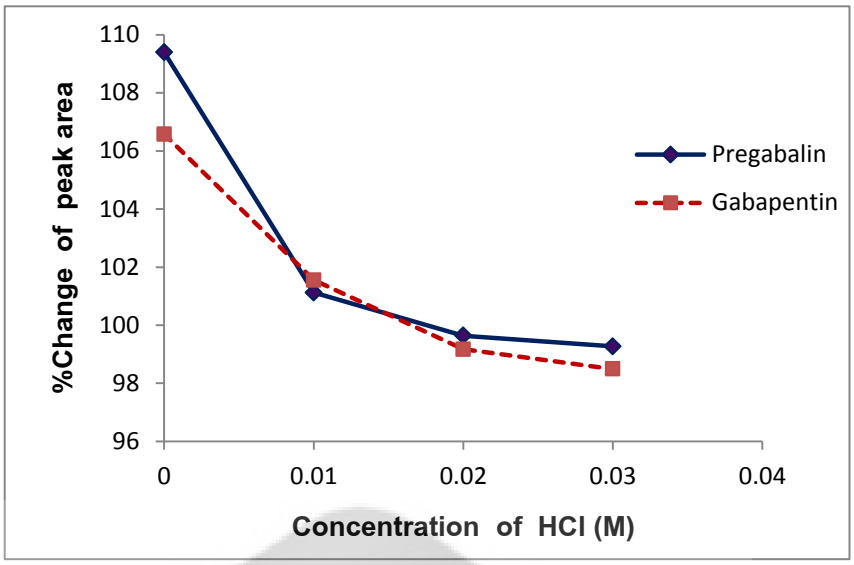
3.1 ศึกษาการหยุดปฏิกิริยาด้วย HCl

เนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างพรีกาบาลินและ NBD-Cl มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะที่เป็นเบส ซึ่งถ้ามีสารตัวใดตัวหนึ่งดังกล่าวเหลือในระบบหลังจากที่ต้องการให้หยุดปฏิกิริยาแล้ว อาจทำให้ปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นต่อไปได้ ส่งผลให้การวิเคราะห์ซ้ำอาจได้ค่าที่ไม่

ถูกต้อง ดังนั้นเพื่อให้ผลการทดลองมีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น การทดลองนี้จึงได้มีการศึกษาความเข้มข้นของ HCl ที่เหมาะสมในการหยุดปฏิกิริยา โดยได้ทำการทดลองหาความเข้มข้นของ HCl ในช่วง 0.00-0.03 โมลาร์ ผลการทดลองที่ได้แสดงตาราง 15 และภาพประกอบ 15 พบว่าเมื่อสารทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นที่เวลา 10 นาที แล้วไม่มีการเติม HCl เพื่อหยุดปฏิกิริยาส่งผลให้ปฏิกิริยายังเกิดต่อเนื่องซึ่งแสดงได้จากร้อยละการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ใต้พีคที่เพิ่มขึ้นเมื่อตั้งสารทิ้งไว้ในเครื่องฉีดสารอัตโนมัติเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการเติม HCl ในช่วงความเข้มข้น 0.01-0.03 โมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ สามารถหยุดปฏิกิริยาได้ดี เนื่องจากให้ค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ใต้พีคใกล้เคียง 100% มากที่สุด โดยหลังจากการเพิ่มความเข้มข้นมากกว่านี้ร้อยละการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ใต้พีคมีแนวโน้มคงที่ ดังนั้นจึงเลือก HCl ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการหยุดปฏิกิริยาเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ตาราง 15 แสดงค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินหลังจากเติมกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 1 ชั่วโมง

Conc.HCl (โมลาร์)	%Change of PGB (Mean±SD)	%RSD	%Change of GB (Mean±SD)	%RSD
0.00	109.40 ± 0.33	0.30	106.58 ± 1.38	1.30
0.01	101.12 ± 0.99	0.98	101.55 ± 2.38	2.34
0.02	99.64 ± 0.47	0.47	99.17 ± 1.50	1.51
0.03	99.27 ± 0.70	0.71	98.49 ± 1.09	1.12



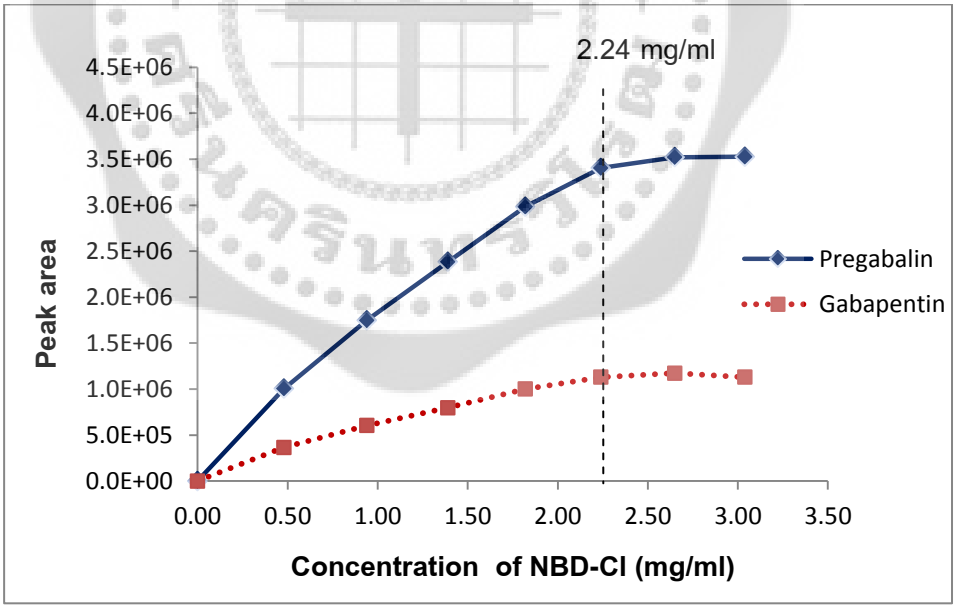
ภาพประกอบ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ HCl กับร้อยละการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนติน

3.2 ความเข้มข้นของ NBD-Cl ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาเคมีกับพรีกาบาลิน

ความเข้มข้นของ NBD-Cl มีผลต่อการเกิดสารอนุพันธ์เพราะ NBD-Cl เป็นสารที่เข้าทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีน (Primary amine, $-NH_2$) ในโครงสร้างของพรีกาบาลิน ถ้าหากใช้ความเข้มข้นของ NBD-Cl น้อยเกินไปจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ แต่ถ้าหากใช้ความเข้มข้นของ NBD-Cl มากเกินไปจะทำให้สิ้นเปลืองหรือบางครั้งในกรณีที่รีเอเจนต์มากเกินพออาจมีผลรบกวนต่อการเกิดอนุพันธ์ได้ ฉะนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาความเข้มข้นของ NBD-Cl ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สัญญาณในการวิเคราะห์ที่ดี ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของรีเอเจนต์ NBD-Cl ที่เหมาะสมในช่วง 0.00-3.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตาราง16 และภาพประกอบ 16 พบว่าความเข้มข้นของ NBD-Cl มีผลต่อสัญญาณในการวิเคราะห์ โดยเห็นได้ว่าสัญญาณมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NBD-Cl ในช่วงความเข้มข้น 0.00-2.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากกว่า 2.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรค่าการดูดกลืนแสงของอนุพันธ์ที่ตรวจวัดได้มีแนวโน้มคงที่ ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของ NBD-Cl ที่ 2.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมเนื่องจากให้สัญญาณในการวิเคราะห์สูงและเป็นการประหยัดรีเอเจนต์ที่ใช้ ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ NBD-Cl ที่ 2.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการทดลองต่อไป

ตาราง 16 แสดงค่าพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินที่ความเข้มข้นของ NBD-Cl ต่างกัน

Conc. NBD-Cl (mg/ml)	Peak area of PGB (Mean)	%RSD	Peak area of GB (Mean)	%RSD
0.00	0	-	0	-
0.48	1004453	4.28	342351	6.10
0.94	1746902	0.56	597049	1.47
1.39	2383628	2.56	796708	3.21
1.82	2984687	5.17	992451	6.20
2.24	3404996	1.83	1128341	1.84
2.65	3522343	3.08	1172921	2.73
3.04	3526954	3.32	1128893	3.88



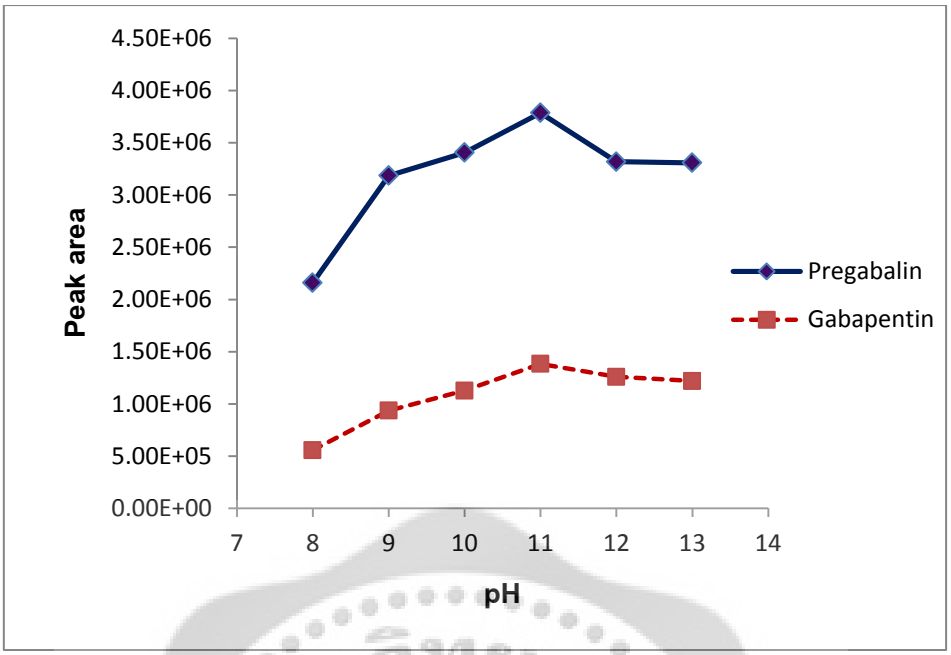
ภาพประกอบ 16 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนติน กับความเข้มข้นของ NBD-Cl ที่ต่างกัน

3.3 พีเอชของ Borate buffer ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

Borate buffer เป็นสารละลายที่ใช้ควบคุมพีเอชของตัวกลางในระบบ ซึ่งมีผลต่อการเกิดอนุพันธ์ เพราะว่าสาร NBD-Cl สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ Primary amine ในตำแหน่งที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวที่อะตอมของไนโตรเจนได้ดีในสภาวะที่เป็นเบส เนื่องจากในระบบที่เป็นเบส Primary amine group ของพรีกาบาลินไม่สามารถแตกตัวเป็น $R\text{-}NH_3^+$ ได้ ดังนั้นการทดลองนี้จึงศึกษาพีเอชของ Borate buffer ที่เหมาะสมในการเติมลงในระบบเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุด ซึ่งถ้าหากใช้ Borate buffer พีเอชต่ำเกินไปจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ เนื่องจาก Primary amine group สามารถแตกตัวได้ ฉะนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาพีเอชของ Borate buffer ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยทำการศึกษาในช่วงพีเอช 8-13 ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตาราง 17 และภาพประกอบ 17 ซึ่งพบว่าพีเอชของ Borate buffer มีผลต่อสัญญาณในการวิเคราะห์ โดยเห็นได้ว่าสัญญาณมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มพีเอชของ Borate buffer ในช่วงพีเอช 8-11 และเมื่อเพิ่มพีเอชมากกว่านี้สัญญาณของอนุพันธ์ที่ตรวจวัดได้มีแนวโน้มลดลง ดังนั้นจึงเลือกพีเอชของ Borate buffer เท่ากับ 11 เป็นพีเอชที่เหมาะสมเนื่องจากให้สัญญาณในการวิเคราะห์สูงที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ตาราง 17 แสดงค่าพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินที่พีเอชของ Borate buffer ต่างกัน

pH of Borate buffer	Peak area of PGB (Mean)	%RSD	Peak area of GB (Mean)	%RSD
8	2137168	4.41	558608	5.78
9	3184767	3.07	936382	4.29
10	3404996	1.83	1128341	1.84
11	3785117	2.28	1384005	2.33
12	3301257	3.50	1260256	3.53
13	3308299	2.98	1220444	5.33



ภาพประกอบ 17 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนติน กับ pH ของ Borate buffer

3.4 ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม

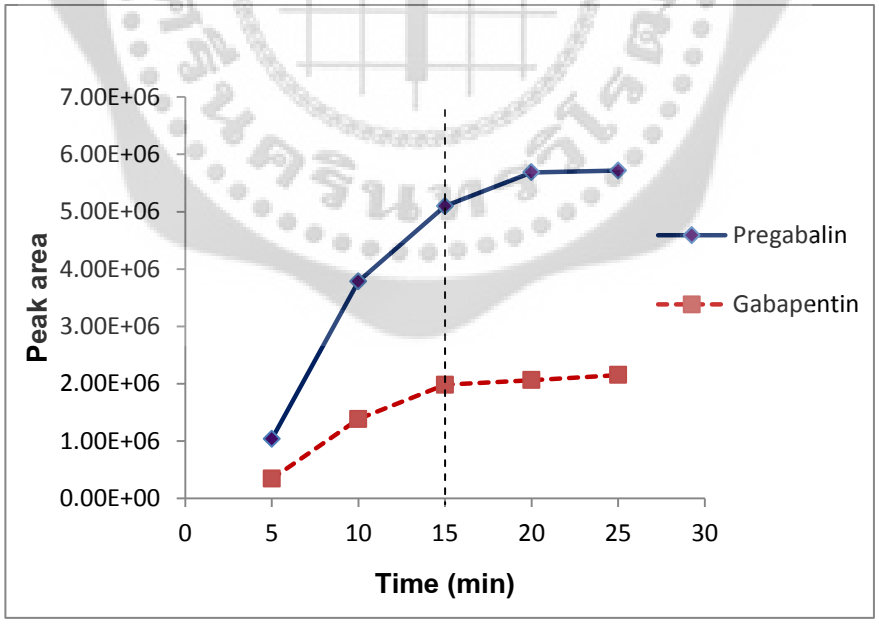
ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์ระหว่างพรีกาบาลินกับ NBD-Cl และกาบาเพนตินกับ NBD-Cl ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซียลเซียส เนื่องจากระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยานั้นมีผลต่อสัญญาณที่ตรวจวัดได้ ถ้าเวลาในการเกิดปฏิกิริยาน้อยเกินไปทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ และหากใช้เวลานานเกินไปอาจส่งผลต่อการเสียสภาพของตัวอย่างได้ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาในช่วง 5-25 นาที ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตาราง 18 และภาพประกอบ 18

จากผลการทดลองพบว่าระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยามีผลต่อสัญญาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่ตรวจวัดได้ พบว่าสัญญาณของสารอนุพันธ์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมาก เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาในช่วงเวลา 5-15 นาที และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาจนถึง 20 นาที สัญญาณของกาบาเพนติที่ตรวจวัดได้มีแนวโน้มคงที่ แต่สัญญาณของพรีกาบาลินยังเพิ่มขึ้นอีกประมาณ 12% และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาจนถึง 25 นาที สัญญาณที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และเมื่อสังเกตการนำสารที่ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 20 นาที ซึ่งมีสีของตัวอย่างเข้มกว่าที่ 15 นาที ดังแสดงในภาพประกอบ 19 เมื่อฉีดสารดังกล่าวเข้าสู่เครื่อง HPLC พบว่ามีผลต่อการอุดตันในส่วนของ Injector ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงปัญหาความไม่บริสุทธิ์ของตัวอย่างจึงไม่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก ๆอย่างต่อเนื่องได้

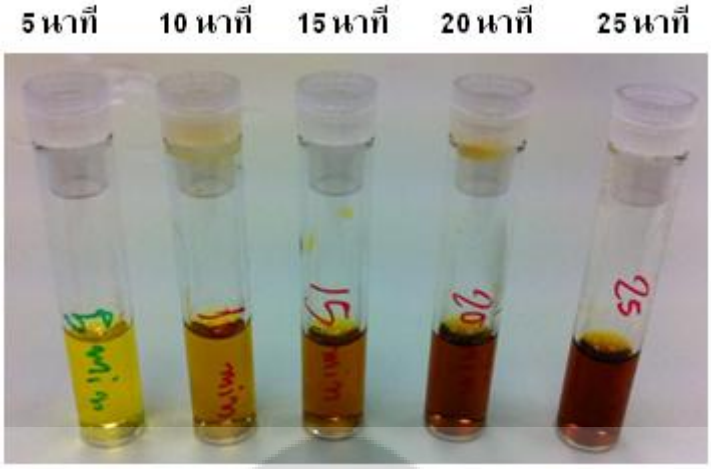
นอกจากนี้การใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 15 นาที ยังสามารถลดเวลาในการเตรียมตัวอย่างอีกด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่เวลา 15 นาที ซึ่งสัญญาณของอนุพันธ์ที่ตรวจวัดได้มีค่าน้อยกว่าที่เวลา 20 นาที ไม่มากเกินไป

ตาราง 18 แสดงค่าพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินในการทำปฏิกิริยาที่เวลาต่างกัน

Time (min)	Peak area of PGB (Mean)	%RSD	Peak area of GB (Mean)	%RSD
5	1037574	6.69	344064	6.68
10	3785117	2.28	1384005	2.33
15	5095785	0.37	1982431	0.46
20	5685096	1.08	2063951	2.20
25	5716048	0.36	2151695	4.98



ภาพประกอบ 18 แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินกับเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา



ภาพประกอบ 19 แสดงสีของตัวอย่างหลังหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริก (เมื่อให้ความร้อนในช่วง 5-25 นาที)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างพรีกาบาลินกับ NBD-Cl เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลิน สามารถสรุปได้ดังตาราง 19

ตาราง 19 สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์

สภาวะที่ทำการศึกษา	ผลที่ได้
ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก	0.02 โมลาร์
ความเข้มข้นของ NBD-Cl	2.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
พีเอชของ Borate buffer	11
ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา	15 นาที

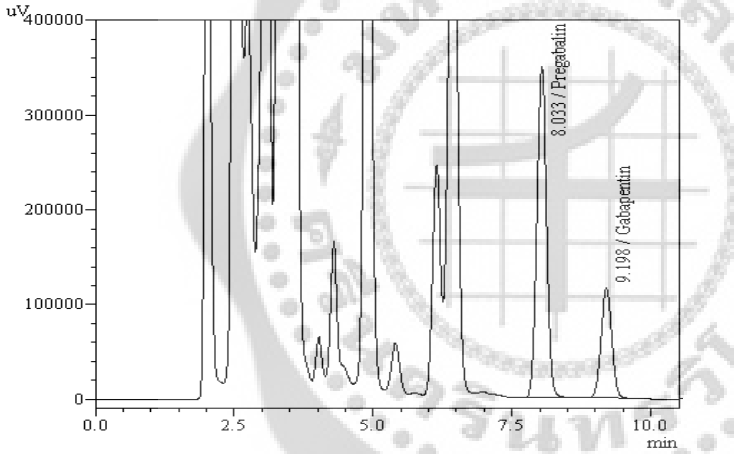
4. ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

เมื่อกระบวนการพัฒนาวิธีวิเคราะห์แล้วเสร็จ ก่อนนำวิธีการดังกล่าวมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง ต้องผ่านการตรวจสอบความถูกต้อง แม่นยำ คงทน เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์ให้ผลที่ถูกต้อง มีความเหมาะสมสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริงได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษา Method validation ซึ่งเป็นกระบวนการยืนยันความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยมี

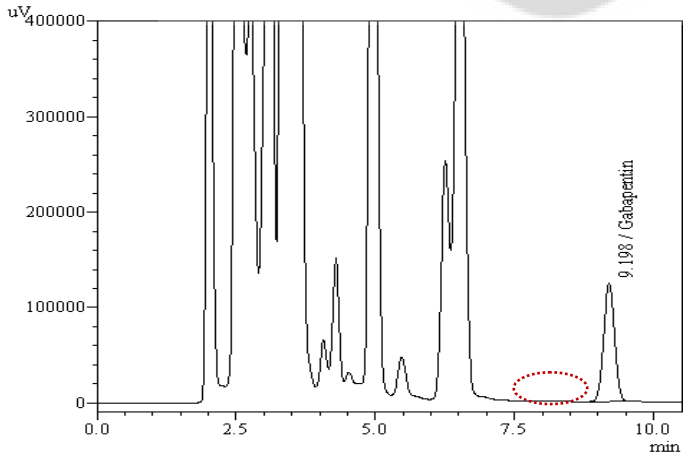
Guideline ในการทำ Method validation ที่ได้รับการยอมรับจากทั่วโลก ได้แก่ Guideline for Industry : Bioanalytical Method Validation ขององค์การอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา (US FDA) ฉบับล่าสุดคือ ฉบับปี 2013 และ Guideline on bioanalytical method validation ของ European Medicines Agency (EMA) ฉบับล่าสุดคือ ฉบับปี 2011 (เอกวรรณ อยู่สกุล. 2556: 18) จากผลการศึกษาค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญในการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สามารถแสดงผลได้ดังการทดลองต่อไปนี้

4.1 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity / Selectivity)

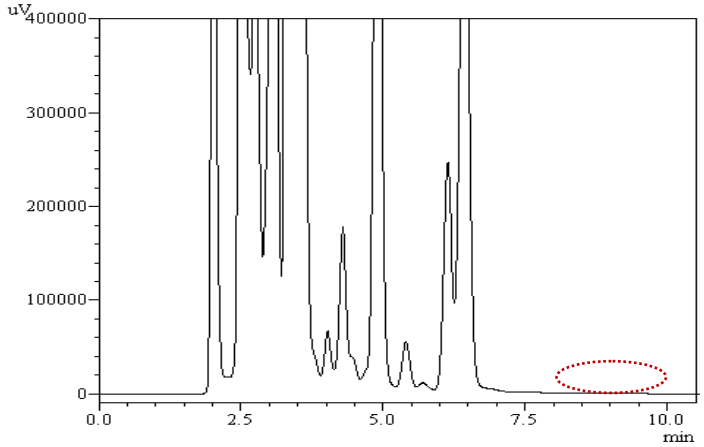
ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์แสดงได้จากโครมาโตแกรมในภาพประกอบ 20 พบว่าค่า Retention time ของพรีกาบาลินในพลาสมามีค่าประมาณ 8.0 นาที โดยแยกจากพีคของกาบาเพนตินที่ใช้เป็น Internal standard ซึ่งมีค่า Retention time ประมาณ 9.2 นาที และจากการทดสอบ Blank plasma จำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่าพีคทั้งสองไม่ถูกรบกวนการวิเคราะห์ด้วยสารอื่นๆ ในพลาสมา ดังแสดงในตาราง 20



(a)



(b)



(c)

ภาพประกอบ 20 แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์พรีกาบาลินและกาบาเพนตินในพลาสมาโดย (a) เป็นโครมาโตแกรมของพรีกาบาลินกับกาบาเพนตินในพลาสมา (b) กาบาเพนตินในพลาสมาและ (c) Blank plasma

ตาราง 20 แสดงค่าพื้นที่ใต้พีคของ Blank plasma ที่ Retention time ของการวิเคราะห์พรีกาบาลินและกาบาเพนติน

สารที่ตรวจวัด	Retention time (min)	พื้นที่ใต้พีคของ Blank plasma					
		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
พรีกาบาลิน	8.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
กาบาเพนติน	9.2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

4.2 การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบและความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณ (Lower limit of detection, LLOD and Lower limit of quantification, LLOQ)

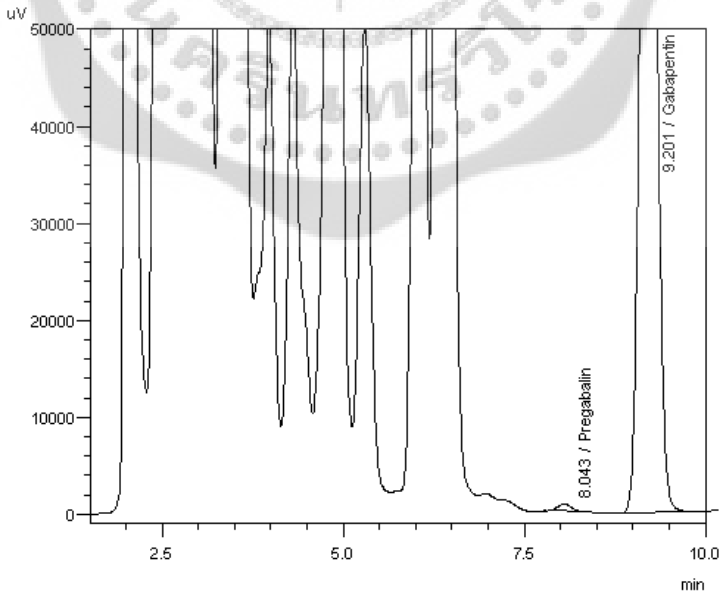
จากผลการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของพรีกาบาลินในพลาสมาที่ตรวจพบและความเข้มข้นต่ำสุดที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลิน สามารถศึกษาได้จากนิยามอัตราส่วนของสัญญาณระหว่างสัญญาณที่ต้องการตรวจวัดกับสัญญาณรบกวน (S/N) เท่ากับ 3 ในการวิเคราะห์ LLOD และมากกว่าหรือเท่ากับ 5 ในการวิเคราะห์ LLOQ เนื่องจากไม่สามารถตรวจพบสัญญาณของ Blank plasmaได้ ดังนั้นจึงใช้วิธีการหาค่า LLOD และ LLOQ โดยทำการเพิ่มความ

เข้มข้นของพรีกาบาลินขึ้นเรื่อยๆจากความเข้มข้นต่ำตั้งแต่ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาตรวจวัดขนาดของสัญญาณแล้วนำมาคำนวณหาค่า S/N ผลการทดลองที่ได้แสดงในตาราง 21

จากผลการศึกษาพบว่าสัญญาณที่ให้ค่า Signal to noise เท่ากับหรือมากกว่า 5 คือความเข้มข้นของพรีกาบาลินในพลาสมาเท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าความเข้มข้นที่ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพประกอบ 21) มีค่าเฉลี่ย Signal to noise เท่ากับ 7.747 และ %RSD เท่ากับ 6.40 ดังนั้นจึงเลือกจุดความเข้มข้นนี้มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินในการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อทำการทดลองต่อไป

ตาราง 21 แสดงค่า Signal to noise ของพรีกาบาลินที่จุดความเข้มข้นของ LLOD และ LLOQ (n=5)

Conc. of PGB (ng/ml)	Signal to noise (mean ± SD)	%RSD
0.000	0.000	0.00
5.000	0.000	0.00
10.000	3.084 ± 0.29	9.37
15.000	4.846 ± 0.43	8.73
20.000	7.747 ± 0.50	6.40



ภาพประกอบ 21 แสดงโครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์พรีกาบาลินที่จุดความเข้มข้นของ LLOQ (20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

4.3 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

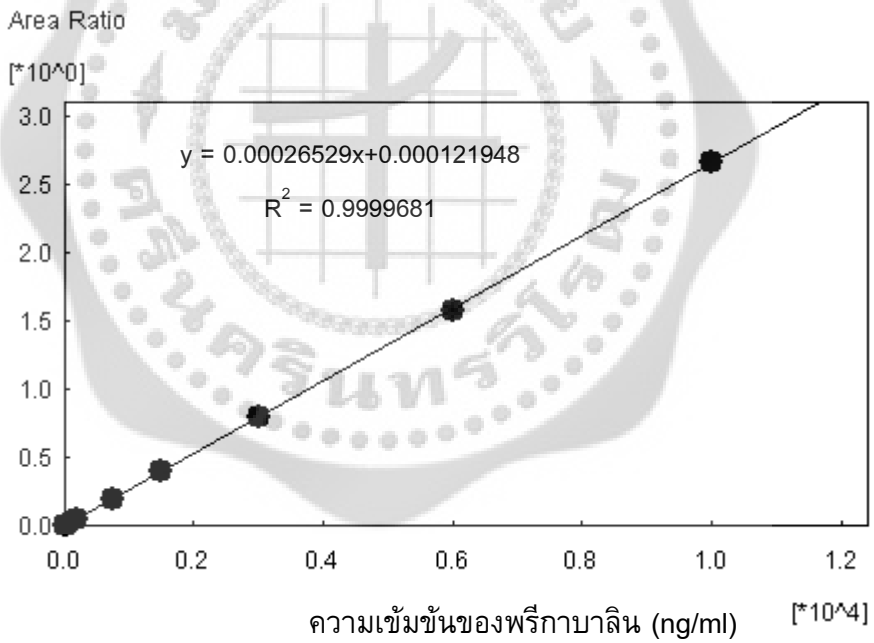
ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารโดยทั่วไปนิยมใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Internal standard โดยความเป็นเส้นตรงจะแสดงด้วยกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง Peak area ratio กับความเข้มข้นของพรีกาบาลิน ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ขึ้นอยู่กับความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ซึ่งแสดงโดยค่าถดถอยเชิงเส้น (R^2) และสามารถหาความเข้มข้นของตัวอย่างโดยการคำนวณจากสมการ Y = mX+c ที่ได้จากกราฟมาตรฐาน ผลการศึกษากราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินแสดงได้ ดังแสดงในตาราง 22-23 และภาพประกอบ 22 จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 20-10,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรของพรีกาบาลิน พบว่าช่วงดังกล่าวมีสมการเชิงเส้นเฉลี่ย คือ y = 0.00026529x + 0.000121948 และมีค่าถดถอยเชิงเส้น (R^2) = 1 ซึ่งเมื่อคำนวณร้อยละการกลับคืนของแต่ละจุดความเข้มข้นอยู่ในช่วง 96.82-103.89% ซึ่งผ่านตามเกณฑ์การยอมรับ (เกณฑ์กำหนดว่าค่า R^2 ต้องมีค่ามากกว่า 0.990 และความเข้มข้นแต่ละจุดของกราฟมาตรฐานต้องให้ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 85-115% ยกเว้นที่ความเข้มข้น LLOQ ต้องอยู่ในช่วง 80-120%)

ตาราง 22 แสดงผลการศึกษากราฟมาตรฐานในช่วงความเข้มข้นของพรีกาบาลิน 20-10,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (n=5)

ความเข้มข้นของพรีกาบาลินที่เตรียม (ng/ml)	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้จริง (ng/ml)	ร้อยละการกลับคืน (เปอร์เซ็นต์)	Area ratio (Mean ± SD)	%CV
20.00	19.36	96.82	0.00526 ± 0.00037	6.97
50.00	51.95	103.89	0.01390 ± 0.00042	3.00
200.00	200.05	100.03	0.05319 ± 0.00180	3.39
750.00	745.61	99.41	0.19792 ± 0.00113	0.57
1500.00	1500.10	100.01	0.39808 ± 0.00743	1.87
3000.00	3005.25	100.17	0.79738 ± 0.01082	1.36
6000.00	5954.59	99.24	1.57981 ± 0.01723	1.09
10000.00	10043.08	100.43	2.66445 ± 0.03222	1.21

ตาราง 23 แสดงสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและค่า R^2 (n=5)

Linearity	Equation of standard curve	Coefficient of determination (R^2)
Linearity 1	y = 0.000268433x-0.000192805	0.9999
Linearity 2	y = 0.000263209x+0.000195026	0.9998
Linearity 3	y = 0.000265206x+0.000615848	1
Linearity 4	y = 0.000266919x-0.000241698	1
Linearity 5	y = 0.000262682x+0.000233371	0.9999
Mean	y = 0.00026529x+0.000121948	1



ภาพประกอบ 22 แสดงช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเฉลี่ย (n=5) ที่ความเข้มข้นของพรีกาบาลิน 20-10000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

4.4 ความถูกต้องและความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Accuracy and Precision)

ความถูกต้องของการวิเคราะห์พรีกาบาลินในพลาสมาแสดงด้วยค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) พบว่าร้อยละการกลับคืนของวิธีวิเคราะห์พรีกาบาลินในพลาสมาสำหรับการ

วิเคราะห์ในวันเดียวกันเป็นจำนวน 3 วันที่ความเข้มข้นของพรีกาบาลินเท่ากับ 20, 60, 5000 และ 7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า %Recovery ของแต่ละความเข้มข้นอยู่ในช่วง 99.33-106.89%, 97.19-104.47%, 96.27-100.23% และ 95.87-102.26% ตามลำดับ ดังแสดงผลในตาราง 24, 26, 27 และ 28 และผลการวิเคราะห์ระหว่างวันที่ความเข้มข้นของพรีกาบาลินเท่ากับ 20, 60, 5000 และ 7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า %Recovery เท่ากับ 101.86, 99.62, 98.25 และ 99.56% ซึ่งผ่านตามเกณฑ์การยอมรับ (เกณฑ์กำหนดว่าค่า %Recovery ต้องอยู่ในช่วง 85-115% ยกเว้นที่ความเข้มข้น LLOQ ต้องอยู่ในช่วง 80-120%) ดังแสดงในตาราง 25 และ 29

ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์พรีกาบาลินในพลาสมาแสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation; CV) พบว่า %CV ของพรีกาบาลินในพลาสมาสำหรับการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (Intraday precision) เป็นจำนวน 3 วันที่ความเข้มข้นของพรีกาบาลินเท่ากับ 20, 60, 5000 และ 7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่า %CV ของแต่ละความเข้มข้นอยู่ในช่วง 2.48-5.41%, 2.57-3.57%, 0.22-1.17% และ 0.73-1.28% ดังแสดงในตาราง 24, 26, 27 และ 28 และผลการวิเคราะห์ระหว่างวัน (Between-day precision) ที่ความเข้มข้นของพรีกาบาลินเท่ากับ 20, 60, 5000 และ 7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า %CV เท่ากับ 5.19%, 4.57%, 1.84% และ 2.97% ซึ่งผ่านตามเกณฑ์การยอมรับ (กำหนดค่า %CV ต้องอยู่ในช่วง ±15 % ยกเว้นที่ความเข้มข้น LLOQ ต้องอยู่ในช่วง ±20 %) ดังแสดงในตาราง 25 และ 29

ตาราง 24 แสดงค่าความถูกต้องและความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์พรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (LLOQ) ในพลาสมา (n=15) ในวันเดียวกัน เป็นจำนวน 3 วัน

Parameter	**Within-day accuracy and precision of LLOQ**					
	Day 1		Day 2		Day 3	
	Measured value	%Recovery	Measured value	%Recovery	Measured value	%Recovery
Mean	19.874	99.37	19.866	99.33	21.378	106.89
SD	0.76	3.81	1.08	5.38	0.53	2.65
CV%	3.84	3.84	5.41	5.41	2.48	2.48

ตาราง 25 แสดงค่าความถูกต้องและความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์พรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (LLOQ) ในพลาสมา (n=15) ในระหว่างวัน เป็นจำนวน 3 วัน

Parameter	**Between-day accuracy and precision of LLOQ**	
	Measured value	%Recovery
Mean	20.373	101.86
SD	1.06	5.29
CV%	5.19	5.19

ตาราง 26 แสดงค่าความถูกต้องและความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์พรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Low quality control) ในพลาสมา (n=5) ในวันเดียวกัน เป็นจำนวน 3 วัน

Parameter	**Within-day accuracy and precision of Low**					
	Day 1		Day 2		Day 3	
	Measured value	%Recovery	Measured value	%Recovery	Measured value	%Recovery
Mean	58.318	97.20	62.682	104.47	58.314	97.19
SD	2.08	3.47	1.90	3.16	1.50	2.50
CV%	3.57	3.57	3.03	3.03	2.57	2.57

ตาราง 27 แสดงค่าความถูกต้องและความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์พรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 5000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (Medium quality control) ในพลาสมา (n=5) ในวันเดียวกันเป็นจำนวน 3 วัน

Parameter	**Within-day accuracy and precision of Medium**					
	Day 1		Day 2		Day 3	
	Measured value	%Recovery	Measured value	%Recovery	Measured value	%Recovery
Mean	4813.742	96.27	4911.842	98.24	5011.590	100.23
SD	24.07	0.48	57.44	1.15	11.21	0.22
CV%	0.50	0.50	1.17	1.17	0.22	0.22

ตาราง 28 แสดงค่าความถูกต้องและความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์พรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (High quality control) ในพลาสมา (n=5) ในวันเดียวกัน เป็นจำนวน 3 วัน

Parameter	**Within-day accuracy and precision of High**					
	Day 1		Day 2		Day 3	
	Measured value	%Recovery	Measured value	%Recovery	Measured value	%Recovery
Mean	7189.924	95.87	7541.552	100.55	7669.178	102.26
SD	52.40	0.70	96.82	1.29	74.20	0.99
CV%	0.73	0.73	1.28	1.28	0.97	0.97

ตาราง 29 แสดงค่าความถูกต้องและความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์พรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 60, 5000 และ 7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในพลาสมา (n=15) ในระหว่างวัน เป็นจำนวน 3 วัน

Parameter	Between-day accuracy and precision of pregabalin (ng/ml)					
	60		5000		7500	
	Measured value	%Recovery	Measured value	%Recovery	Measured value	%Recovery
Mean	59.771	99.62	4912.391	98.25	7466.885	99.56
SD	2.73	4.55	90.19	1.80	221.44	2.95
CV%	4.57	4.57	1.84	1.83	2.97	2.96

4.5 ศึกษาประสิทธิภาพของการสกัด (Recovery)

ประสิทธิภาพของการสกัดพรีกาบาลินและกาบาเพนตินในพลาสมาแสดงด้วยค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) พบว่า %Recovery ของการสกัดพรีกาบาลินที่ความเข้มข้นต่างๆ มีค่าอยู่ในช่วง 94.76-103.57% และค่า %Recovery ของการสกัดกาบาเพนตินมีค่าเท่ากับ 101.6% ผลการทดลองแสดงดังตาราง 30 และ 31 ตามลำดับ

ตาราง 30 แสดงค่า %Recovery ของการสกัดพรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 60, 5000 และ 7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในพลาสมา (n=5)

Concentration of PGB (ng/ml)	Area under the curve (mean±SD)				
	In plasma	%RSD	In solution	%RSD	%Recovery
60	26675.20±1152.42	4.32	25755.20±396.15	1.54	103.57
5000	2256761.00±20203.05	0.90	2301116.00±30290.05	1.32	98.07
7500	3422757.20±100914.32	2.95	3611992.60±55107.12	1.53	94.76

ตาราง 31 แสดงค่า %Recovery ของการสกัดกาบาเพนติน 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในพลาสมา

Concentration of GB (ng/ml)	Area under the curve (mean±SD)				
	In plasma	%RSD	In solution	%RSD	%Recovery
75	1794125.00±58886.40	3.28	1765043.40±23012.14	1.30	101.65

4.6 การศึกษาความคงตัว (Stability)

4.6.1 การศึกษาความคงตัวของอนุพันธ์ (Post-preparative stability)

การศึกษาความคงตัวของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นสามารถหาได้จากการเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของสารที่เตรียมขึ้นแล้วทำการตรวจวัดทันที (T = 0) กับสารเดิมที่ตั้งทิ้งไว้ในเครื่องฉีดสารอัตโนมัติที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (T = 48) แล้วคำนวณค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ผลการทดลองแสดงดังตาราง 32 ซึ่งเมื่อตั้งสารอนุพันธ์ทิ้งไว้ในเครื่องฉีดสารอัตโนมัติเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวิเคราะห์เพื่อคำนวณค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลง พบว่าความเข้มข้นของพรีกาบาลินที่ 60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลง เท่ากับ -3.49 และ 0.70% ตามลำดับ โดยผลการทดลองที่ได้ผ่านเกณฑ์การยอมรับที่กำหนดว่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ต้องมีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงไม่เกิน ± 15 %

ตาราง 32 แสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพรีกาบาลินที่เวลาเริ่มต้นของการเตรียม และเมื่อตั้งทิ้งไว้ในเครื่องฉีดสารอัตโนมัติเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของพรีกาบาลิน (ng/ml)	ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นของพรีกาบาลินที่วัดได้ (ng/ml)		%Change
		T = 0 hour	T = 48 hour	
60	1	57.85	56.66	
	2	59.48	57.59	
	3	59.40	56.31	
	Mean ± SD	58.91 ± 0.92	56.85 ± 0.66	-3.49
	%RSD	1.56	1.16	
7500	1	7238.96	7271.69	
	2	7171.39	7212.03	
	3	7248.69	7327.96	
	Mean ± SD	7219.68 ± 42.10	7270.56 ± 57.97	0.70
	%RSD	0.58	0.80	

4.6.2 การศึกษาความคงตัวของสารละลายมาตรฐาน (Stock standard stability)

การศึกษาความคงตัวของสารละลายมาตรฐานพรีกาบาลินและกาบาเพนตินที่จัดเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวิเคราะห์เพื่อศึกษาความคงตัวทุกๆ1 สัปดาห์เป็นเวลา 1 เดือน สามารถแสดงได้จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของ Stock solution ที่เก็บไว้กับพื้นที่ใต้พีคของ Stock solution ที่วิเคราะห์ในเวลาเริ่มต้นของการเตรียม (แทนด้วย T initial) ผลการทดลองแสดงได้ดังตาราง 33 เมื่อเก็บสารมาตรฐานในอุณหภูมิที่กำหนด แล้วนำมาวิเคราะห์ทุกๆ 1 สัปดาห์ พบว่าพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินในสัปดาห์ที่ 2, 3 และ 4 มีค่าการเปลี่ยนแปลงเท่ากับ -2.78, -1.25 และ -1.52% ตามลำดับ และพื้นที่ใต้พีคของกาบาเพนตินในสัปดาห์ที่ 2, 3 และ 4 มีค่าการเปลี่ยนแปลงเท่ากับ -0.37, 2.26 และ -0.56% ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับที่กำหนดว่าค่าการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ใต้พีคของ Stock solution ต้องไม่เกิน ±5%

ตาราง 33 แสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ใต้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินที่เวลาต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสาร	ตัวอย่างที่	พื้นที่ใต้พีค			
		T initial	Week 2	Week 3	Week 4
พรีกาบาลิน	1	2322063	2266151	2298384	2313056
5000 ng/ml	2	2361211	2271110	2308406	2279588
	3	2296009	2247839	2285114	2280429
	Mean	2326428	2261700	2297301	2291024
	SD	32819.40	12257.38	11683.68	19084.62
	%RSD	1.41	0.54	0.51	0.83
	%Change	-	-2.78	-1.25	-1.52
กาบาเพนติน	1	1706740	1733051	1780193	1757251
75 µg/ml	2	1732914	1751181	1771749	1696438
	3	1758336	1694662	1763707	1715297
	Mean	1732663	1726298	1771883	1722995
	SD	25798.91	28858.30	8243.82	31128.82
	%RSD	1.49	1.67	0.47	1.81
	%Change	-	-0.37	2.26	-0.56

4.6.3 การศึกษาความคงตัวต่อการแช่แข็ง-ละลาย (Freeze & Thaw stability) ของพรีกาบาลินในพลาสมา

การศึกษาความคงตัวของพรีกาบาลินในพลาสมาที่ถูกเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ให้เกิดการแข็งตัวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เกิดการละลาย (เท่ากับ 1 รอบ) โดยทำการแช่แข็ง-ละลายเป็นจำนวน 3 รอบ สามารถศึกษาความคงตัวได้จากการเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของพรีกาบาลินในพลาสมาที่เวลาเริ่มต้นของการเตรียม (T initial) กับเมื่อทำการแช่แข็ง-ละลายตัวอย่างเป็นจำนวน 3 รอบ (Cycle 3) แล้วคำนวณค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ผลการทดลองแสดงได้ดังตาราง 34 เมื่อนำพรีกาบาลินเติมลงในพลาสมาแล้วนำมาวิเคราะห์เพื่อศึกษาความคงตัวของพรีกาบาลินโดยการนำตัวอย่างพลาสมาที่เตรียมผ่านการแช่แข็ง-ละลายเป็นจำนวน 3 รอบ ผลการทดลองพบว่าค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพรีกาบาลินที่ 60 และ 7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 0.45 % และ 3.55 % ตามลำดับ

โดยผลการทดลองที่ได้ผ่านเกณฑ์การยอมรับที่กำหนดว่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ต้องมีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงไม่เกิน ±15 %

ตาราง 34 แสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพรีกาบาลินในพลาสมาที่ผ่านการแช่แข็ง-ละลายเป็นจำนวน 3 รอบ

ความเข้มข้นของพรีกาบาลิน (ng/ml)	ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นของพรีกาบาลินที่วัดได้ (ng/ml)		%Change
		T initial	Cycle 3	
60	1	62.41	63.49	
	2	57.62	64.95	
	3	66.38	58.80	
	Mean	62.14	62.41	0.45
	SD	4.39	3.21	
	%RSD	7.06	5.15	
7500	1	6624.50	7122.60	
	2	6982.36	7011.63	
	3	6620.32	6811.17	
	Mean	6742.39	6981.80	3.55
	SD	207.83	157.84	
	%RSD	3.08	2.26	

4.6.4 การศึกษาความคงตัวในระยะสั้น (Short term stability) ของพรีกาบาลินในพลาสมา

การศึกษาความคงตัวของพรีกาบาลินในพลาสมาที่เตรียมขึ้น โดยการนำตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ-70 องศาเซลเซียส มาละลายจนเป็นของเหลวนับเป็นเวลาที่ 0 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปผ่านขบวนการสกัดและวิเคราะห์ โดยตัวอย่างที่เหลือให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่อไปจบครบ 3 และ 6 ชั่วโมงแล้วจึงผ่านขบวนการสกัดและวิเคราะห์เช่นเดียวกัน คำนวณหาค่าการเปลี่ยนแปลงโดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่วัดได้ของเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง กับความเข้มข้น

ของตัวอย่างที่เตรียมขึ้นใหม่ (T initial) ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตาราง 35 พบว่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพรีกาบาลิน 60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 3 และ6 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ -7.02, -5.14 และ -3.28% ตามลำดับ และร้อยละการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพรีกาบาลิน 7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 2.19, 3.92 และ 2.11% ตามลำดับ โดยผลการทดลองที่ได้ผ่านเกณฑ์การยอมรับที่กำหนดว่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ต้องมีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงไม่เกิน ±15 %

ตาราง 35 แสดงร้อยละการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพรีกาบาลินในพลาสมาที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของพรีกาบาลิน (ng/ml)	ตัวอย่างที่	ความเข้มข้นของพรีกาบาลินที่วัดได้ (ng/ml)			
		T initial	0 hour	3 hour	6 hour
60	1	62.41	60.41	59.25	62.33
	2	57.62	55.40	62.05	60.26
	3	66.38	57.51	55.52	57.70
	Mean	62.14	57.77	58.94	60.10
	SD	4.39	2.52	3.28	2.32
	%RSD	7.06	4.35	5.56	3.86
	%Change	-	-7.02	-5.14	-3.28
7500	1	6624.50	6981.26	7039.23	6986.30
	2	6982.36	6896.40	7032.56	6890.75
	3	6620.32	6792.49	6948.05	6777.10
	Mean	6742.39	6890.05	7006.61	6884.72
	SD	207.83	94.55	50.83	104.73
	%RSD	3.08	1.37	0.73	1.52
	%Change	-	2.19	3.92	2.11

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เสนอวิธีการวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมา มีกาบาเพนตินเป็นสารมาตรฐานภายในตรวจวัดด้วยตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์ ในการวิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินจะอาศัยการเกิดปฏิกิริยากับ NBD-Cl ภายใต้สภาวะที่เป็นเบส จากนั้นทำการแยกสารผสมและตัวรบกวนออกจากกันโดยใช้เทคนิค HPLC และตรวจวัดความเข้มข้นของสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นด้วยตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์โดยงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาหัวข้อต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ศึกษาสภาวะของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ได้แก่ ชนิดของเฟสเคลื่อนที่ , ความเข้มข้นของ Phosphate buffer, พีเอชของเฟสเคลื่อนที่และอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งพบว่าสภาวะของการแยกที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำเพาะเจาะจง เนื่องจากใช้ตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ภายใน 11 นาที ซึ่งถือว่าเป็นระยะเวลาที่สั้นสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา (Retention time ของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินประมาณ 8.0 และ 9.2 นาที ตามลำดับ) โดยใช้องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสารเพียง 2 ชนิดเท่านั้น ซึ่งเป็นการประหยัดสารเคมีเพราะไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิดรวมถึงใช้ความเข้มข้นของ Phosphate buffer ต่ำ ลดปัญหาการอุดตันของเครื่องมือวิเคราะห์และคอลัมน์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสภาวะที่พัฒนาขึ้นมีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เคยมีการวิเคราะห์พรีกาบาลินโดยใช้เทคนิค HPLC ได้แก่ กูจรัล; แฮกค์; และคูมาร์ (Gujral; Haque; & Kumar. 2009: 327-334) ตรวจวัดพรีกาบาลินโดย UV detector ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น MeOH : ACN : 20 มิลลิโมลาร์ K_2HPO_4 ซึ่งยังเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ความไวในการวิเคราะห์ต่ำและต้องใช้เฟสเคลื่อนที่ 3 ชนิดในการแยก เวอเมจ; และ อีเดลโบร็ค (Vermeij; & Edelbroek. 2004: 297-303) ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น MeOH : ACN : 20 มิลลิโมลาร์ Phosphate buffer เวลาในการวิเคราะห์ 25 นาทีต่อ 1 ตัวอย่างซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานและต้องใช้เฟสเคลื่อนที่ในการแยกสารหลายชนิด ดอเซ; กิบาลา; และเอลเมอ (Dousa; gibala; & Lemr. 2010: 717-722) ใช้วิธีการแยกแบบ Post-column derivatization โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์ 15นาที ซึ่งวิธีนี้ต้องเพิ่มขั้นตอนการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้พรีกาบาลินกับสาร Derivatizing agent เกิดปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ใน Capillary coil ก่อนทำการตรวจวัดและเวลาในการวิเคราะห์นานกว่าวิธีที่พัฒนาขึ้น

2. ศึกษาการสกัดพรีกาบาลินออกจากตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีน โดยศึกษาชนิดและปริมาณสารที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน ซึ่งผลการทดลองพบว่าค่า %Recovery ของการสกัดมีค่า 94.76-103.57% โดยที่ผลการวิเคราะห์ซ้ำให้ค่า CV น้อยกว่า 5% ซึ่งพบว่าผลของ %Recovery และ %CV ของวิธีที่พัฒนาขึ้นดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เคยศึกษาการ

สกัดพรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมา ได้แก่ เมนเดล; และคนอื่นๆ (Mandal; et al. 2008: 237-243) ได้ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 80.45-89.12% และ %CV มากกว่า 6% เวีย์ดยา; และคนอื่นๆ (Vaidya; et al. 2007: 925-928) ได้ค่า %Recovery เฉลี่ยเท่ากับ 69.99 % และ%CV มากกว่า 5% แทง; และคนอื่นๆ (Tang; et al. 1999: 125-129) ได้ค่า %Recovery อยู่ในช่วง 96.2-103.9% และ %CV มากกว่า 5%

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดอนุพันธ์ระหว่างพรีกาบาลินกับ NBD-Cl เนื่องจากพรีกาบาลินไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยตัวตรวจวัดฟลูออเรสเซนต์ จึงต้องทำให้เกิดเป็นอนุพันธ์โดยใช้สาร NBD-Cl เพื่อให้สามารถตรวจวัดได้และมีความไวในการวิเคราะห์สูง จากการศึกษาข้อมูลย้อนหลังพบว่าเคยมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์พรีกาบาลินโดยใช้ NBD-Cl เป็น Derivatizing agent เพียง 1 รายงานโดย โอนอล; และ แซกกิร์ลี (Onal; & Sagirli. 2009: 68-71) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Spectrofluorometry และ Spectrophotometry แต่เทคนิคนี้ไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาเพื่อศึกษาชีวสมมูลหรือ Pharmacokinetic จึงได้ดัดแปลงวิธีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดอนุพันธ์ของวิธีดังกล่าวมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์พรีกาบาลินในตัวอย่างพลาสมาและพัฒนาให้ดีขึ้นโดยทำการศึกษาปริมาณ NBD-Cl, พีเอชที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา, เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาและความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถให้ความไวในการวิเคราะห์สูงและอนุพันธ์ที่ได้มีความคงตัวนานกว่าวิธีเดิม (20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับวิธีเดิมคือ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และอนุพันธ์มีความคงตัวอย่างน้อย 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับวิธีเดิมคือ 12 ชั่วโมง) และในการเตรียมตัวอย่างไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดสารอนุพันธ์ด้วยคลอโรฟอร์ม

4. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นตามเกณฑ์การยอมรับของ US FDA guideline และ EMEA guideline พบว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับทุกหัวข้อ

การศึกษางานวิจัยนี้สามารถอธิบายผลการทดลองในแต่ละหัวข้อได้ดังนี้

การศึกษาผลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์พรีกาบาลิน พบว่าเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมคือ สารผสมระหว่าง ACN กับ KH_2PO_4 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 2.5 โดยอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 50 : 50 โดยปริมาตร ซึ่งสภาวะของเฟสเคลื่อนที่ดังกล่าวส่งผลให้ค่าพารามิเตอร์ ได้แก่ Retention time, Resolution, Tailing factor และ Theoretical plate มีค่าผ่านเกณฑ์การยอมรับและเหมาะสมในการวิเคราะห์พรีกาบาลินซึ่งสามารถอธิบายได้ดังนี้

เนื่องจากตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้เป็นสารที่มีขั้ว ดังนั้นจึงแยกสารด้วย HPLC แบบวัฏภาคผันกลับ (Reverse phase HPLC) ซึ่งระบบนี้ต้องใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารที่มีขั้ว ดังนั้นจึงทำการศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่มีขั้วผสมกับเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งเฟสเคลื่อนที่ที่มีขั้วที่ทำการศึกษา ได้แก่ น้ำและ Phosphate buffer ชนิดต่างๆ ผลการทดลองพบว่าการใช้ Phosphate buffer สามารถพาสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์และเกิดการแยก

ได้ดีกว่าการใช้น้ำ และการศึกษาชนิดของ Phosphate buffer แต่ละชนิดพบว่าสามารถพาสารออกจากคอลัมน์ได้ดีไม่แตกต่างกัน ซึ่งชนิดของ Phosphate buffer ที่เหมาะสมต่อการแยกพรีกาบาลินในพลาสมาได้ดีที่สุด คือ KH_2PO_4 ส่วนการศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ ACN กับ MeOH พบว่า MeOH ไม่สามารถพาสารตัวอย่างออกจากคอลัมน์ได้ภายในระยะเวลา 10 นาที และในการใช้ MeOH ยังส่งผลให้เครื่อง HPLC มีความดันสูงเมื่อเปรียบเทียบกับ ACN ที่อัตราการไหลเดียวกันดังนั้นจึงเลือกใช้ ACN กับ KH_2PO_4 เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม เนื่องจากมีความสามารถในการพาสารพรีกาบาลินและกาบาเพนตินออกจากคอลัมน์ได้ด้วยการวิเคราะห์แบบ Isocratic elution โดยใช้สารเพียง 2 ชนิดเท่านั้น ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่มีผลรบกวนการวิเคราะห์เนื่องจากไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์

ความเข้มข้นของ Phosphate buffer ที่ 10 มิลลิโมลาร์ มีความเหมาะสมเนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวสามารถแยกสารผสมออกจากได้อย่างชัดเจน โดยที่ความเข้มข้นน้อยกว่านี้พบว่าฐานพีคของพรีกาบาลินกับกาบาเพนตินยังซ้อนทับกันอยู่และความเข้มข้นมากกว่านี้ การแยกพีคของพรีกาบาลินกับกาบาเพนตินได้ผลไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของ Phosphate buffer ที่ 10 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากสามารถแยกสารผสมออกจากกันได้อย่างชัดเจนและเป็นการประหยัดสารเคมีที่ใช้ นอกจากนี้ยังสามารถช่วยลดปัญหาการอุดตันของเกลือฟอสเฟตในส่วนต่างๆ ของเครื่องมือวิเคราะห์และคอลัมน์ได้อีกด้วย

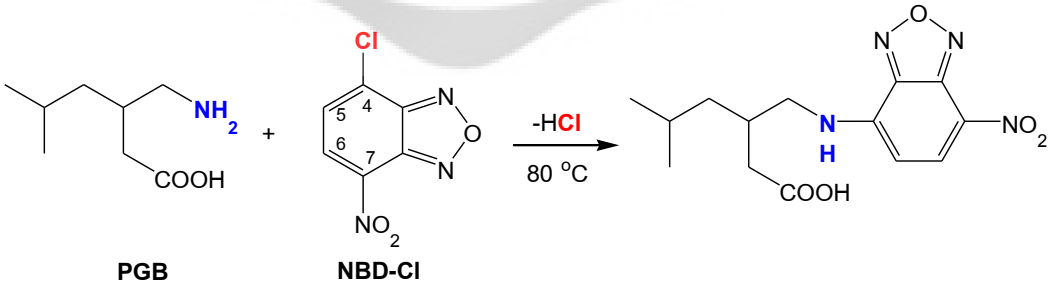
พีเอชของเฟสเคลื่อนที่มีผลต่อการแยกของพีค โดยจากการทดลองการเพิ่มพีเอชจากต่ำไปสูงมีผลทำให้พีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินมีแนวโน้มเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้นเรื่อยๆ โดยที่พีเอชมากกว่า 4 สารเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์เร็วมากจนไม่เกิดการแยกของพีค จากผลการศึกษาพบว่าในโครงสร้างของตัวอย่างอนุพันธ์มีหมู่ Carboxylic (-COOH) ซึ่งมีค่าคงที่ของการแตกตัว (pKa) เท่ากับ 4.2 ส่งผลให้ที่พีเอชเท่ากับหรือมากกว่า 4 สารเกิดการแตกตัวเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เร็ว ส่งผลให้พีคเกิดการแยกได้ไม่ดี ซึ่งแสดงได้จากค่า Resolution น้อยกว่า 2 ดังนั้นจึงเลือกพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 2.5 เนื่องจากสามารถแยกพีคของสารแต่ละพีคออกจากกันได้อย่างชัดเจน ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า ที่พีเอช 2.5 จะช่วยลดการแตกตัวของสารตัวอย่างทำให้สารสามารถเกิดอันตรกิริยา (Interaction) กับเฟสอยู่กับที่มากขึ้น

อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่มีผลต่อพื้นที่ใต้พีคของสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์, Retention time และการแยกของพีค จากผลการศึกษาพบว่าที่อัตราส่วนของ ACN จากต่ำไปสูง สารทั้งสองชนิดมีแนวโน้มเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เร็วและพื้นที่ใต้พีคของสารสูงขึ้น โดยที่อัตราส่วนของ ACN สูงทำให้สารเกิดการแยกได้น้อยลง สามารถอธิบายได้ว่าการเพิ่ม ACN ทำให้ระบบของเฟสเคลื่อนที่มีความสามารถในการกดการแตกตัวของสารตัวอย่างได้น้อยลง เนื่องจากอัตราส่วนของ Phosphate buffer ลดลง นอกจากนี้ ACN เมื่อเข้าสู่ระบบจะไปเกาะที่แขนของ C_{18} ทำให้หมู่ที่ไม่มีขั้วในโครงสร้างของสารตัวอย่างไม่มีแขนที่จะยึดเกาะกับ Silanol group จึงทำให้หลุดออกมาได้เร็วและสัญญาณในการวิเคราะห์ก็เพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณของ ACN ที่เพิ่มมากขึ้น

ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ระหว่าง ACN กับ KH_2PO_4 เท่ากับ 50 : 50 โดยปริมาตร เนื่องจากให้สัญญาณในการวิเคราะห์สูงและสามารถแยกพีคของสารแต่ละพีคออกจากกันได้อย่างชัดเจน

การศึกษาการสกัดยาพรีกาบาลินออกจากตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนพบว่าชนิดของสารที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่เหมาะสม คือ ACN โดยใช้อัตราส่วนของพลาสมาต่อ ACN เท่ากับ 1 : 2.5 โดยปริมาตร เพราะปริมาณดังกล่าวเพียงพอที่จะกำจัดโปรตีนไม่ให้เกิดการอุดตันในคอลัมน์ได้, ให้ผลการสกัดซ้ำที่แม่นยำที่สุดและสัญญาณในการวิเคราะห์ไม่ต่ำเกินไป โดยสามารถอธิบายได้ดังนี้ เนื่องจาก ACN สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ดีที่สุดซึ่งแสดงได้จากสารละลายที่ได้หลังจากการตกตะกอนโปรตีนมีความใสกว่าการใช้ MeOH และ 20%TCA เมื่อเปรียบเทียบในปริมาณที่เท่ากันและเมื่อฉีดสารเข้าเครื่อง HPLCไม่พบสารรบกวนการวิเคราะห์ แต่การใช้ MeOH สกัดพบสารรบกวนที่ตำแหน่งใกล้เคียงกับพีคของพรีกาบาลินจึงส่งผลให้การวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง ซึ่งการที่ ACN สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ดีกว่า MeOH สามารถอธิบายได้โดย ACN มีค่าคงที่ไดอิเลคตริคน้อยกว่า MeOH จึงสามารถลดค่าการละลายระหว่างน้ำกับโปรตีนได้ดีกว่า โดยเมื่อเพิ่มปริมาณของ ACN มากขึ้นเรื่อยๆ จนถึงจุดที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนมีค่าสูงกว่าแรงกระทำระหว่างโปรตีนกับน้ำจึงทำให้เกิดการรวมตัวกันของโมเลกุลโปรตีนตกตะกอนลงมาได้ ส่วนการใช้ TCA สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ โดยใช้หลักการที่ว่าในสภาวะที่เป็นกรด โปรตีนจะมีประจุเป็นบวก จึงสามารถจับกับประจุลบของโมเลกุลที่เป็นลบของสารละลาย TCA และตกตะกอนลงมาได้ ซึ่งสารละลายที่ได้หลังการตกตะกอนไม่เหมาะสมในการนำไปทำปฏิกิริยาต่อได้ เพราะอนุพันธ์จะเกิดขึ้นในสภาวะที่เป็นเบสเท่านั้น

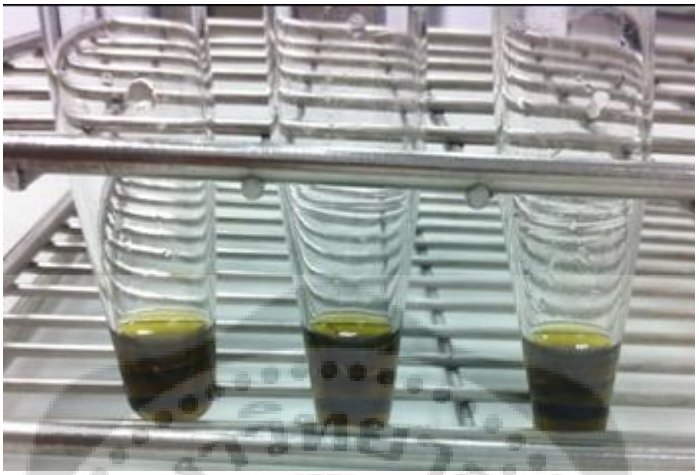
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดอนุพันธ์ระหว่างพรีกาบาลินกับ NBD-Cl พบว่าปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้ ดังแสดงในภาพประกอบ 23



ภาพประกอบ 23 แสดงปฏิกิริยา Derivatization ระหว่างพรีกาบาลินกับ NBD-Cl

ภาพประกอบ 23 แสดงกลไกลการเกิดปฏิกิริยาระหว่างพรีกาบาลินกับ NBD-Cl โดยเกิดปฏิกิริยาแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์ (Nucleophilic substitution) ในสภาวะเบส อนุพันธ์ที่ได้มีสีเขียวอมเหลืองดังภาพประกอบ 24 ซึ่งเกิดโครงสร้างที่สามารถดูดกลืนแสดงฟลูออเรสเซนต์ได้

เนื่องจากโครงสร้างของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นมีคุณสมบัติ ดังนี้ Conjugate double-bonds, Aromatic rings, Rigid planar structures และในโครงสร้างไม่มีหมู่ Quencher (-Cl) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ลดลง



ภาพประกอบ 24 แสดงสีของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นเมื่อให้ความร้อนเป็นเวลา 15 นาที (ก่อนหยุดปฏิกิริยาด้วย HCl)

โดยการเกิดปฏิกิริยามีขั้นตอนย่อยอยู่ 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 ในโครงสร้างของพรีกาบาลินมีอะตอม N ในหมู่ Primary amine ซึ่งมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวสภาพขั้วเป็นลบ และมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาซึ่งอะตอมไนโตรเจน (N) ทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟด์จะเกิดปฏิกิริยาบริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ในโครงสร้างของ NBD-Cl ซึ่งมีสภาพขั้วเป็นบวก

ขั้นตอนที่ 2 Cl ที่ต่ออยู่ที่คาร์บอนจะหลุดออกไป เรียกหมู่นี้ว่า Leaving group ซึ่งอนุพันธ์ที่ได้สามารถดูดกลืนแสง UV และสามารถ Fluorescence ได้

จากผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ ความเข้มข้น NBD-Cl เท่ากับ 2.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวส่งผลให้เกิดเป็นสารอนุพันธ์ได้อย่างสมบูรณ์และให้สัญญาณในการวิเคราะห์สูง โดยที่ความเข้มข้นต่ำกว่านี้สัญญาณในการวิเคราะห์จะมีค่าต่ำ เนื่องจากรีเอเจนต์ไม่เพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยา ส่งผลให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ และความเข้มข้นสูงกว่านี้สัญญาณของอนุพันธ์ที่ตรวจวัดได้มีแนวโน้มคงที่ ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของสาร NBD-Cl ที่ 2.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมเนื่องจากให้สัญญาณในการวิเคราะห์สูงและเป็นการประหยัดรีเอเจนต์ที่ใช้ ประหยัดค่าใช้จ่ายในการทดลอง

การศึกษาพีเอชของสารละลาย Borate buffer ที่ใช้ในการควบคุมสภาวะให้เป็นเบสของระบบการเตรียมตัวอย่าง พบว่าพีเอชมีผลต่อสัญญาณในการวิเคราะห์ กล่าวคือสัญญาณจะมีค่า

เพิ่มขึ้นตามพีเอชที่สูงขึ้นตั้งแต่ในช่วงพีเอช 8-11ซึ่งหลังจากพีเอชในช่วงนี้เป็นต้นไป พบว่าสัญญาณในการวิเคราะห์มีการเปลี่ยนแปลงโดยมีค่าลดลง เนื่องจากในสภาวะที่เป็นเบสมากเกินไป NBD-Cl สามารถเกิดการ Hydrolysis ไปเป็น NBD-OH ได้ ส่งผลให้สัญญาณในการวิเคราะห์ลดลง ดังนั้นจึงเลือกพีเอช 11 เป็นพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของสารอนุพันธ์ ทั้งนี้เนื่องจากให้สัญญาณในการวิเคราะห์สูงที่สุด

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาโดยการตรวจวัดสัญญาณของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 25 นาที จากการสังเกตพบว่าสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 5-20 นาที มีสัญญาณที่ได้จากการวิเคราะห์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา และหลังจากระยะเวลาในช่วงดังกล่าวสัญญาณที่ตรวจวัดได้เริ่มคงที่ ในการทดลองเลือกใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา15 นาทีเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมเนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่สารอนุพันธ์เกิดขึ้นได้สัญญาณที่สูงโดยที่ใช้ระยะเวลาสั้นในการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งจากผลการทดลองที่เวลา 20 นาที ให้สัญญาณในการวิเคราะห์สูงสุด แต่พบว่าการให้ความร้อนที่นานเกินไปส่งผลต่อความสะอาดของตัวอย่าง เนื่องจากโปรตีนที่เหลือในระบบเสียสภาพได้เมื่อได้รับความร้อนที่นานเกินไปส่งผลต่อการอุดตันในส่วนของเครื่องฉีดสารอัตโนมัติได้ เพราะการสกัดโดยใช้วิธีการตกตะกอนโปรตีนไม่สามารถกำจัดโปรตีนออกจากตัวอย่างได้ทั้งหมด

ศึกษาความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอลิกที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยาพบว่าที่ความเข้มข้นของกรด 0.02 M เป็นความเข้มข้นที่เพียงพอสำหรับใช้หยุดปฏิกิริยาของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินได้ ซึ่งการหยุดปฏิกิริยาศึกษาได้จากการนำสัญญาณของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินที่เปลี่ยนแปลงหลังจากการเติมกรดไฮโดรคลอลิกแล้วทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับสัญญาณเริ่มต้น ซึ่งสามารถอธิบายได้โดยในสภาวะกรด รีเอเจนต์ NBD-Cl ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับพรีกาบาลินได้เนื่องจากหมู่ Primary amine ($-NH_2$) ซึ่งเป็นเบสอ่อน สามารถทำปฏิกิริยากับกรดแก่อย่าง HCl ได้เป็นอย่างดี ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเกลือที่ละลายน้ำได้ ดังสมการ

$$RNH_2\ (l) + HCl\ (aq) \longrightarrow RNH_3^+Cl^-\ (aq)$$

โดยหาก NH_2 จับกับ H^+ จึงไม่ทำปฏิกิริยากับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ในโครงสร้างของ NBD-Cl

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อยืนยันว่าวิธีดังกล่าวสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินในพลาสมาได้อย่างถูกต้อง ผลการทดสอบพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นผ่านตามเกณฑ์การยอมรับของ US FDA guideline และ EMEA guideline โดยผลการทดลองในแต่ละพารามิเตอร์ของหัวข้อการทดสอบสามารถอธิบายได้ดังนี้

การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์โดยการทดสอบ Blank plasma จำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่าพีคของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินไม่ถูกรบกวนการวิเคราะห์ด้วยสารอื่นๆ ในพลาสมาทั้ง 6 ตัวอย่าง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่

ต้องการตรวจวัด เนื่องจากตัวตรวจวัดเป็นฟลูออเรสเซนต์ มีการเลือกทั้งความยาวคลื่น Excitation (λ_{ex}) สำหรับการเร้าอิเล็กตรอนและเลือกวัดฟลูออเรสเซนต์ที่ออกมาอีกความยาวคลื่น Emission (λ_{em}) ของแต่ละโมเลกุลให้เหมาะสม ดังนั้นถ้าโมเลกุลอื่นที่ถูกเร้าและเกิดฟลูออเรสเซนต์ที่คนละความยาวคลื่นกันก็จะไม่รบกวนการวิเคราะห์ นอกจากนี้การใช้เทคนิคในการแยกสารด้วย HPLC ยังทำให้ตัวรบกวนในพสามาและสารที่สนใจแยกออกจากกันได้ดี ไม่ส่งผลรบกวนต่อการวิเคราะห์

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของพรีกาบาลินที่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณได้ (LLOQ) คือ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ โดยให้อัตราส่วนของสัญญาณระหว่างสัญญาณที่ต้องการตรวจวัดกับสัญญาณรบกวน (S/N) เฉลี่ย เท่ากับ 7.747 ± 0.50 มีค่า % RSD เท่ากับ 6.40% ซึ่งมีค่า S/N มากกว่า 5 ตามเกณฑ์การยอมรับ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าวิธีนี้มีความไวในการวิเคราะห์เนื่องจากใช้ตัวอย่างพลาสมาเพียง 200 ไมโครลิตร ในการเตรียมตัวอย่าง และปริมาณสารที่ฉีดเข้าเครื่องใช้เพียง 20 ไมโครลิตร ซึ่งเหมาะกับกรณีที่เก็บตัวอย่างได้น้อยซึ่งปัญหานี้มักเกิดขึ้นบ่อยในกรณีเก็บตัวอย่างเลือดจากมนุษย์

การศึกษาความเป็นเส้นตรงของพรีกาบาลินในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 20-10,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีค่า Coefficient of deyermination (R^2) เฉลี่ยเท่ากับ 1 เมื่อทำการวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐาน 5 กราฟต่างวันกัน ซึ่งแสดงถึงความเป็นเส้นตรงที่ดี สามารถนำมาใช้เทียบเพื่อหาความเข้มข้นของตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง และเมื่อนำผลที่ได้มาคำนวณย้อนกลับเพื่อหาค่าร้อยละการกลับคืนของแต่ละจุดความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานพบว่าอยู่ในช่วงร้อยละ 96.82-103.89 ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ ±15% ทั้งนี้จะเห็นได้ว่ากราฟมาตรฐานมีช่วงความเข้มข้นที่กว้างเพื่อแสดงให้เห็นว่าสามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้รับยาในช่วงขนาดยาที่หลากหลาย ซึ่งยาพรีกาบาลินในรูปแบบยาแคปซูลที่มีขายในท้องตลาดมีขนาดตั้งแต่ 25-300 มิลลิกรัม การนำวิธีนี้ไปใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง สามารถเลือกบางช่วงของกราฟมาตรฐานที่เหมาะสมกับความเข้มข้นของตัวอย่างจริงไปใช้ในการวิเคราะห์ได้

ความแม่นยำและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สามารถแสดงได้ในรูปของ %CV และ %Recovery ตามลำดับ จากการทดสอบความแม่นยำและความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พรีกาบาลินที่ความเข้มข้น 20, 60, 5,000 และ 7,500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน พบว่าผลการวิเคราะห์ซ้ำกันหลายๆ ครั้ง แสดงค่าความแตกต่างของข้อมูลไม่เกิน 6% และแสดงค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 95.87-106.89% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องและแม่นยำสูง อยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน

การศึกษาประสิทธิภาพการสกัดพบว่าวิธีการสกัดที่ใช้สามารถสกัดพรีกาบาลินและกาบาเพนตินออกมาจากพลาสมาได้ดีมากโดยมีค่า %Recovery อยู่ในช่วง 94.76-103.57% และสามารถทำซ้ำได้อย่างแม่นยำซึ่งให้ค่า %RSD ไม่เกิน 5%

การศึกษาความคงตัวของพรีกาบาลินทั้งในรูปแบบสารละลาย คือการศึกษาความคงตัวของสารละลายมาตรฐานพรีกาบาลินและกาบาเพนติน การศึกษาความคงตัวของตัวอย่างพรีกาบาลินในพลาสมาที่ถูกเตรียมขึ้นเพื่อทดสอบความคงตัวต่อการแช่แข็ง-ละลาย และความคงตัวในระยะสั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รวมทั้งการศึกษาความคงตัวของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้น สามารถอธิบายผลการทดลองได้ดังนี้

ผลการศึกษาความคงตัวของสารละลายมาตรฐานพรีกาบาลินและกาบาเพนติน พบว่าเมื่อเก็บสารมาตรฐานทั้งสองชนิดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซียลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน ได้ค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 3%ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารทั้งสองชนิดมีความคงตัวเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซียลเซียส แม้จะผ่านการเตรียมมาแล้วเป็นระยะเวลา 1 เดือน

ผลการศึกษาความคงตัวต่อการแช่แข็ง-ละลายของพรีกาบาลินในพลาสมา พบว่ามีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพรีกาบาลินที่ 60 และ 7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 0.45% และ 3.55% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแม้ว่าตัวอย่างพรีกาบาลินในพลาสมาจะถูกเปลี่ยนแปลงสภาวะให้เกิดการแช่แข็ง-ละลาย 3 รอบ ก็ไม่มีผลต่อการสลายตัวของพรีกาบาลิน ดังนั้นในทางปฏิบัติเมื่อนำตัวอย่างจริงมาใช้ในการวิเคราะห์ก็สามารถนำตัวอย่างแช่แข็ง-ละลายได้ 3 รอบโดยไม่ทำให้ตัวอย่างเสียความคงตัว

ผลการศึกษาความคงตัวของพรีกาบาลินในพลาสมาเมื่อนำตัวอย่างที่ถูกแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพรีกาบาลินที่ 60 และ 7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ในช่วง -7.02 ถึง 3.92% ดังนั้นในทางปฏิบัติสามารถนำตัวอย่างจริงมาใช้ในการวิเคราะห์แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมงได้โดยไม่ส่งผลต่อความเข้มข้นของพรีกาบาลินในตัวอย่าง

ผลการศึกษาความคงตัวของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ในเครื่องฉีดสารอัตโนมัติที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของพรีกาบาลินที่ 60 และ7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงเท่ากับ-3.49 และ 0.70% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นมีความคงตัวมาก ดังนั้นหากต้องวิเคราะห์ตัวอย่างจริงจำนวนมาก สารตัวอย่างที่รอการวิเคราะห์ยังสามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องเนื่องจากไม่เสียความคงตัวหลังจากการเตรียมตัวอย่างมาแล้ว 2 วัน

การศึกษางานวิจัยที่พัฒนาขึ้นสามารถสรุปได้ว่าการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของพรีกาบาลินในพลาสมาด้วยเทคนิค HPLC เป็นวิธีที่ง่าย มีความจำเพาะและความไวในการวิเคราะห์ดี ถูกต้อง เที่ยงตรง มีประสิทธิภาพในการสกัดไม่พบสารรบกวนที่มีอยู่ในพลาสมาและอนุพันธ์มีความคงตัว เหมาะกับการวิเคราะห์ในตัวอย่างจำนวนมาก ซึ่งวิธีที่พัฒนาขึ้นได้ผ่านการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีการวิเคราะห์ตามมาตรฐาน US FDA guideline และ EMEA guideline ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้จึงมีความเหมาะสมและเชื่อถือได้สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์

พรีกาบาลินในพลาสมาสำหรับการวิเคราะห์ในตัวอย่างจริงเพื่อศึกษาชีวสมมูลหรือการศึกษา Pharmacokinetic ได้

2. ข้อเสนอแนะ

สำหรับผู้สนใจพัฒนาระบบดังกล่าวในการวิเคราะห์พรีกาบาลิน ผู้ทำงานวิจัยมีข้อเสนอแนะดังต่อไปนี้

1. แนวทางในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ต่อ ควรทำการศึกษาความยาวคลื่นและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการวิเคราะห์เพิ่มเติม

2. ในการนำวิธีนี้ไปใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง ควรมีการศึกษา Matrix effect ในพลาสมาเพิ่มเติมในตัวอย่างที่เป็น Hemolysis และ Hyperlipidemia เพื่อให้งานมีความสมบูรณ์มากขึ้น

3. การนำวิธีที่พัฒนานี้ไปใช้วิเคราะห์ในตัวอย่างจริงเพื่อศึกษาชีวสมมูล ต้องเลือกจุดความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานและชุดตัวอย่างควบคุมคุณภาพที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูงให้เหมาะสม โดยต้องคำนึงถึงระดับความเข้มข้นของยาพรีกาบาลินที่อาสาสมัครได้รับและความเข้มข้นสูงสุดของการดูดซึม (C_{max})

4. สามารถนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์พรีกาบาลินในตัวอย่างอื่นๆ ได้แก่วัตถุดิบยา (Active pharmaceutical ingredients), ยาสำเร็จรูป (Finished products) หรือการวิเคราะห์ระดับยาในตัวอย่างที่เป็นชีววัตถุ (Biological fluid) เช่น ซีรั่มและปัสสาวะ

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

จีรนันท์ ชัยวาฤทธิ์. (2555). *High Performance Liquid Chromatography (HPLC).* สืบค้นเมื่อ 2 เมษายน 2556, จาก http://www.mfu.ac.th/center/stic/index.php/chemical-analysis-instrument-menu/item/126-high-performance-liquid-chromatography-hplc.html

ชนกพร โปติบุตร; และวิระชัย สมัย. (2554). *การพัฒนาวิธีการสกัดยานอนหลับและยารักษาอาการซึมเศร้าในพลาสมาโดยวิธีการ Solid-Phase Extraction*. สืบค้นเมื่อ 2 เมษายน 2556, จาก http://www.sci.rmuti.ac.th/grad23rd/proceeding/Oral%20Paper/3095%20pp%20293-299.pdf

ชรินทร์ เตชะพันธุ์. (2542). *การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์.* สืบค้นเมื่อ 2 เมษายน 2556, จาก http://202.28.24.44/e_books/protein/Book-lesson1.pdf

ธัญนันท์ พรายงาม. (2554, กรกฎาคม-กันยายน). Derivatization Methods in HPLC. *วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนาองค์การเภสัชกรรม.* 18(3): 10-12.

แม้น อมรสิทธิ์; และคนอื่นๆ. (2555). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ.* พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์ 50. หน้า 397-405, 430-431, 435.

ปัณณวิชย์ ชื่นอารมณ์; และคนอื่นๆ. (2554). *เอกสารประกอบการเรียนวิชายาใหม่และแนวคิดใหม่.* สืบค้นเมื่อ 2 มกราคม 2556, จาก http://service.pharmacy.psu.ac.th/images/stories/New%20drugs/595-501.pdf

ศูนย์บริการเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. (2555). *การศึกษาชีวสมมูล.* สืบค้นเมื่อ 7 ธันวาคม 2555, จาก http://www.psc.pharmacy.cmu.ac.th/%E0%B8%BAbe-study/

เอกวรรณ อยู่สกุล. (2556, กรกฎาคม-กันยายน). Bioanalytical Method Validation. *วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนาองค์การเภสัชกรรม.* 20(3): 17-18.

อิสริยา เตชะธนะวัฒน์. (2552, เมษายน-มิถุนายน). การศึกษาชีวสมมูลและการศึกษาทางคลินิก. *วารสารเพื่อการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม.* 16(2): 11-13.

Abdel, Rasha; & Shaalan, Aziz. (2010). Spectrofluorimetric and Spectrophotometric Determination of Pregabalin in Capsules and Urine Samples. *Journal of Biomedical Science.* 6(3): 250-267.

American Red Cross. (2014). *Blood Components*. Retrieved January 20, 2014, from http://www.redcrossblood.org/learn-about-blood/blood-components

AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.* 15th ed. Virginia modified. 1094.

Arain, Amir M. (2009). Pregabalin in the Management of Partial Epilepsy. *Neuropsychiatric Disease and Treatment.* 5: 407-413.

Bahrami, Gholamreza; & Mohammadi, Bahareh. (2006). Sensitive Microanalysis of Gabapentin by High-Performance Liquid Chromatography in Human Serum using Pre-column Derivatization with 4-Chloro-7-nitrobenzofurazan: Application to a Bioequivalence Study. *Journal of Chromatography B.* 837: 24-28.

Bali, Alka; & Gaur, Prateek. (2011). A Novel Method for Spectrophotometric Determination of Pregabalin in Pure Form and in Capsules. *Chemistry Central Journal*. 59: 1-7.

Beni, Szabolcs; et al. (2010). Separation and Characterization of Modified Pregabalins in Terms of Cyclodextrincomplexation using Capillary Electrophoresis and Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 51: 842-852.

Bockbrader, HN.; et al. (2010). A Comparison of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Pregabalin and Gabapentin. *Clinical Pharmacokinetic.* 49(10): 661-669.

Dahl, Sandra Rinne; Olsen, Kirsten Midtboen; & Strand, Dag Helge. (2012). Determination of Gamma-Hydroxybutyrate (gHB),Beta-Hydroxybutyrate (BHB), Pregabalin, 1,4-Butane-Diol (1,4BD) and Gamma-butyrolactone (gBL) in Whole Blood and Urine Samples by UPLC–MSMS. *Journal of Chromatography B.* 885-886: 37– 42.

Dousa, Michal; Gibala, Petr; & Lemr, K. (2010). Liquid Chromatographic Separation of Pregabalin and its Possible Impurities with Fluorescence Detection After Postcolumnderivatization with o-Phtaldialdehyde. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 53: 717-722.

Elbashir, Abdalla A.; Suliman, Fakhr Eldin O.; & Aboul-Enein, Hassan Y. (2011). The Application of 7-Chloro-4-nitrobenzoxadiazole (NBD-Cl) for the Analysis of Pharmaceutical-bearing Amine Group using Spectrophotometry and Spectrofluorometry Techniques. *Applied Spectroscopy Reviews*. 46(3): 222-241.

European Medicines Agency. (2011). *Guideline on Bioanalytical Method Validation.* Retrieved August 13, 2012, from http://www.ema.europa.eu/docs/en_gb/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf

FluoProbes®. (2012). *NBD*. Retrieved December 07, 2012, from http://www.interchim.fr/ft/4/46540A.pdf

Food and Drug Administration. (1994). Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods. Retrieved June 01, 2013, from http://www.fda.gov/downloads/Drugs/guidances/UCM134409.pdf

Food and Drug Administration. (2013). *Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation.* Retrieved December 13, 2013, from http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf

Gujral, Rajinder Singh; Haque, Sk Manirul; & Kumar, Sanjeev. (2009). A Novel Method for the Determination of Pregabalin in Bulk Pharmaceutical Formulations and Human Urine Samples. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 3(6): 327-334.

Gujral, Rajinder Singh; Haque, Sk Manirul; & Shanker, Prem. (2009). A Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Pregabalin in Bulk, Pharmaceutical Formulations and in Human Urine Samples. *International journal of Biomedical science.* 5(4): 421-427.

Hao, F.; et al.(2004) Determination of Aliphatic Amines in Mineral Flotation Liquors and Reagents by High-Performance Liquid Chromatography After Derivatization with 4-Chloro-7- nitrobenzofurazan. *Journal Chromatograph A.* 1055(1-2): 77-85.

Heltsley, Rebecca; et al. (2011). Urine Drug Testing of Chronic Pain Patients. IV. Prevalence of Gabapentin and Pregabalin. *Journal of Analytical Toxicology*. 35: 357-359.

Mandal, Uttam; et al. (2008). Determination of Pregabalin in Human Plasma using LC-MS-MS. *Chromatographia.* 67: 237-243.

Mercolinia, Laura; et al. (2010). Simultaneous HPLC-F Analysis of Three Recent Antiepileptic Drugs in Human Plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 53: 62-67.

Mishra, Sarvesh Kumar; Gurupadhyya, B.M.; & Verma, Surajpal. (2012). Stability RP-HPLC Method for Determination of Pregabalin using ICH Guidelines. *International Journal of Natural Product Science*. (1): 130.

Mudiam, Mohana Krishna Reddy; et al. (2012). Development, Validation and Comparison of Two Microextraction Techniques for the Rapid and Sensitive Determination of Pregabalin in Urine and Pharmaceutical Formulations After Ethyl Chloroformate Derivatization Followed by gas Chromatography–Mass Spectrometric Analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 70: 310-319.

Nirogi, Ramakrishna; et al. (2009). Liquid Chromatography Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry Method for the Quantification of Pregabalin in Human Plasma. *Journal of Chromatography B*. 877: 3899-3906.

Onal, Armagan; & Sagirli, Olcay. (2009). Spectrophotometric and Spectrofluorimetric Methods for the Determination of Pregabalin in Bulk and Pharmaceutical Preparation. *Spectrochimica Acta Part A*. 72: 68-71.

Pfizer Canada Inc. (2013). *Product monograph*. Retrieved July 2, 2013, from http://www.pfizer.ca/en/our_products/products/monograph/141

Pubchem Compound. (2005). *Gabapentin.* Retrieved December 2, 2012, from http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3446#itabs-2d

Ravi, Sankar. (2013). *HPLC.* Retrieved January 20, 2014, from http://www.slideshare.net/banuman35/hplc-high-perpromance-liquid-chromatography-or- high-pressure-liquid-chromatography-brief-history-definition-what-is-hplc-uses-of-hplc-separation-mechanism-classification-elution-texhniques-gradient-and-isocratic-normal-phase-and-rp-hplc-stationary-phase-m

Shah, GR.; Ghosh, C.; & Thaker, BT. (2010). Determination of Pregabalin in Human Plasma by Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectroscopy. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research.* 1(3): 354-357.

Shimadzu. (2014). *Definition of S/N Ratio*. Retrieved January 20, 2014, from http://www.shimadzu.com/an/definition_sn_ratio.html

Tang, PH.; et al. (1999). Automated Microanalysis of Gabapentin in Human Serum by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Application.* 727(1-2): 125-129.

Thejaswini, J.C.; Gurupadayya, B.M.; & Raja, P. (2012). Gas Chromatographic Determination of Pregabalin in Human Plasma using Ethyl Chloroformate Derivatizing Reagent. *Journal of Pharmacy Research.* 5(6): 3112-3115.

Uma, G.; et al. (2011). LC-MS-MS Method for the Determination of Pregabalin in Human Plasma. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(3): 108-112.

Vaidya, Vikas V.; et al. (2007). LC-MS–MS Determination of Pregabalin in Human Plasma. *Chromatographia*. 66: 925-928.

Vermeij, T.A.C.; & Edelbroek P.M. (2004). Simultaneous High-performance Liquid Chromatographic Analysis of Pregabalin, Gabapentin and Vigabatrin in Human Serum by Precolumn Derivatization with o-Phtaldialdehyde and Fluorescence Detection. *Journal of Chromatography B*. 810: 297-303.

Waters. (2014). *HPLC Separation Modes*. Retrieved January 20, 2014, from http://www. waters.com/waters/en_TH/HPLC-Separation- Modes/nav.htm?cid=10049076& locale=en_TH

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงเกณฑ์การยอมรับค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำ

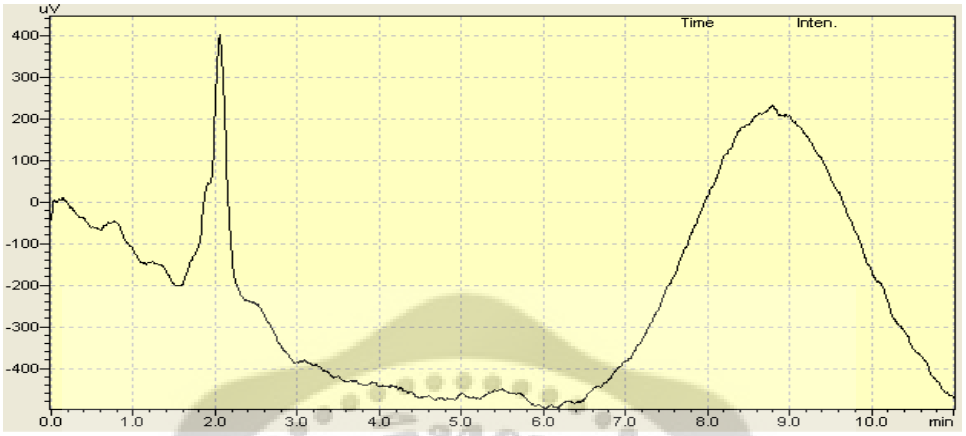
ตาราง 36 แสดงค่าความแม่นยำที่ยอมรับได้ในการเตรียมตัวอย่างที่ไม่ผ่านการสกัด

ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยของ % RSD
100 %	± 1.3
10 %	± 2.7
1 %	± 2.8
0.1%	± 3.7
100 ppm	± 5.3
10 ppm	± 7.3
1 ppm	± 11
100 ppb	± 15
10 ppb	± 21
1 ppb	± 30

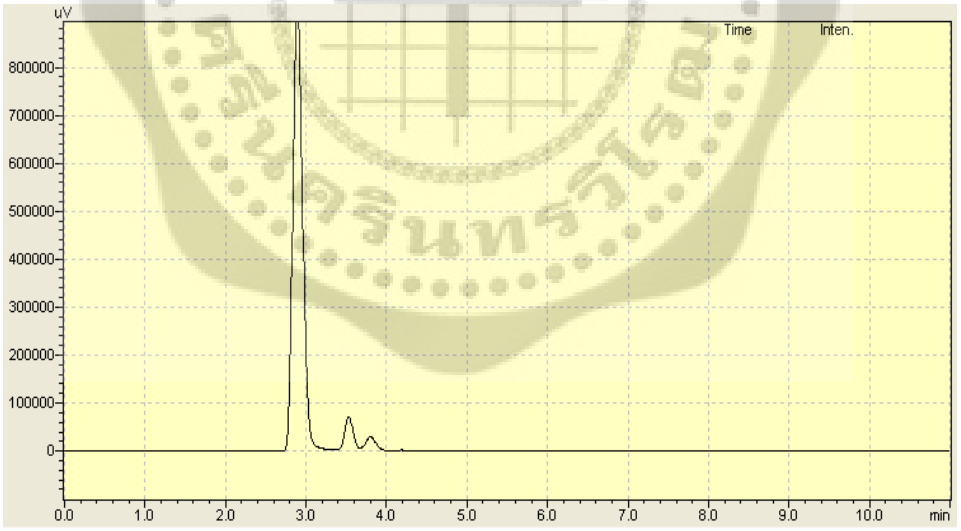
ที่มา: AOAC manual for Peer Verified Methods program, VA, NOV 1993

ภาคผนวก ข

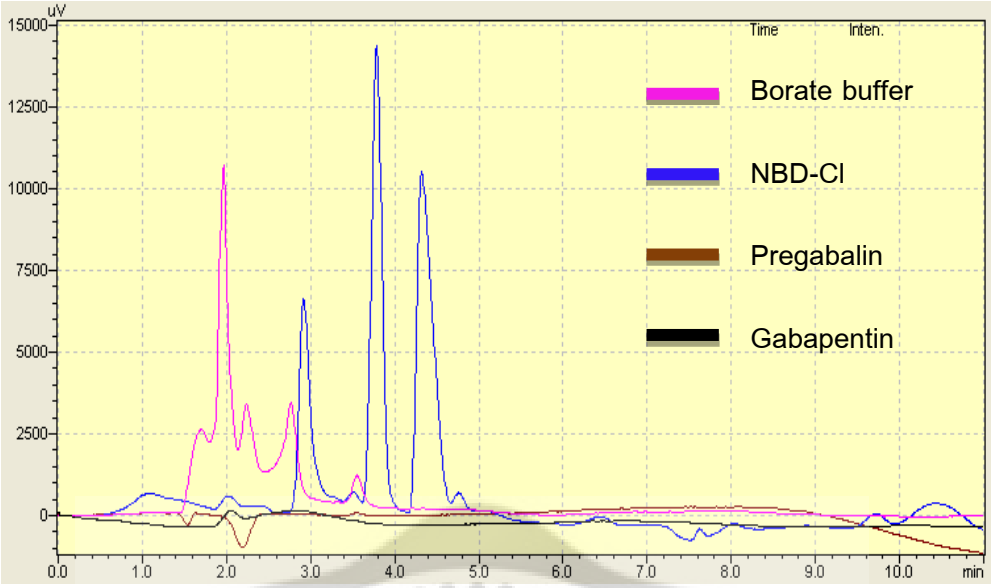
ภาพประกอบแสดงข้อมูลโครมาโทแกรมเพิ่มเติมของงานวิจัย



ภาพประกอบ 25 แสดงโครมาโทแกรมของพรีกาบาลินและกาบาเพนตินในพลาสมาโดยไม่เติม NBD-Cl



ภาพประกอบ 26 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายแบลงค์ที่ไม่ผ่านการสกัด



ภาพประกอบ 27 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายต่างๆ ที่ไม่ผ่านขั้นตอนการทำให้เกิดอนุพันธ์

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาววรรณา เอี่ยมอาจ
วันเดือนปีเกิด	15 ตุลาคม 2527
สถานที่เกิด	อ.เมืองนครปฐม จ.นครปฐม
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	419/368 อาคารนิรันดร์คอนโด ซอยพึ่งมี 52 ถนนสุขุมวิท 93 แขวงบางจาก เขตพระโขนง กรุงเทพมหานคร 10260
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	เจ้าหน้าที่บริการวิทยาศาสตร์ P7
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2545	ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนราชินีบูรณะ
พ.ศ. 2550	ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) เคมี จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ
พ.ศ. 2557	ปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) วิทยาการเภสัชภัณฑ์ จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ