บทที่ 1

บทนำ

ในการวิเคราะห์หาปริมาณยา หรือสารเมตาบอไลต์ในพลาสมา มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเตรียมตัวอย่างพลาสมาก่อนทำการวิเคราะห์ เพื่อให้สภาพของตัวอย่างพร้อมที่จะวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) ต่อไป โดยหลักการสำคัญในการเตรียมตัวอย่างอาจเป็น การแยกตัวยา หรือสารเมตาบอไลต์ออกจากตัวอย่างพลาสมา หรือเป็นการแยกโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาก็ได้ (McDowall, 1989; Smith and Stewart,1981)

การแยกตัวยา หรือสารเมตาบอไลต์ออกจากตัวอย่างพลาสมา ทำได้โดยการสกัด ทั้งแบบ Liquid – liquid Extraction (LLE) และ Solid Phase Extraction (SPE) ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องใช้เวลา ค่าใช้จ่าย และขั้นตอนต่างๆ ค่อนข้างยุ่งยากมากกว่าการใช้การแยกโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา (McDowall, 1989) การแยกพลาสมาโปรตีนเป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ได้มีการใช้มานาน แม้จะมีรายงานว่าอาจมีการติดของยาไปกับพลาสมาโปรตีนได้ หรือยาที่จับกับพลาสมาโปรตีนอย่างเหนียวแน่น (high protein binding) อาจถูกดูดซับอยู่บนผิวของโปรตีน (Bye and Brown, 1977; Lim, 1988; McDowall, 1989; Gupta, 1992)

เพ็ญศรี และคณะ ได้มีการศึกษาการเตรียมตัวอย่างโดยการแยกพลาสมาโปรตีนมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 เพื่อพิสูจน์ข้อถกเถียงต่างๆ และพัฒนาวิธีการแยกพลาสมาโปรตีนแบบต่างๆ โดย จันคนา บูรณะโอสถ (2536)ได้ศึกษาถึงข้อถกเถียงดังกล่าว และพบว่าไม่ว่าตัวยาจะมีการจับกับพลาสมาโปรตีนในระดับสูง กลาง หรือต่ำ ก็สามารถใช้วิธีการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาเป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างได้ โดยผลการวิเคราะห์ตัวยามีความถูกต้อง แต่ปัญหาที่อาจกระทบต่อการวิเคราะห์ยาในพลาสมามาจากกลุ่มยาที่มีขนาดการใช้ยาต่ำ ซึ่งการแยกพลาสมาโปรตีนจะมีความไวไม่มากพอในการวิเคราะห์ นอกจากนี้ กนกวรรณ จารุกำจร (2536) ยังได้สร้างกระสวนการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของยากลุ่มกรดที่มีการจับกับพลาสมาโปรตีนสูง โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน ซึ่งทำให้ได้กระบวนการแยกพลาสมาโปรตีนที่รวดเร็ว และเป็นแบบแผนสามารถนำมาใช้ได้ทันที โดยเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนในกลุ่มของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ถูกเลือกใช้เป็นอันดับแรก โดยกระสวนการวิเคราะห์ที่ได้ ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ยาต่างๆ ในพลาสมา โดยเน้นที่มีคุณสมบัติแตกต่างจากตัวยาในการสร้างกระสวน

การวิเคราะห์ เพื่อเป็นการยืนยันความเป็นไปได้ในการวิเคราะห์โดยวิธีการแยกพลาสมาโปรตีน (นฤบดี, 2538)

ผลการศึกษาเหล่านี้เน้นให้เห็นว่า การแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา สามารถใช้เตรียมตัวอย่างพลาสมาได้กับยาที่มีการจับกับโปรตีนได้ทุกระดับ แต่พบปัญหาที่สำคัญ คือ การเจือจางของตัวอย่าง จากการเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนแล้ว จะทำให้ความเข้มข้นของยาถูกเจือจางไป ส่งผลให้ความไวของวิธีวิเคราะห์ลดลง (McDowall, 1989) จันคนา (2536) และ นฤบดี (2538) ได้รายงานว่ายานิเฟดิพีน และอิมิพรามีนที่ระดับความเข้มข้นในพลาสมาต่ำ สามารถใช้การแยกพลาสมาโปรตีน เป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ได้ แต่มีความไวต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้น 240 และ 100 นนก./มล. ของพลาสมา ตามลำดับเท่านั้น ซึ่งเป็นผลจากความเจือจางของตัวอย่างพลาสมา ดังนั้นข้อจำกัดสำคัญในการแยกพลาสมาโปรตีน อยู่ที่การนำไปใช้วิเคราะห์ยาที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ในพลาสมา

เนื่องจากการแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเทคนิคที่ง่าย ทำได้สะดวกรวดเร็ว ถ้าสามารถเพิ่มความไวของการวิเคราะห์เช่นการใช้ดีเทคเตอร์ที่เฉพาะเจาะจง หรือแก้ปัญหาการเจือจางของสารตัวอย่างได้ จะทำให้สามารถนำเทคนิคการแยกพลาสมาโปรตีน ไปใช้กับการเตรียมตัวอย่างพลาสมาเพื่อวิเคราะห์ยาที่มีความเข้มข้นของยาในพลาสมาต่ำ เพื่อประโยชน์ในการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาหรือ การศึกษาชีวสมมูลของยาในประเทศไทย

การศึกษานี้จึงเป็นการพยายามที่จะหาเทคนิคการเพิ่มความไวของการวิเคราะห์ โดยเลือกยาต้านอาการซึมเศร้ากลุ่มไตรไซคลิก ซึ่งมียาอิมิพรามีน รวมอยู่ด้วยมาเป็นตัวอย่างในการศึกษา โดยยาต้านอาการซึมเศร้ากลุ่มไตรไซคลิก เป็นยากลุ่มที่ใช้ในการรักษาอาการซึมเศร้ามีตัวยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย ได้แก่ยาอิมิพรามีนและอมิทริปทีลีน ซึ่งมีสารเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ (Active Metabolites) คือเดซิพรามีนและนอร์ทริปทีลีน ตามลำดับ (Potter, Manji and Rudorfer, 1995) และเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ทั้ง 2 ตัวนี้ก็มีอยู่ในรูปของตำรับยาที่ใช้ในการรักษาอาการซึมเศร้าด้วย (Evangelista and Paseual (eds.), 1996; Evangelista และคณะ (eds.), 2000)

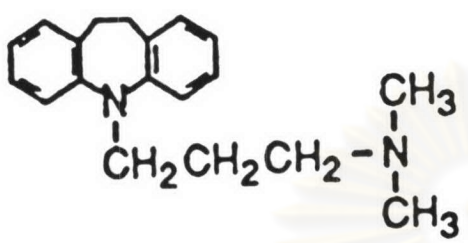
จากการศึกษารายงานการวิเคราะห์ยาต้านอาการซึมเศร้ากลุ่มไตรไซคลิกในพลาสมาด้วย HPLC พบว่า ยังไม่เคยมีรายงานใดๆ เลยที่ใช้การแยกโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา มาเป็นวิธีการเตรียมตัวอย่าง (Gerson and Anhalt, 1980; Wong, 1988; Gupta, 1992) พบแต่เพียงการ

เตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัดทั้ง Liquid – Liquid Extraction (Reece and Zacest, 1979; Jonhson และคณะ, 1985; Visser, Oostelbos and Toll, 1984; Rop and Conquy, 1986; Neilsen and Brosen, 1993; Yoo และคณะ, 1995 ; Tanaka และคณะ, 1997; Chen และคณะ, 1997; Aymard และคณะ, 1997; Hackett, Dusci and Ilett, 1998) และ Solid Phase Extraction (Lin and Frade, 1987; Carfagnini และคณะ, 1990) เท่านั้น ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะเลือกใช้ยาต้านอาการซึมเศร้ากลุ่มไตรไซคลิก มาเป็นตัวอย่างในการศึกษาเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยเตรียมตัวอย่างพลาสมาด้วยการแยกพลาสมาโปรตีน และเพิ่มความไวของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิควิธีต่างๆ เพื่อสามารถแก้ไขปัญหาเรื่องการเจือจางของตัวอย่างต่อไป

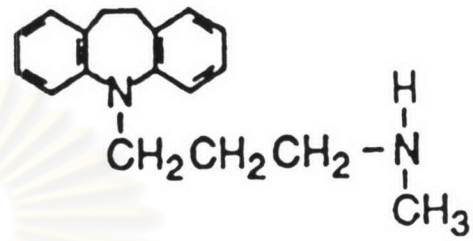
ยาอิมิพามีน และอมิทริปทีลีน เป็นยาต้านอาการซึมเศร้าในกลุ่มไตรไซคลิกแบบ Tertiary aminesซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการบรรเทาอาการซึมเศร้า เป็นยาที่ใช้กันมานานหลายสิบปี ขนาดยาปกติที่ใช้ค่อนข้างปลอดภัย และราคาถูก กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่มนี้คือ ยับยั้งการเก็บกลับของ monoamine neurotrasmitter ทำให้ระดับ neurotransmitter ในสมองสูงขึ้น เภสัชจลนศาสตร์ของยาทั้ง2ตัวนี้คือยาสามารถถูกดูดซึมได้ดีโดยการรับประทาน(Ereshefskyและคณะ, 1988; Orsulak และคณะ, 1989; Potter, Manji and Rudorfer, 1995; Evangelista และคณะ (eds.), 2000) ยากระจายตัวได้มากในร่างกาย จับกับพลาสมาโปรตีนสูง ตั้งแต่ 85-97%ขึ้นไป ยาอิมิพรามีน และอมิทริปทีลีนเมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายจะเกิดเมตาบอลิซึมที่ตับ (first-passed metabolism) เกิดเป็นเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ ได้เป็นเดซิพรามีน (เดสเมทิลอิมมิพรามีน) และนอร์ทริปทีลีน และเกิดเป็นเมตาบอไลต์อื่นๆ ที่ไม่มีฤทธิ์ ซึ่งยาจะถูกขับออกจากร่างกายในรูปของเมตาบอไลต์ต่างๆ ทางปัสสาวะ ส่วนค่าทางเภสัชจลนศาสตร์อื่นๆแสดงไว้ในตารางที่ 1 (Gram and Christiansen, 1975; Mellstrom and Bahr, 1981; Prox and Breyer-Pfaff, 1987)

ตารางที่ 1 เภสัชจลนศาสตร์ของยาต้านอาการซึมเศร้ากลุ่มไตรไซคลิก

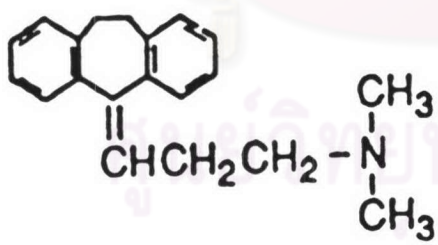
ยา	Tmax (hr)	%Plasma protein binding	Plasma half-life (hr)	Active Metabolite	Elimination half-life (hr)	Plasma conc. (ng./ml)
อิมมิพรามีน	1-2	75-95	8-16	เดซิพรามีน	9-28	150-250
อมิทริปทีลีน	2-12	80-95	10-50	นอร์ทริปทีลีน	9-36	125-300
เดซิพรามีน	7-8.5	90-95	16-90	-	9-28	80-250
นอร์ทริปทีลีน	4-6	70-90	7-60	-	9-36	50-150



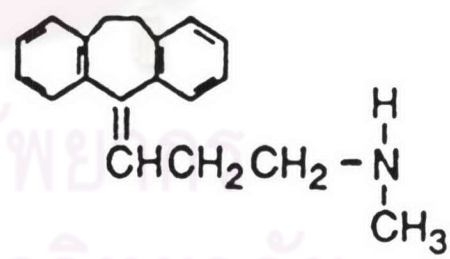
อิมิพรามีน



เดซิพรามีน (เมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์)



อมิทริปทีลีน



นอร์ทริปทีลีน (เมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์)

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของอิมิพรามีน, เดซิพรามีน, อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางกายภาพยาต้านอาการซึมเศร้ากลุ่มไตรไซคลิก

ยา	สูตรโมเลกุล	น้ำหนักโมเลกุล	จุดหลอมเหลว	ค่าpKa	การละลาย (ของรูปเกลือ)
อิมิพรามีน	$C_{19}H_{24}N_2$	280.41	170-174	9.5	ละลายได้ดีในน้ำ ละลายน้อยใน แอลกอฮอล์
เดซิพรามีน	$C_{18}H_{22}N_2$	266.37	214-218	9.5	ละลายได้ดีในน้ำ ละลายได้น้อยใน แอลกอฮอล์
อมิทริปทีลีน	$C_{20}H_{23}N$	277.39	196-197	9.4	ละลายได้ดีในน้ำ, แอลกอฮอล์, คลอโรฟอร์ม
นอร์ทริปทีลีน	$C_{19}H_{21}N$	263.40	215-200	9.7	ละลายน้ำ 1:50, เอธานอล 1:10, คลอโรฟอร์ม 1:5

ยาต้านอาการซึมเศร้ากลุ่มไตรไซคลิก นี้มีขนาดการใช้ในการรักษาที่กว้าง แตกต่างกันตามอายุ และอาการของโรค ทำให้มีระดับยาในพลาสมาแตกต่างกันในช่วงที่กว้าง ตั้งแต่ 50 – 300 นาโนกรัม/มล.ของพลาสมา (Evangelista and Paseual (eds.), 1996; Evangelista และคณะ (eds.), 2000) ดังนั้นจึงควรพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่มีความไวเพียงพอที่จะสามารถวิเคราะห์หาระดับยาที่ความเข้มข้นในพลาสมาต่ำๆได้

โดยจากรายงานการวิเคราะห์ต่างๆ ของยาอิมิพรามีนเมื่อเตรียมตัวอย่างด้วยการสกัดและใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเลต พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในพลาสมาคือ 5 นาโนกรัม/มล ของพลาสมา (Visser, Oostelbos and Toll, 1984; Rop and Conquy, 1986; Lin and Frade, 1987; Nielsen and Brosen, 1993; Yoo และคณะ, 1995; Queiroz และคณะ, 1995; Tanaka และคณะ, 1997; Hackett, Dusci and Ilett, 1998) ส่วนยาอมิทริปทีลีนเมื่อเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการสกัด และใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเลต พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในพลาสมาคือ 10 นาโนกรัม/มล. ของพลาสมา (Jonhson และคณะ, 1982; Visser, Oostelbos

and Toll, 1984; Lin and Frade, 1987; Yoo และคณะ, 1995; Queiroz และคณะ, 1995; Tanaka และคณะ, 1997; Aymard, 1997; Hackett, Dusci and Ilett, 1998)

นอกจากนี้ การวิเคราะห์ระดับยาเพื่อการติดตามระดับยาในพลาสมาของยากลุ่มนี้ก็มีความสำคัญ เพราะพบว่า เมื่อให้ยาขนาดเดียวกันกับผู้ป่วยแต่ละราย จะได้ระดับยาในพลาสมาที่แตกต่างกัน เนื่องจากความแปรปรวนของเมตาบอลิซึมของแต่ละบุคคล จึงไม่สามารถคาดผลการรักษาที่ถูกต้องได้ ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลการรักษาที่ดี จึงควรติดตามระดับยาในพลาสมา เพื่อปรับขนาดของยาให้ได้ระดับยาในพลาสมาอยู่ในช่วงการรักษาที่เหมาะสมกับอาการของโรค (Ereshefsky และคณะ, 1988; Orsulak และคณะ, 1989) ซึ่งจำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาเทคนิควิธีเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ เมื่อเตรียมตัวอย่างพลาสมาด้วยการแยกพลาสมาโปรตีน

2. เพื่อใช้เทคนิควิธีเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ เมื่อเตรียมตัวอย่างด้วยการแยกพลาสมา โปรตีนในการวิเคราะห์ยาต้านอาการซึมเศร้ากลุ่มไตรไซคลิก ในพลาสมาด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตรกราฟี (High-Performance Liquid Chromatography : HPLC)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

1. ได้วิธีวิเคราะห์ยาต้านอาการซึมเศร้ากลุ่มไตรไซคลิก และเมตาบอไลต์ โดยเตรียมตัวอย่างด้วยการแยกโปรตีน ซึ่งไม่เคยมีการรายงานที่ใดมาก่อน

2. สามารถนำเทคนิควิธีที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ยาอื่นๆ ด้วยหลักการนี้ได้

3. สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้ไปใช้ในการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์, ชีวสมมูลของยา และการติดตามระดับยาในพลาสมาของผู้ป่วยได้