บทที่ 3

ผลการศึกษาและการวิจารณ์ผล

ส่วนที่ 1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม ของการวิเคราะห์สารละลาย ของไนเฟดิพีน โดยใช้ HPLC

1.1 การตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วง UV ของตัวยา

จากการตรวจสอบคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วง UV ของตัวยาพบว่าไนเฟดิพีนมีความสามารถในการดูดกลืนแสงมากที่ความยาวคลื่น ประมาณ 210,236-238 นาโนเมตร และในช่วง 330-360 นาโนเมตร โดยจะดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ 237 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 2 ดังนั้นจึงเลือกใช้ UV Detector ในการศึกษาทดลองต่อไป

1.2 การทดลองเพื่อเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสม

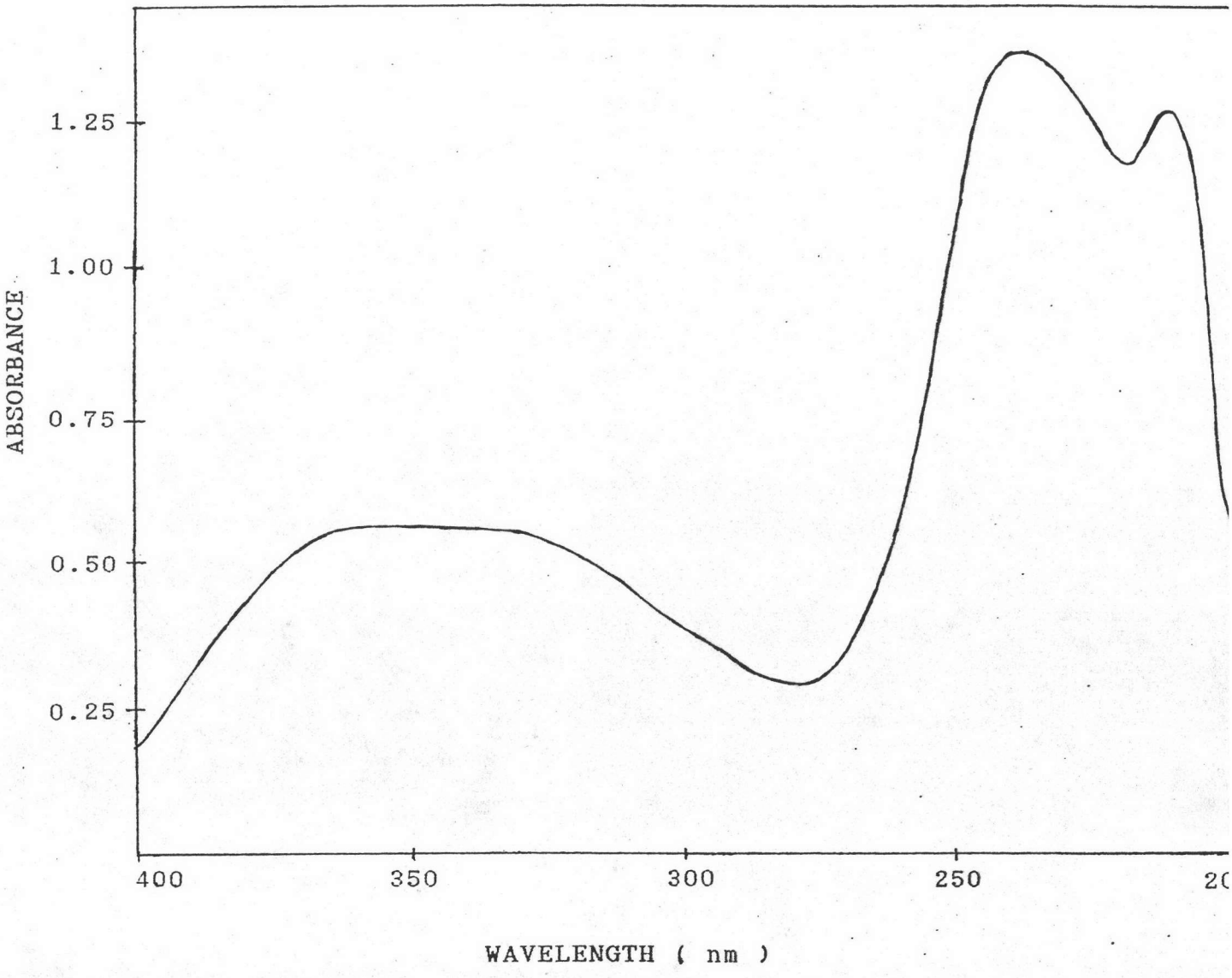
จากการศึกษาเปรียบเทียบการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 4 ค่า คือ 236,247, 250 และ 358 นาโนเมตร ถ้าใช้สารละลายไนเฟดิพีนที่มีความเข้มข้นเท่ากัน ตัวยาจะให้การดูดกลืนแสงที่มากที่สุด ที่ 236 นาโนเมตร รองลงมา คือ ที่ 247, 250, และ 358 นาโนเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

และจากลักษณะโครมาโทแกรม ดังแสดงในรูปที่ 3 การศึกษานี้ได้พิจารณาเลือกความยาวคลื่นที่ 247 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดที่จะใช้ เนื่องจาก ที่ความยาวคลื่น 236 นาโนเมตรนั้น Baseline ไม่เรียบ ซึ่งอาจมีสาเหตุจากมีการดูดกลืนแสงของเมทานอลที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ Mobile Phase เนื่องจาก UV Cutoff ของ เมทานอล นั้น อยู่ที่ 205 นาโนเมตร (Snyder and Kirkland, 1979) การเลือกความยาวคลื่นที่

ใกล้เคียงกับ UV Cutoffของ Mobile Phase จึงอาจมีการรบกวนสูงได้ ส่วนที่ความยาวคลื่นอีก 3 ค่าที่ใช้ในการทดลองนั้น มีลักษณะ Baseline ที่มีการ drift ขึ้นบ้าง โดยที่ 358 นาโนเมตรนั้น Baseline จะค่อนข้างเรียบ แต่ความสูงของพีคยาจะต่ำสุด ดังนั้นที่ความยาวคลื่น 247 นาโนเมตร จึงเป็นความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงได้ แลมีะลักษณะโครมาโทแกรมที่เหมาะสม

1.3 การเลือกบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเป็นส่วนผสมของ Mobile Phase

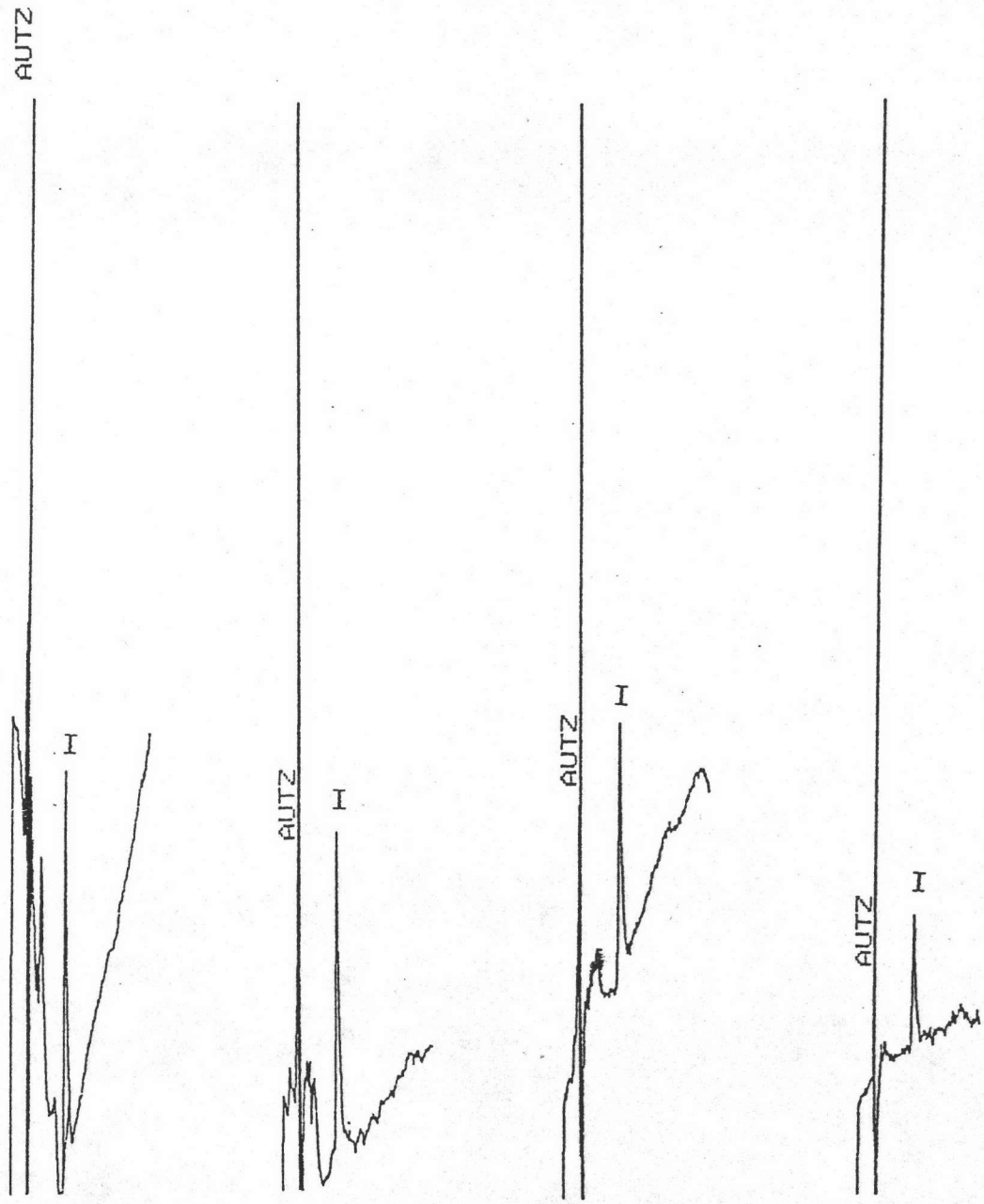
ลักษณะโครมาโทแกรมของไนเฟดิพีนในเมทานอล (ความเข้มข้น 4.0 มคก./มล.) เมื่อใช้ Mobile Phase เป็นส่วนผสมของอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.1 ความเข้มข้น 0.01โมลาร์ : เมทานอล และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.1 ความเข้มข้น 0.01โมลาร์ : เมทานอล ในอัตราส่วน 38:62 มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก ให้พีคของสารที่มีความสมมาตร, แคบ (Sharp), ไม่มี Peak tailing แต่จากการทดลองวิเคราะห์ในเวลาที่ต่างกันในแต่ละวัน พบว่า Mobile Phase ที่มีส่วนผสมของ อะซีเตทบัฟเฟอร์จะให้ค่า Retention time ของตัวยาที่ค่อนข้างคงที่ แม้ว่าเวลาของการวิเคราะห์จะนานถึง 8 ชั่วโมง ค่า Retention time ของตัวยาก็มีค่าต่างกันเพียงประมาณ 0.02 นาที ในขณะที่ Mobile Phase ที่มีส่วนผสมของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จะให้ค่า Retention time ของตัวยาต่างกันถึง 0.22 นาที เมื่อใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 6.5 ชั่วโมง ดังนั้น การศึกษาพัฒนาวิธีวิเคราะห์ไนเฟดิพีนครั้งนี้จึงเลือกใช้อะซิเตทบัฟเฟอร์เป็นส่วนผสมใน Mobile Phase



รูปที่ 2 UV สเปกตรัมของไนเฟดิพีนในเมทานอล
(ความเข้มข้น 39.68 มคก./มล.)

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยพื้นที่พีคของไนเฟดีพีนที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวยาที่ความยาวคลื่นต่างๆ

ความยาวคลื่น (nm.) / ความเข้มข้นของไนเฟดีพีน	ค่าเฉลี่ยพื้นที่พีค (SD), n=3			
	236	247	250	358
4.0 มคก./มล.	17514(0.23)	10973(0.08)	8543(0.16)	2667(0.02)
6.0 มคก./มล.	25548(0.06)	19887(0.05)	15167(0.27)	5605(0.19)



รูป ก รูป ข รูป ค รูป ง

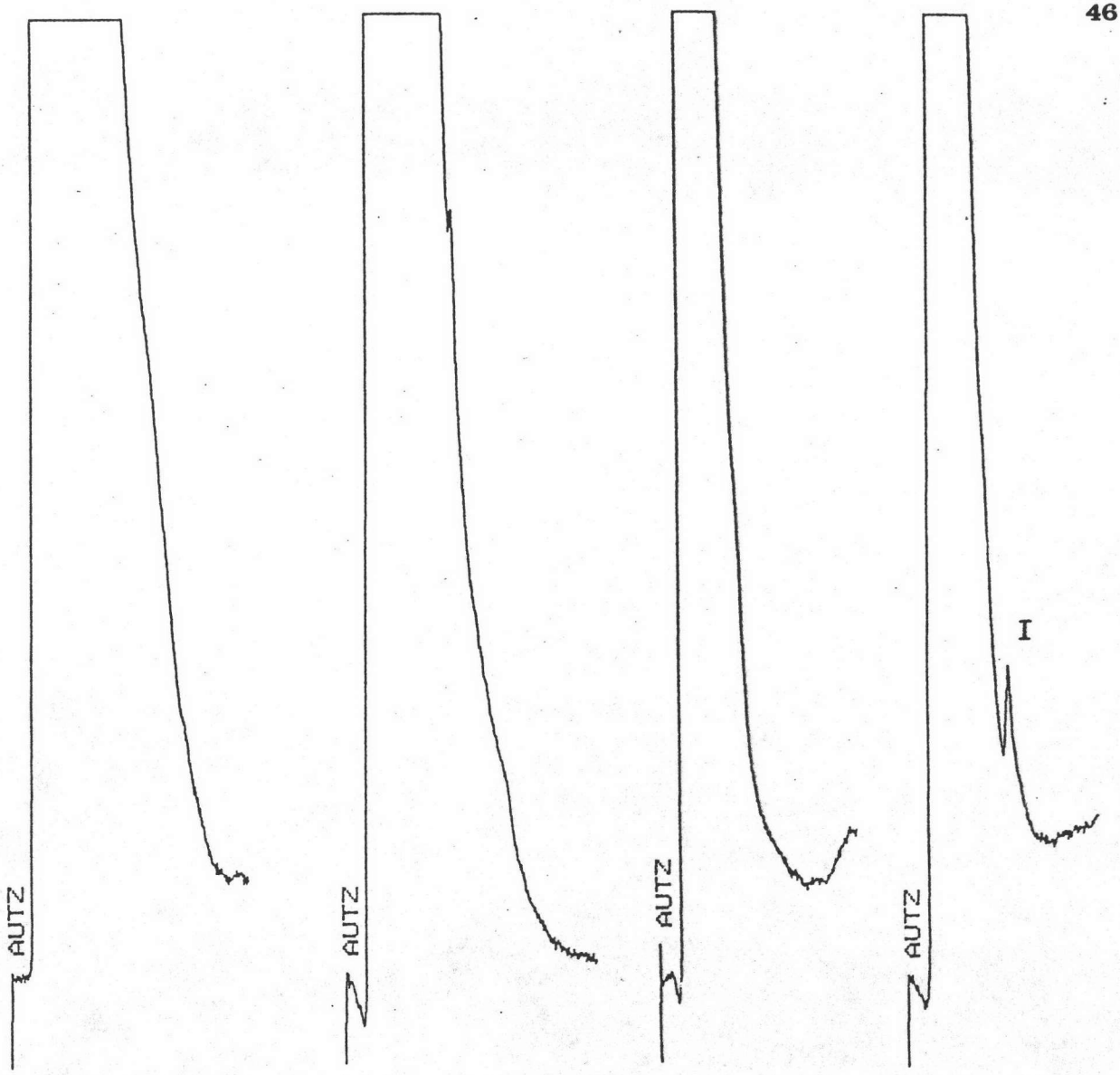
รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของไนเฟดิพีนในเมทานอล (พีค I) ความเข้มข้น 4.0 มคก./มล. เมื่อใช้ mobile phase เป็นสารผสมของ อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.1 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ กับเมทานอล ในอัตราส่วน 38:62 และ ตรวจวัดด้วย UV Detector ที่ 236 nm (ก), 247 nm (ข), 250 nm (ค) และ 358 nm (ง)

ส่วนที่ 2 การศึกษาวิธีที่จะทำให้ได้ตัวอย่างพลาสมา พร้อมที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้

2.1 การแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา

2.1.1 การตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล จะไม่ปรากฏพีคของไนเฟดิพีน บนโครมาโทแกรมเลย ในขณะที่การใช้แอซีโตไนไตรล์ ตกตะกอนพลาสมาโปรตีน ทำให้ปรากฏพีคของไนเฟดิพีน แต่ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาที่ได้จากการใช้แอซีโตไนไตรล์ ปรากฏว่าได้เกิน 100 เปอร์เซนต์ ซึ่งแสดงถึงการรบกวนของ Endogenous Substance ลักษณะโครมาโทแกรมของพลาสมาที่ได้จากการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยแอซีโตไนไตรล์ มีความสะอาดมากกว่าตัวอย่างที่ตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล ดังแสดงในรูปที่ 4

2.1.2 โดยอาศัยหลักการที่ว่า สารที่มีคุณสมบัติคล้ายกัน ย่อมสามารถละลายเข้าด้วยกันได้ (Like Dissolves Like) จึงใช้เฮกเซนซึ่งเป็นสารที่ไม่มีขั้ว เติมลงไปในตัวอย่างพลาสมา เพื่อที่จะละลายสาร Endogenous ที่ไม่มีขั้วเข้ามาในชั้นเฮกเซน แล้วจึงตกตะกอนพลาสมาโปรตีนนั้น จะเห็นว่าเฮกเซนมีส่วนช่วยให้ตัวอย่างพลาสมามีความสะอาดขึ้นบ้าง ซึ่งสังเกตได้ จากการที่พีคของสาร Endogenous ที่มีขนาดเล็ก ไม่ว่าจะเป็นตัวอย่างที่ตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล หรือ แอซีโตไนไตรล์ แต่อย่างไรก็ตามก็ยังไม่ช่วยทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนได้ จากการที่ไม่มีพีคของไนเฟดิพีนปรากฏบนโครมาโทแกรมของตัวอย่างพลาสมา ที่ตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล หรือ มีพีคของไนเฟดิพีน เมื่อใช้แอซีโตไนไตรล์ตกตะกอนพลาสมาโปรตีน แต่เปอร์เซนต์การกลับคืนของยามีค่าต่ำมาก(41%) ดังแสดงในรูปที่ 5



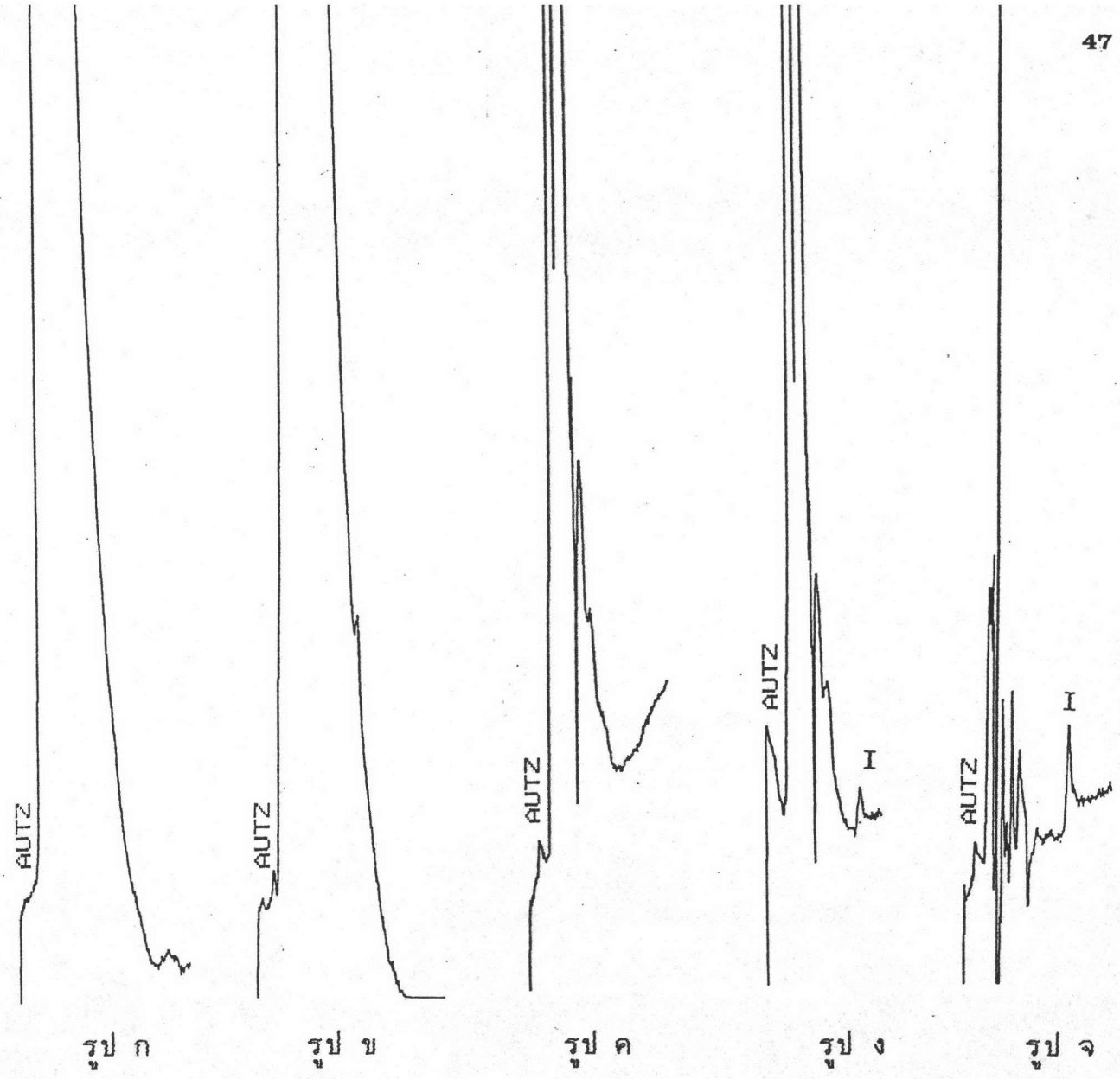
รูป ก รูป ข รูป ค รูป ง

รูปที่ 4 โครมาโทแกรมของพลาสมา ที่ได้ภายหลังจากการตกตะกอนแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลและแอซีโตไนไตรล์

รูป ก, ข เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา และ พลาสมาที่มีไนเฟดิพีน (พีค I) ตามลำดับ เมื่อตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล

รูป ค, ง เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา และ พลาสมาที่มีไนเฟดิพีนตามลำดับ เมื่อตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยแอซีโตไนไตรล์

ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา = 240.0 นาโนกรัม/มล.



รูป ก รูป ข รูป ค รูป ง รูป จ

<u>รูปที่ 5</u> โครมาโทแกรมของพลาสมาที่ได้ภายหลังจากการสกัด Endogenous Substance ออกบางส่วนก่อนด้วยเฮกเซน แล้วตกตะกอนแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล และ แอซีโตไนไตรล์

รูป ก, ข เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา และ พลาสมาที่มีไนเฟดิพีน (พีค I) ตามลำดับ เมื่อใช้เมทานอลตกตะกอนพลาสมาโปรตีน

รูป ค, ง เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา และ พลาสมาที่มีไนเฟดิพีน ตามลำดับ เมื่อใช้แอซีโตไนไตรล์ตกตะกอนพลาสมาโปรตีน

รูป จ เป็นโครมาโทแกรมของไนเฟดิพีนที่เตรียมเหมือนตัวอย่างทุกประการ ยกเว้นไม่มีพลาสมา

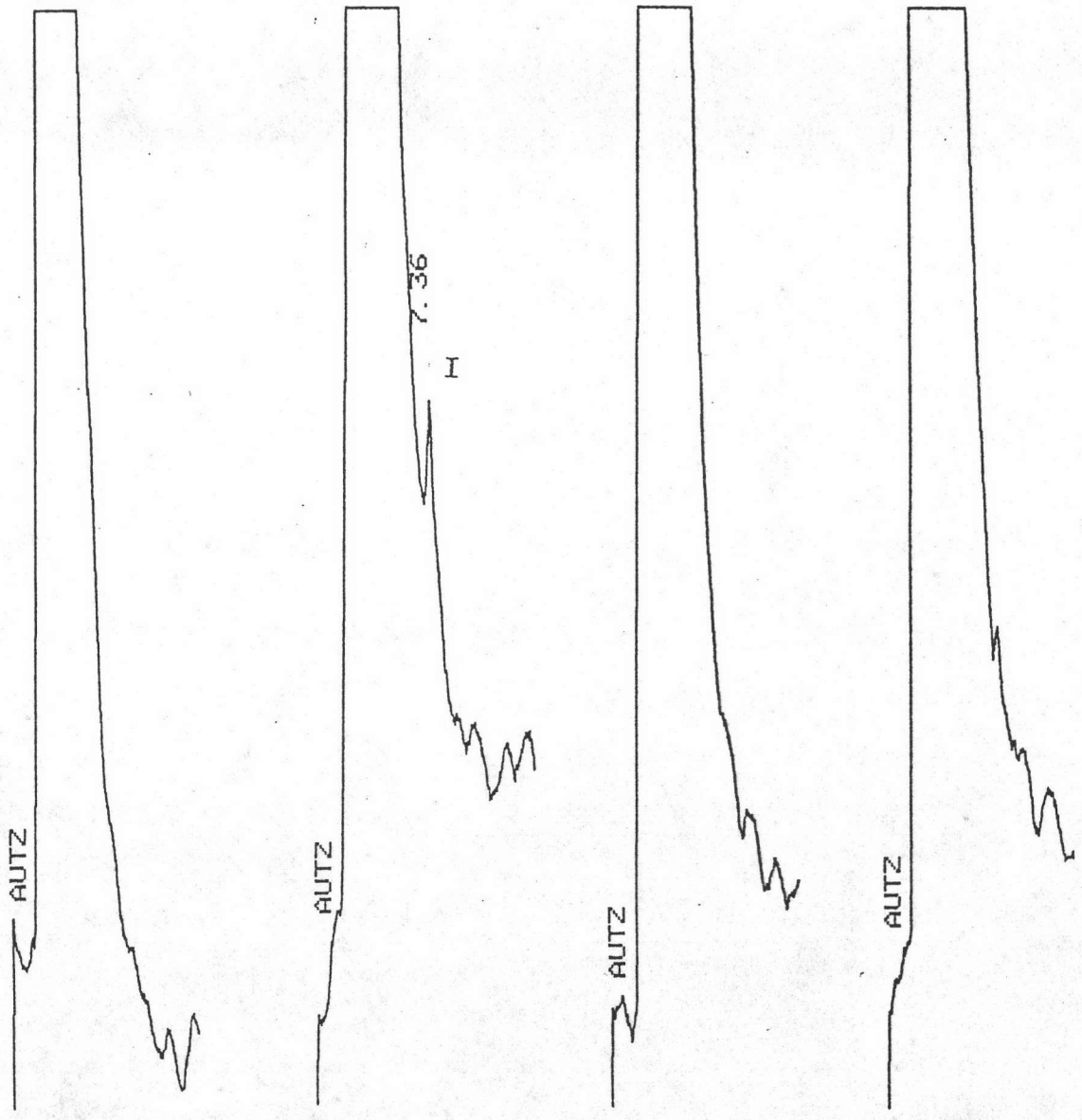
ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา = 240.0 นาโนกรัม/มล.

2.1.3 การใช้ซิงค์ซัลเฟต ร่วมกับการตกตะกอนพลาสมาโปรตีน ทำให้สามารถตรวจพบ ไนเฟดิพีนในตัวอย่างพลาสมา ได้ดีกว่าการใช้เมทานอลเพียงอย่างเดียวในการตกตะกอนพลาสมาโปรตีน นั่นคือ ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของตัวยาประมาณ 84 เปอร์เซนต์ แต่อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าสูง(= 240.0 นาโนกรัม/มล. พลาสมา) กว่าความเข้มข้นสูงสุดในพลาสมา ดังนั้น ถ้าจะวิเคราะห์ไนเฟดิพีนที่มีปริมาณต่ำกว่านี้มากๆ วิธีการนี้จึงยังอาจจะไม่เหมาะสม การใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยแอซีโตไนไตรล์ พบว่าไม่ได้ให้ผลดีไปกว่าการใช้แอซีโตไนไตรล์เพียงอย่างเดียว คือ โครมาโทแกรมที่ได้ไม่มีความสะอาดกว่าการใช้แอซีโตไนไตรล์เพียงอย่างเดียว และขนาดของพีคยาที่ปรากฏ ยังมีขนาดเล็กกว่าเมื่อใช้แอซีโตไนไตรล์เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 6 และรูปที่ 4

2.1.4 การทำให้พลาสมาโปรตีนมีลักษณะผิดไปจากธรรมชาติ โดยใช้สารละลายยูเรียเติมลงในพลาสมา พบว่าถ้าใช้เมทานอลตกตะกอนพลาสมาโปรตีนจะทำให้ได้สารละลายส่วนบนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยง มีลักษณะขุ่น และถ้าใช้แอซีโตไนไตรล์ตกตะกอนพลาสมาโปรตีน พบว่า ลักษณะสารละลายส่วนบนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงใส แต่ไม่ปรากฏพีคของไนเฟดิพีนบนโครมาโทแกรม รูปที่ 7

เพื่อให้ง่ายต่อการเปรียบเทียบผลการทดลอง จึงได้สรุปรวบรวมผลการทดลองแยกพลาสมาโปรตีนโดยการตกตะกอนโปรตีน ไว้ในตารางที่ 2 และตารางที่ 3

กล่าวโดยสรุป สำหรับการเตรียมตัวอย่างพลาสมาสำหรับนำไปวิเคราะห์โดย HPLC โดยการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนนั้น ไม่น่าจะเหมาะกับการวิเคราะห์หาไนเฟดิพีนในตัวอย่างพลาสมา เนื่องจากไนเฟดิพีนมีการจับกับพลาสมาโปรตีนอย่างเหนียวแน่นมาก ดังนั้น การแยกพลาสมาโปรตีนออกจาก

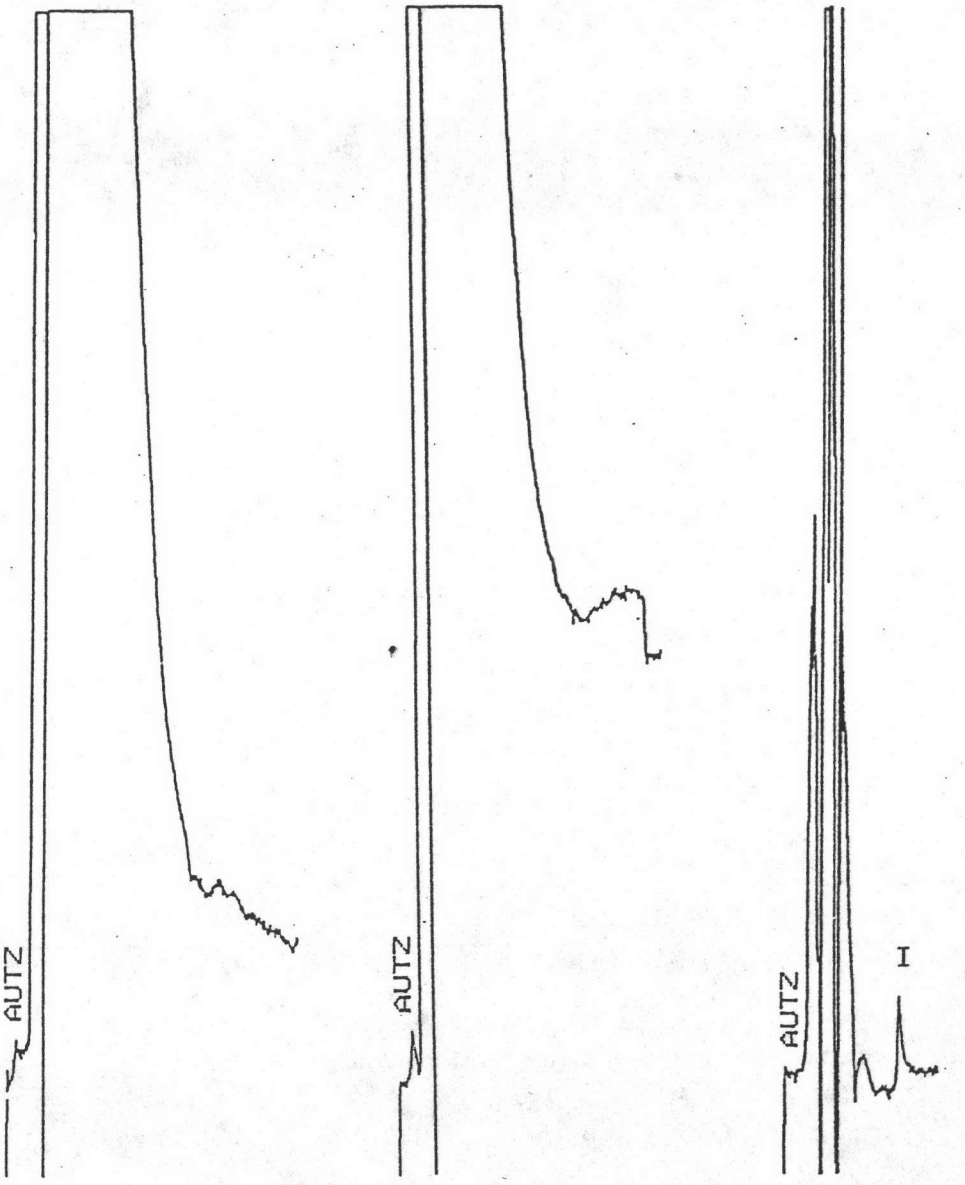


รูป ก รูป ข รูป ค รูป ง

รูปที่ 6 โครมาโทแกรมของพลาสมาที่ได้ภายหลังจากการตกตะกอนแยกพลาสมาโปรตีน ด้วยเมทานอลและแอซีโตไนไตรล์ร่วมกับซิงค์ซัลเฟต 10 %ในน้ำ

รูป ก, ข เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา และ พลาสมาที่มีไนเฟดิพีน (พีค I) ตามลำดับ เมื่อใช้เมทานอลตกตะกอนพลาสมาโปรตีน

รูป ค, ง เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา และ พลาสมาที่มีไนเฟดิพีน ตามลำดับ เมื่อใช้แอซีโตไนไตรล์ ตกตะกอนพลาสมาโปรตีน ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา = 240.0 นาโนกรัม/มล.



รูป ก รูป ข รูป ค

รูปที่ 7 โครมาโทแกรมของพลาสมาที่ได้ภายหลังจากการแปลงสภาพพลาสมาโปรตีนก่อนจิงตกตะกอนแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอซีโตไนไตรล์

รูป ก, ข เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา และพลาสมาที่มีไนเฟดิพีน (พีค I) ตามลำดับ เมื่อใช้แอซีโตไนไตรล์ตกตะกอนพลาสมาโปรตีน

รูป ค เป็นโครมาโทแกรมของไนเฟดิพีนที่เตรียมเหมือนตัวอย่างทุกประการ ยกเว้นไม่มีพลาสมา

ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา= 240.0 นาโนกรัม/มล.

ตารางที่ 2 การแยกพลาสมาโปรตีนออกจากพลาสมาโดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล

วิธีการ	ลักษณะ (Appearance)	ลักษณะโครมาโทแกรม	เปอร์เซนต์การกลับคืนของตัวยา
1. ใช้เมทานอลเพียงอย่างเดียว	เป็นตะกอนของพลาสมาสีขาวอัดแน่นอยู่ก้นหลอดทดลอง สารละลายส่วนบนใส	ลักษณะพีคสาร Endogenous มีขนาดใหญ่ มีการรบกวนของ Endogenous Substance ซึ่งใช้เวลานานเกินกว่า 7 นาที จึงมีการรบกวนน้อยลงแต่ไม่ปรากฏพีคของยา	ไม่ปรากฏพีคตัวยา
2. สกัดด้วยเฮกเซนก่อน จึงตกตะกอนพลาสมาโปรตีน	จะเป็นตะกอนสีขาวลักษณะคล้ายข้อ 1. สารละลายส่วนบนใส	ลักษณะพีคสาร Endogenous มีขนาดเล็กกว่าเมื่อใช้เมทานอลเพียงอย่างเดียวมีการรบกวนของ Endogenous Substance สูง แต่ก็ยังไม่ปรากฏพีคของตัวยา	ไม่ปรากฏพีคตัวยา
3. ใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมในการตกตะกอนพลาสมาโปรตีน	ตะกอนพลาสมาโปรตีนสีขาว อัดแน่นอยู่ก้นหลอดทดลอง สารละลายส่วนบนใส	พีค Endogenous มีลักษณะเล็กลงกว่าเมื่อใช้เมทานอลเพียงอย่างเดียว ปรากฏพีคของตัวยา	84.48

ตารางที่ 2 (ต่อ)

วิธีการ	ลักษณะ (Appearance)	ลักษณะโครมาโทแกรม	เปอร์เซนต์การกลับคืนของตัวยา
4. เติมสารละลายบุเรียก่อน แล้วจึงตกตะกอนพลาสมาโปรตีน	ตะกอนพลาสมาโปรตีนขุ่นเขา สีขาวคล้ายวุ้น แม้เมื่อเพิ่มเวลาในการหมุนเหวี่ยงแล้วก็ตาม สารละลายชั้นบนยังขุ่นมาก	-	-

ตารางที่ 3 การแยกพลาสมาโปรตีนออกจากพลาสมาโดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยแอซีโตไนไตรล์

วิธีการ	ลักษณะ (Appearance)	ลักษณะโครมาโทแกรม	เปอร์เซนต์การกลับคืนของตัวยา
1. ใช้แอซีโตไนไตรล์เพียงอย่างเดียว	ตะกอนพลาสมาโปรตีนเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนสีเหลืองอมส้ม เหนียว สารละลายชั้นบนใส	ปรากฏพีคยาบนโครมาโทแกรม แต่ก็มี Endogenous Substance รบกวนพีคยา	118.10
2. สกัดด้วยเฮกเซนก่อน จึงตกตะกอนพลาสมาโปรตีน	ตะกอนพลาสมาโปรตีนเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนสีเหลืองอมส้ม เช่นเดียวกับข้อ 1. สารละลายชั้นบนใส	พีคของสาร Endogenous มีขนาดเล็กลงกว่าเมื่อใช้แอซีโตไนไตรล์เพียงอย่างเดียว ปรากฏพีคยา แต่ขนาดพีคเล็ก แม้จะใช้ความเข้มข้นของไนเฟดีนที่สูง	41.43
3. ใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมในการตกตะกอนพลาสมาโปรตีน	ตะกอนพลาสมาโปรตีนสีส้มอ่อน สารละลายชั้นบนใส	พีคของสาร Endogenous มีขนาดใหญ่กว่าเมื่อใช้แอซีโตไนไตรล์เพียงอย่างเดียวเล็กน้อย ปรากฏพีคยา แต่ขนาดของพีคก็ยังเล็ก	49.64

ตารางที่ 3 (ต่อ)

วิธีการ	ลักษณะ (Appearance)	ลักษณะโครมาโทแกรม	เปอร์เซนต์การกลับคืนของตัวยา
4. เติมสารละลายยูเรียก่อน แล้วจึงตกตะกอนพลาสมาโปรตีน	เมื่อเติมสารละลายยูเรียพลาสมาจะเปลี่ยนจากสีส้มขุ่น เป็นสีส้มใส จากการตกตะกอน ได้ตะกอนพลาสมาโปรตีน ขุ่นขาวคล้ายนม สารละลายชั้นบนใส	พีคของสาร Endogenous มีขนาดใหญ่มาก และไม่ปรากฏพีคยา แสดงว่าตัวอย่างพลาสมาไม่ได้มีความสะอาดไปกว่าการใช้แอซีโตไนไตรล์เพียงอย่างเดียว	-

ตัวอย่างพลาสมา ย่อมดึงไนเฟดิพีนออกมาด้วยเช่นกัน ทำให้ไม่ปรากฏพีคของไนเฟดิพีนบนโครมาโทแกรมเลย หรือ ปรากฏพีคขนาดเล็กซึ่งไม่อยู่ในเกณฑ์ที่น่าใช้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณได้ แต่จากการศึกษาขั้นต้น ทำให้ได้แนวความคิดว่า แอซีโตไนไตรล์เป็นสารที่น่าจะนำมาใช้ ในกระบวนการเตรียมตัวอย่างพลาสมา นอกจากนี้เฮกเซน ก็เป็นสารที่น่าจะนำมาใช้ร่วมในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ต่อไป ถึงแม้ยูเรียจะไม่ให้ผลดีที่เด่นชัดในการตกตะกอนโปรตีน แต่ลักษณะของพลาสมาที่เปลี่ยนจากขุ่นเป็นใสเมื่อเติมยูเรียนั้น ประกอบกับหลักทางทฤษฎีทำให้เป็นสารที่น่าจะนำมาใช้ในกระบวนการศึกษาทดลองอีกชนิดหนึ่ง

2.2 การแยกตัวยาออกจากพลาสมา

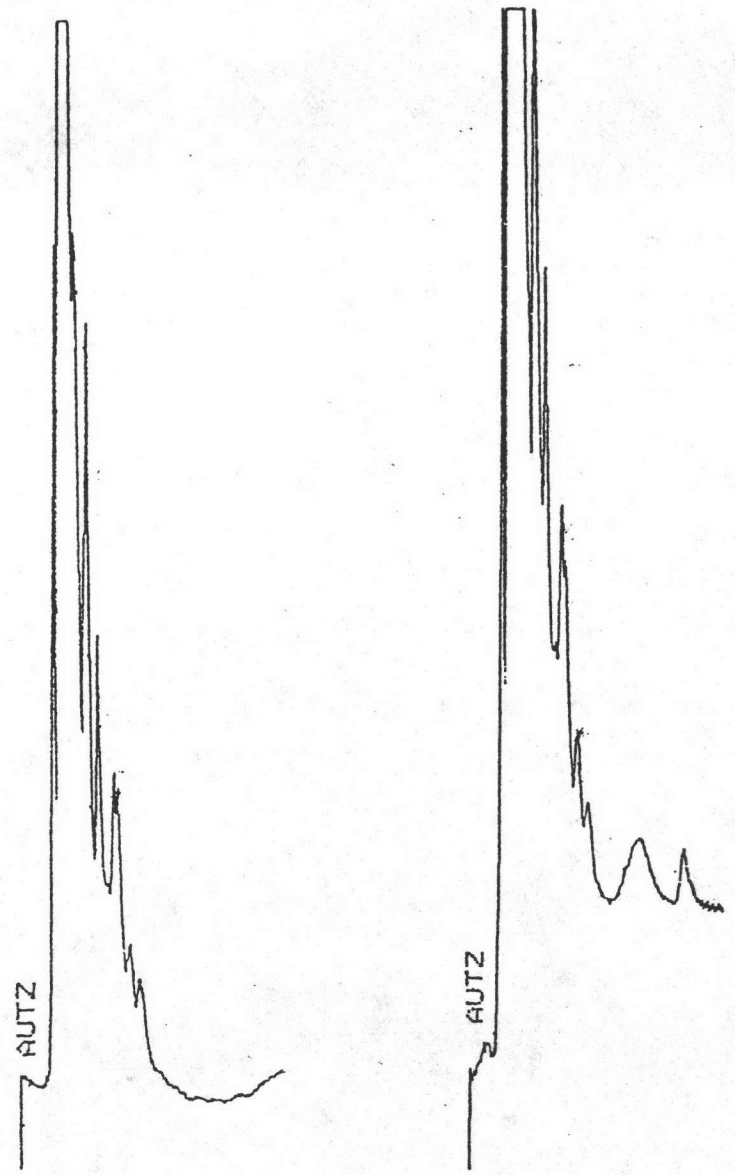
2.2.1 การทดลอง เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของไนเฟดิพีนในตัวทำละลายต่างๆ ซึ่งแสดงในตารางที่ 4 จะเห็นว่า ไนเฟดิพีนสามารถกระจายตัวจากชั้นน้ำเข้าไปในชั้นของคลอโรฟอร์ม(CF) หรือสารผสมของแอซีโตไนไตรล์ : คลอโรฟอร์ม(ACN : CF) ได้ดีกว่าเข้าไปในชั้นเอทิลอะซีเตท (EA) และสารผสมของ แอซีโตไนไตรล์ : เอทิลอะซีเตท (ACN : EA) และจากการเปรียบเทียบสารสกัดตัวเดียวกันคือ ACN : EA (1:3) แต่ปรับตัวยาให้อยู่ในสภาพกรดและด่างนั้น จะเห็นว่าในสภาพที่เป็นด่าง ตัวยาจะกระจายตัวเข้าไปในชั้นสารสกัดได้ดีกว่าในสภาพที่เป็นกลาง หรือ เป็นกรด

2.2.2 การกำหนดปริมาตรที่เหมาะสมของสารสกัด ในการสกัดไนเฟดิพีน

จากการใช้สารสกัดต่างๆจำนวน 4 มล. ทำการสกัดตัวอย่างพลาสมาที่ไม่มีตัวยา 1 ครั้ง เปรียบเทียบกับการสกัดตัวอย่างพลาสมาที่ไม่มีตัวยาด้วยสารสกัดชนิดเดียวกัน 2 ครั้ง ๆ ละ 2 มล. โครมาโทแกรมแสดงในรูปที่ 8-11 และ ผลการทดลองได้สรุปรวบรวมไว้ในตารางที่ 5 และ 6 จะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบในสารสกัดชนิดเดียวกันนั้น การสกัด 2 ครั้งไม่ได้ทำให้ตัวอย่างพลาสมามีความสะอาดมากไปกว่าการสกัดเพียงครั้งเดียว นอกจากนี้

ตารางที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (Distribution Coefficient, D) ของไนเฟดิพีนและเปอร์เซนต์ที่สารถูกสกัดทั้งหมด (% Total Extracted)

สารสกัด	สัมประสิทธิ์การกระจายตัว (D)	เปอร์เซนต์ที่สารถูกสกัดทั้งหมด	
		สกัดแบบ4X1มล.	สกัดแบบ2X2มล.
1. EA	1.642	92.92	98.25
2. ACN:EA (1:3)			
- สภาพเป็นกลาง	0.493	79.76	88.66
- สภาพเป็นด่าง (pH 9.85)	0.818		
- สภาพเป็นกรด (pH 2.17)	0.578		
3. CF	41.50	99.70	99.99
4. ACN:CF	41.50	99.70	99.99



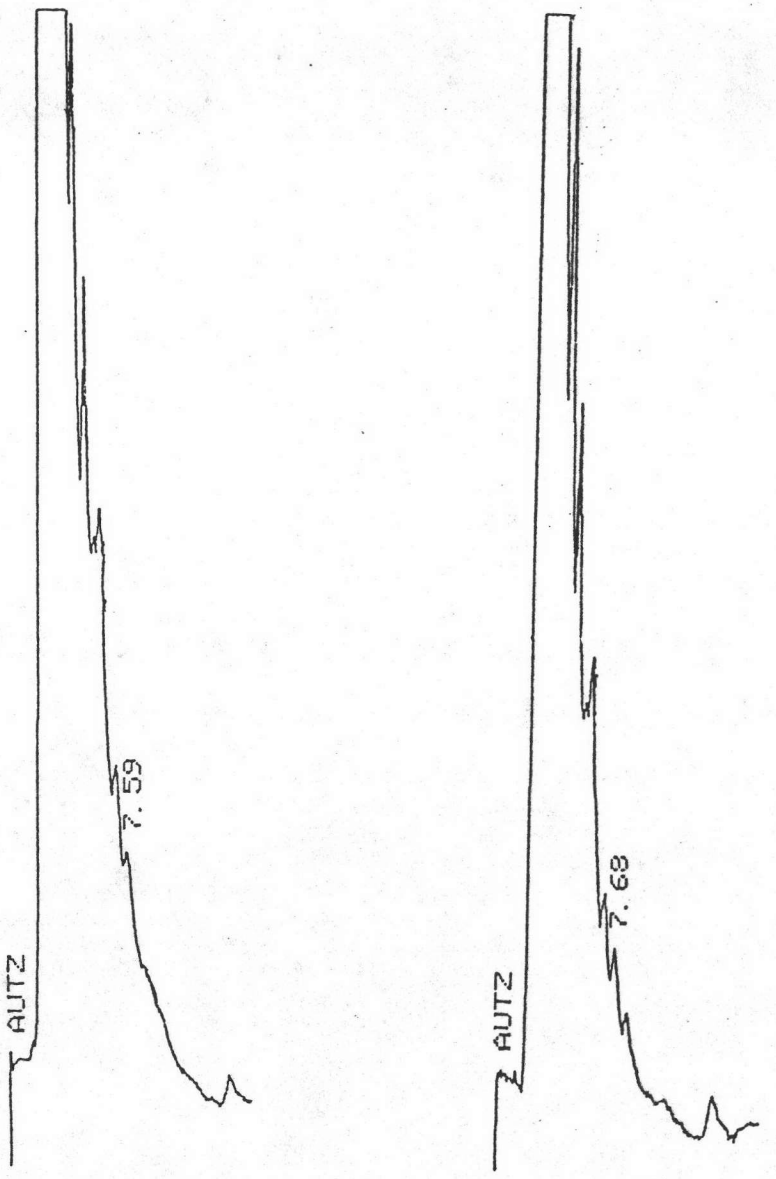
รูป ก รูป ข

รูปที่ 8 โครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา ที่ได้ภายหลังจากการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท

รูป ก ได้จากการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท 4 มล.

รูป ข ได้จากการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท 2 ครั้ง ครั้งละ 2 มล.

ค่า Retention Time ของไนเฟดิพีน = 7.71 นาที (ไม่ได้แสดงโครมาโทแกรม)



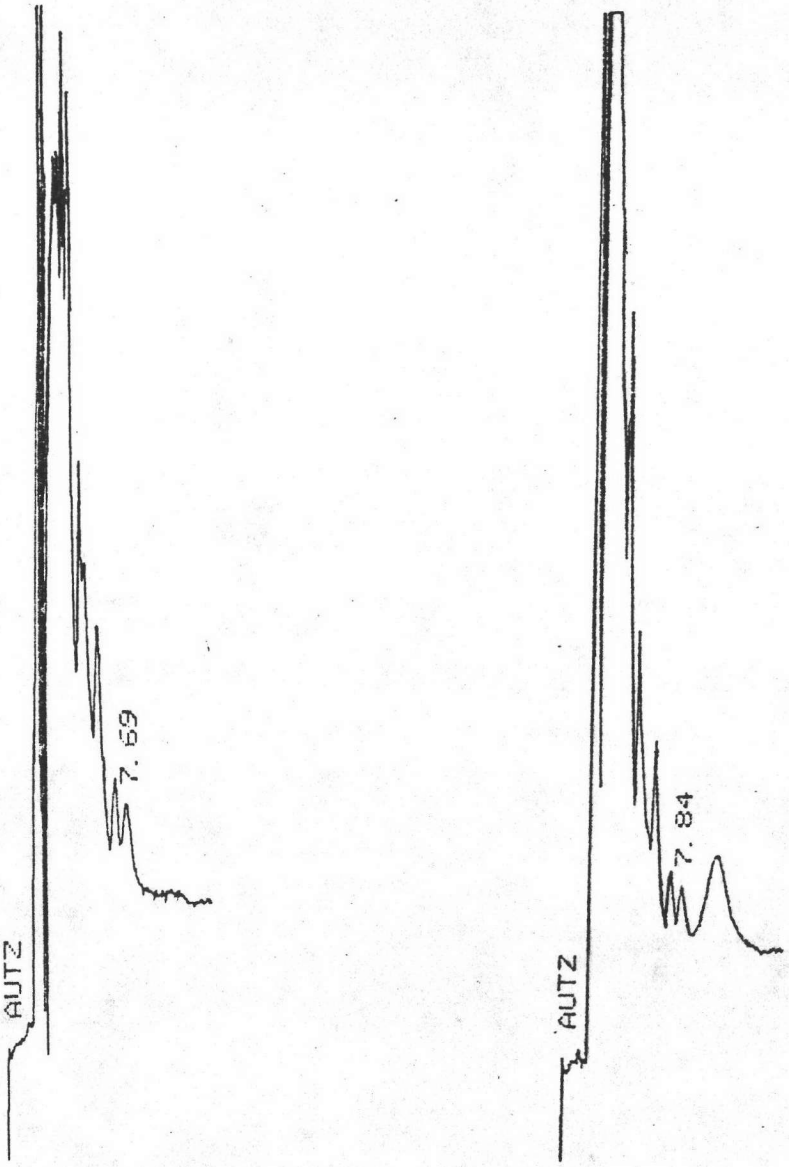
รูป ก รูป ข

<u>รูปที่ 9</u> โครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา ที่ได้ภายหลังจากการสกัดด้วยสารผสมของแอซีโตไนไตรล์ และเอทิลอะซิเตท (ACN : EA =1:3)

รูป ก ได้จากการสกัดด้วยสารสกัดดังกล่าว 4 มล.

รูป ข ได้จากการสกัดด้วยสารสกัดดังกล่าว 2 ครั้ง ครั้งละ 2 มล.

ค่า Retention Time ของไนเฟดิพีน = 7.71 นาที (ไม่ได้แสดงโครมาโทแกรม)



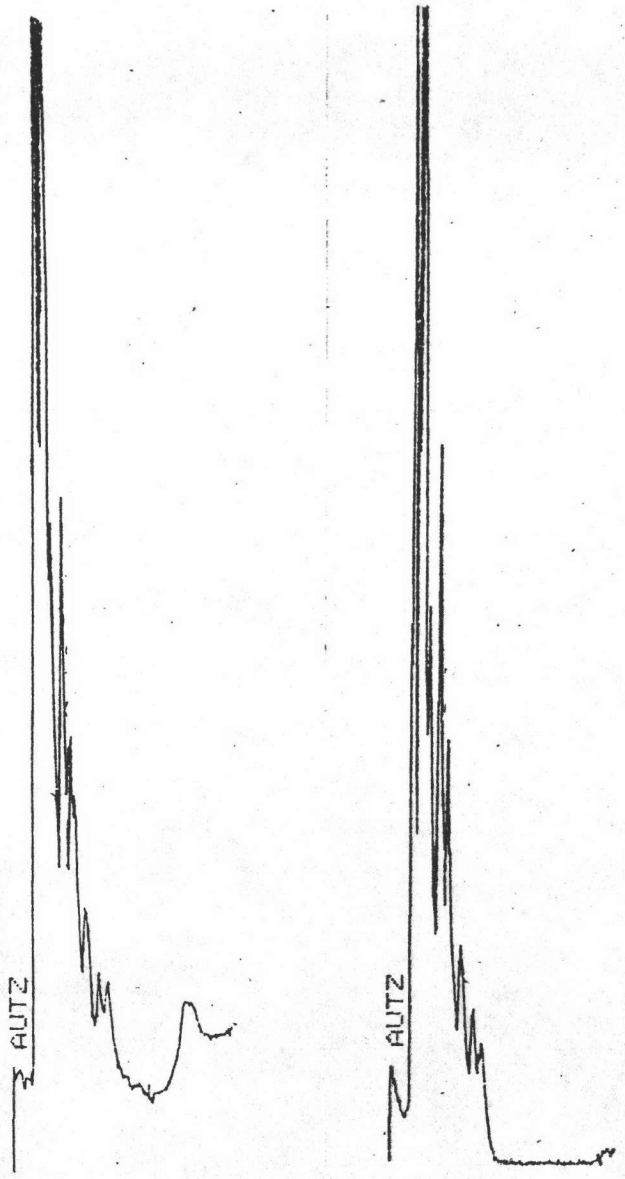
รูป ก รูป ข

<u>รูปที่ 10</u> โครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา ที่ได้ภายหลังจากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

รูป ก ได้จากการสกัดด้วยสารสกัดดังกล่าว 4 มล.

รูป ข ได้จากการสกัดด้วยสารสกัดดังกล่าว 2 ครั้ง ๆละ 2 มล.

ค่า Retention Time ของไนเฟดิพีน = 7.71 นาที (ไม่ได้แสดงโครมาโทแกรม)



รูป ก รูป ข

รูปที่ 11 โครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา ที่ได้ภายหลังจากการสกัดด้วยสารผสมของแอซีโตไนไตรล์ และ คลอโรฟอร์ม =1:3 (ACN:CF =1:3)

รูป ก ได้จากการสกัดด้วยสารสกัดดังกล่าว 4 มล.

รูป ข ได้จากการสกัดด้วยสารสกัดดังกล่าว 2 ครั้งๆละ 2 มล.

อัตราการไหลของ Mobile Phase = 1.3 มล./นาที , t_R ของไนเฟดิพีน = 6.13 นาที (ไม่ได้แสดงโครมาโทแกรม)

ตารางที่ 5 การสกัดพลาสมาที่ไม่มีตัวยา (Plasma Blank) ด้วยสารสกัดชนิดต่าง ๆ เพียง 1 ครั้ง

สารสกัด / หัวข้อ	EA	ACN:EA 1:3	CF	ACN:CF 1:3
1.ลักษณะที่ปรากฏ (Appearance)				
-ชั้นบน	ใส,ไม่มีสี	ใส,ไม่มีสี	สีเหลืองอมส้ม,ขุ่นของพลาสมา	สีเหลืองอมส้ม,ขุ่นของพลาสมา
-ส่วนต่อระหว่างชั้นบนและชั้นล่าง	แผ่นขาวบาง ๆ	แผ่นบางขุ่นสีเหลืองอ่อน	—	—
-ชั้นล่าง	สีเหลืองขุ่นๆของพลาสมา	สีเหลืองเข้ม,ขุ่นของพลาสมา	ขุ่นต้องนำไปหมุนเหวี่ยงต่ออีก 10นาที จึงใสขึ้น	ขุ่นต้องนำไปหมุนเหวี่ยงต่ออีก 10นาที จึงใสขึ้น
2.ปริมาตรของชั้นต้วทำละลายอินทรีย์หลังจากหมุนเหวี่ยง	3.80	3.35	3.45 - 3.60	3.75
3.ระยะเวลาที่ใช้ต่อตัวอย่าง	ประมาณ 35 นาที	ประมาณ 50 นาที	ประมาณ 60 นาที	ประมาณ 60 นาที
4.ลักษณะโครมาโทแกรม				
-การรบกวนของ endogenous	ไม่มีการรบกวนเพราะถูกชะออกมาหมดภายใน 6.8 นาที	มีพีคห่างจาก t_R ตัวยาประมาณ 0.2 นาที	มีพีคที่ t_R ของตัวยาอย่างชัดเจน	มีพีคที่ใกล้เคียงกับ t_R ของตัวยา
-Baseline	ค่อนข้างเรียบ	ค่อนข้างเรียบ	เรียบ	เรียบ
-Noise	—	—	มีมาก	มีมาก

ตารางที่ 6 การสกัดพลาสมาที่ไม่มีตัวยา (Plasma Blank) ด้วยสารสกัดชนิดต่าง ๆ 2 ครั้ง (2 x 2 มล.)

สารสกัด หัวข้อ	EA	ACN:EA 1:3	CF	ACN:CF 1:3
1.ลักษณะที่ปรากฏ (Appearance)				
-ชั้นบน	ใส,ไม่มีสี	ใส,ไม่มีสี	สีเหลืองอมส้มของพลาสมา	สีเหลืองอมส้มของพลาสมา
-ส่วนต่อระหว่างชั้นบนและชั้นล่าง	แผ่นขาวบาง ๆ	แผ่นบาง ๆ คล้ายวุ้นสีเหลือง	แผ่นขาวบาง	แผ่นขาวบาง
-ชั้นล่าง	สีเหลืองขุ่นๆของพลาสมา	ชั้นขุ่นสีเหลืองอัดแน่นของพลาสมา	ใส,ไม่มีสี	ใส,ไม่มีสี
2.ปริมาตรของชั้นตัวทำละลายอินทรีย์หลังจากหมุนเหวี่ยง	1.75	1.20	1.10	1.30-1.40
3.ระยะเวลาที่ใช้ต่อตัวอย่าง	ประมาณ 45 นาที	ประมาณ 60 นาที	ประมาณ 50 นาที	ประมาณ 50 นาที
4.ลักษณะโครมาโทแกรม				
-การรบกวนของ endogenous	มีมากกว่าการสกัด 1 ครั้ง และมีพีคที่ t_R ของยาเรียบ	มีการรบกวนคล้ายกับเมื่อสกัดครั้งเดียวและมีพีคที่ t_R ของตัวยาเรียบ	มีพีค t_R ของตัวยาอย่างชัดเจน	มีพีคที่ใกล้เคียงกับ t_R ของยาเช่นเดียวกับการสกัดครั้งเดียว
-Baseline	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ
-Noise	—	—	มาก	มาก

ยังต้องเสียเวลาในการสกัดมากกว่าอีกด้วย ในกรณีที่ใช้ EA หรือ สารผสมของ ACN : EA โครมาโทแกรมจากการสกัดแบลงค์พลาสมา ด้วย EA ครั้งเดียว 4 มล. จะมีความสะอาดมากกว่าแบบอื่น ๆ ทั้งหมด และยังไม่มี Endogenous Peak ที่ค่า Retention Time (t_R) ของตัวยา (ประมาณ 7.7 นาที) อีกด้วย จากรูปที่ 8 ก. จะเห็นว่า Endogenous Substance จะถูกชะออกมาหมด ภายใน 6.8 นาที หลังจากนั้น Baseline จะเรียบ ซึ่งเหมาะกับการที่พีคยาจะปรากฏในช่วงนี้ ส่วนโครมาโทแกรมจากสารสกัดอื่น ๆ นั้น พบว่าจะมีการรบกวนจาก Endogenous Substance ที่ใกล้เคียงกับ t_R ของตัวยา

ดังนั้นการสกัดด้วย EA 1 ครั้ง แม้ว่า จากการคำนวณ จะสามารถสกัดยาได้ 92.92 เปอร์เซนต์ ซึ่งจะน้อยกว่าการใช้ CF หรือ ACN : CF (ตารางที่ 4) แต่ค่านี้ (92.92 เปอร์เซนต์) ก็ยังสามารถถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่สูงมากพอ ซึ่งเมื่อพิจารณาผลการสกัดแบลงค์พลาสมาประกอบด้วยแล้ว การแยกตัวยาออกจากพลาสมาโดยใช้เอทิลอะซีเตทสกัดเพียงครั้งเดียว จึงนับว่าเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะได้ทำการทดลองต่อไป

2.3 การสร้างกระบวนการที่สมบูรณ์ ในการวิเคราะห์ไนเฟดีพีนในตัวอย่างพลาสมา

กระบวนการในการสกัดไนเฟดิพีน ออกจากตัวอย่างพลาสมา ที่เหมาะสมที่สุดจะพิจารณาจาก

1. ลักษณะโครมาโทแกรมที่มีการรบกวนจาก Endogenous Substance น้อยสุด

2. ลักษณะของพีคของยา รวมทั้งขนาดหรือความสูงของพีคยา

วิธีการ ก การสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทจำนวน 4 มล. 1 ครั้ง ลักษณะโครมาโทแกรมปราศจากการรบกวนของ Endogenous Substance Baseline เรียบ ปรากฏพีคของยาอย่างชัดเจน พีคยามี

ลักษณะแคบ สมมาตร ความสูงของพีคพอสมควร ดังแสดงในรูปที่ 12

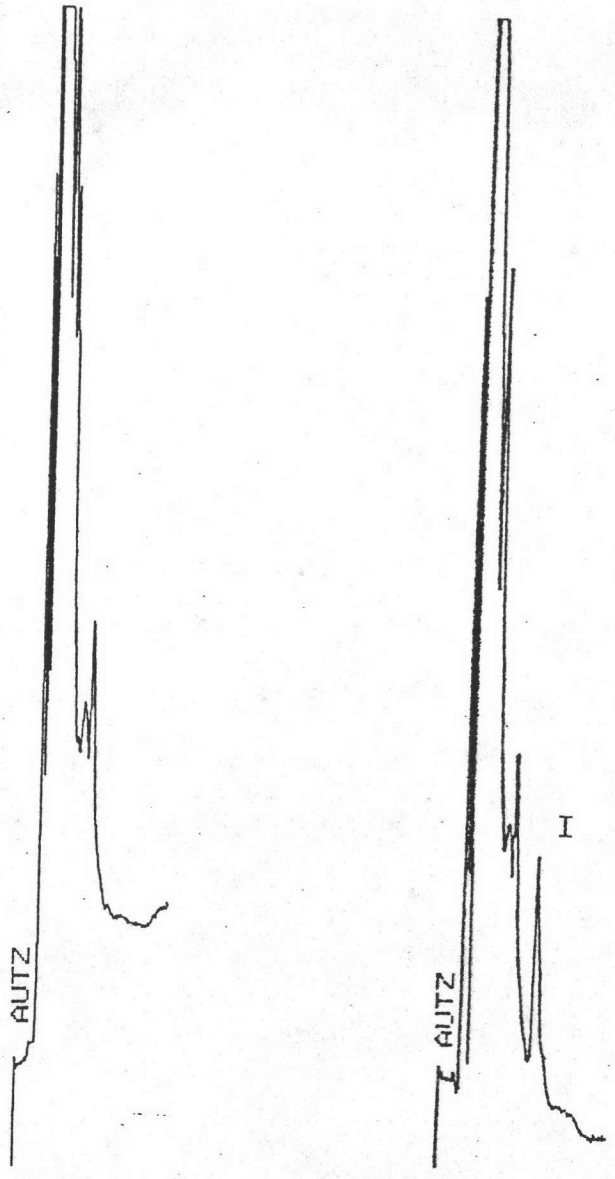
วิธีการ ข การปรับสภาพพลาสมาให้เป็นด่าง ก่อนที่จะสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท

ลักษณะโครมาโทแกรมปราศจากการรบกวนของ Endogenous Substance Baseline เรียบ ปรากฏพีคของยาอย่างชัดเจน พีคยาสูงพอสมควร และมีลักษณะแคบ แต่ค่อนข้างที่จะมี Peak Tailing ดังแสดงในรูปที่ 13

วิธีการ ค การสกัด Endogenous substance บางส่วนด้วยเฮกเซน จึงสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท

ลักษณะโครมาโทแกรมปราศจากการรบกวนของ Endogenous Substance Baseline เรียบ ปรากฏพีคของยา แต่พีคยามีขนาดเล็ก ดังแสดงในรูปที่ 14

ก่อนที่จะเติมเฮกเซนลงไปในตัวอย่างพลาสมานั้น ได้ปรับสภาวะตัวอย่างให้อยู่ในสภาพที่เป็นกรด เพื่อที่จะให้ตัวยาอยู่ในรูปแตกตัว(Ionized) เป็นส่วนมากและละลายเข้าไปในชั้นเฮกเซน ซึ่งไม่มีขั้วได้น้อยที่สุด หลังจากที่ทิ้งชั้นเฮกเซนไปแล้ว ปรับสภาวะตัวอย่างให้เป็นด่างก่อน จึงจะสกัดตัวยาด้วยเอทิลอะซีเตท เนื่องจากผลการศึกษาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวในข้อ 2.2.1 ชี้ว่าตัวยามีแนวโน้มที่จะสามารถถูกสกัดเข้าไปในชั้นของสารสกัดได้ดี ในสภาวะที่เป็นด่าง จากผลการทดลองที่ได้ จะเห็นว่า การใช้เฮกเซนในการสกัดตัวอย่างพลาสมาก่อนนั้น อาจจะทำให้สูญเสียตัวยาที่อยู่ในพลาสมาเข้าไปในชั้นเฮกเซน ผลนี้เห็นได้ชัดเจน ไม่ว่าจะเป็นการตกตะกอนพลาสมาโปรตีน หรือการสกัดแยกตัวยาออกจากตัวอย่างพลาสมาก็ตาม ดังผลการทดลองในข้อ 2.1.1 ซึ่งใช้แอซีโตไนไตรล์ตกตะกอนพลาสมาโปรตีน เปรียบเทียบกับ 2.1.2 ซึ่งใช้เฮกเซนสกัดสารที่ไม่มีขั้วออกก่อนที่จะตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยแอซีโตไนไตรล์ พีคยา

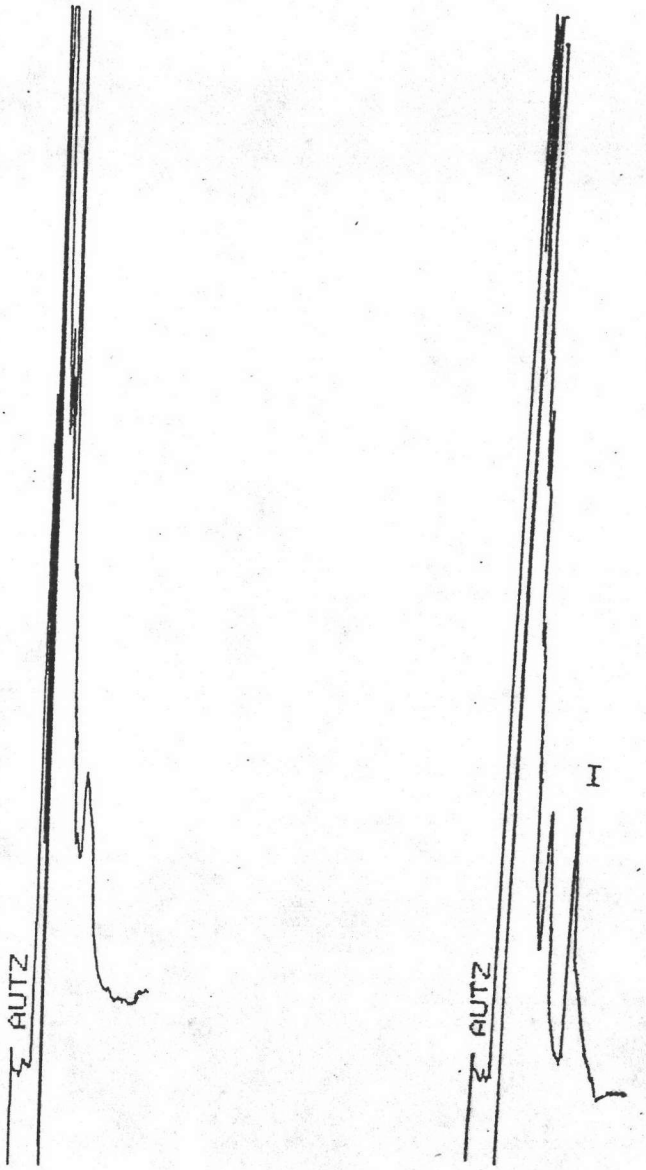


รูป ก รูป ข

<u>รูปที่ 12</u> โครมาโทแกรมของตัวอย่างพลาสมา ที่ได้ภายหลังจากการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท (ตามข้อ 2.3 ก)

รูป ก เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา

รูป ข เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่เติมไนเฟดิพีน (พีค I)
ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา = 160.0 นาโนกรัม/มล.

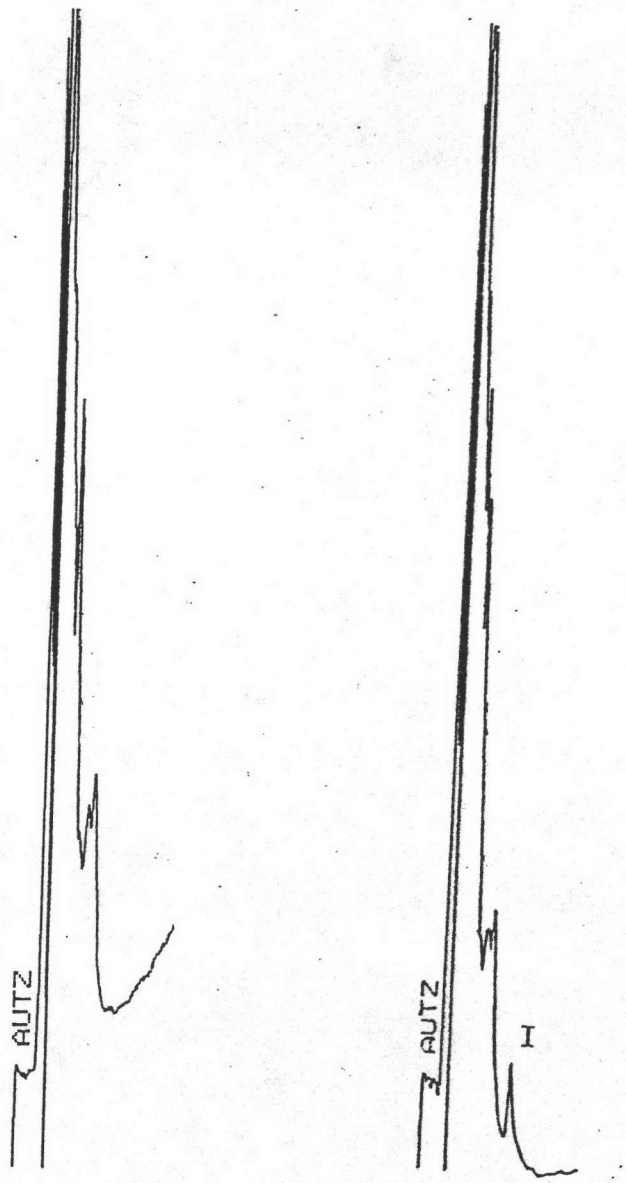


รูป ก รูป ข

รูปที่ 13 โครมาโทแกรมของตัวอย่างพลาสมาที่ได้จากการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ภายหลังจากที่ปรับสภาพตัวอย่างด้วยโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์ (ข้อ 2.3 ข)

รูป ก เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา

รูป ข เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่เติมไนเฟดิพีน (พีค I)
ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา = 160.0 นาโนกรัม/มล.



รูป ก รูป ข

<u>รูปที่ 14</u> โครมาโทแกรมของตัวอย่างพลาสมาที่ได้จากการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ภายหลังจากที่ได้สกัดสาร Endogenous ออกด้วยเฮกเซนแล้ว (ข้อ 2.3 ค)

รูป ก เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา

รูป ข เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่เติมไนเฟดิพีน (พีค I)
ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา = 160.0 นาโนกรัม/มล.

ที่ได้จากข้อ 2.1.2 (รูปที่ 5 ง)จะมีขนาดเล็กกว่าพีคยาที่ได้จากข้อ 2.1.1 (รูปที่ 4 ง)

วิธีการ ง การแปลงสภาพพลาสมาโปรตีน ด้วยสารละลายยูเรีย ก่อนที่จะสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท

ลักษณะโครมาโทแกรมปราศจากการรบกวนของ Endogenous Substance Baseline เรียบ ปรากฏพีคของยาอย่างชัดเจน พีคยามีลักษณะแคบ สมมาตร ความสูงของพีคยาพอสมควร ดังแสดงในรูปที่ 15

วิธีการ จ การปรับสภาพตัวอย่างพลาสมา ให้เป็นด่าง ก่อนที่จะแปลงสภาพพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายยูเรีย แล้วจึงสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท

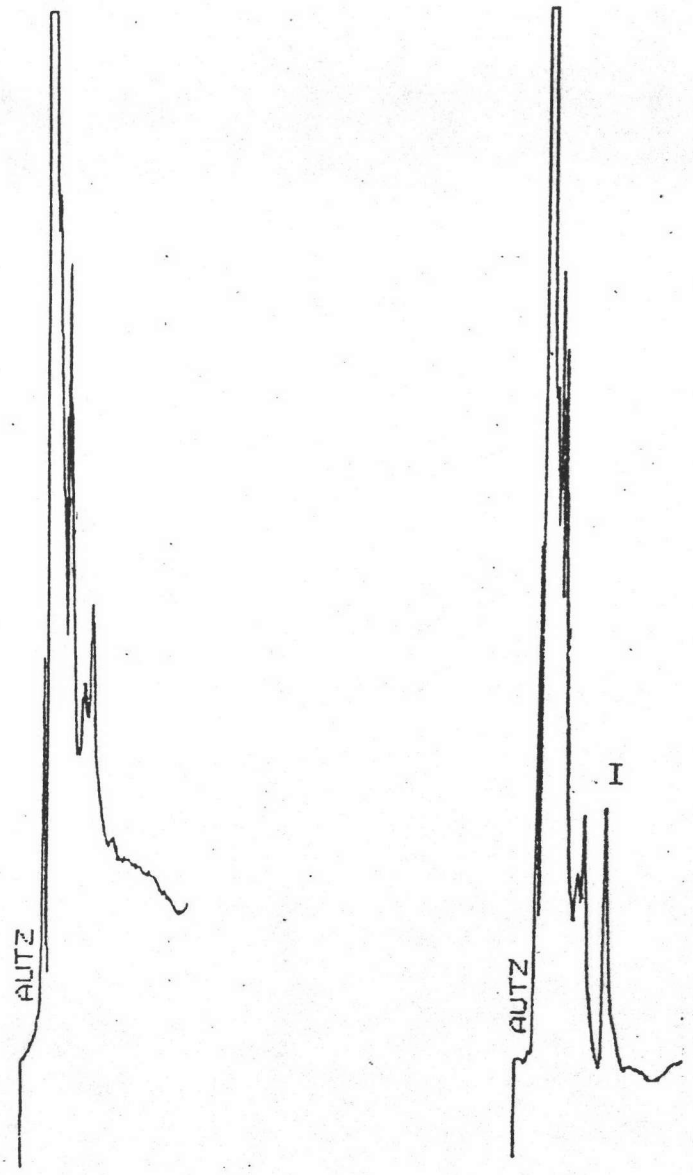
ลักษณะโครมาโทแกรมปราศจากการรบกวนของ Endogenous Substance พีคของ Endogenous Substance ซึ่งจะถูกชะออกมาก่อนหน้าตัวยามีขนาดเล็กกว่าพีค Endogenous Substance ในโครมาโทแกรมที่ได้จากวิธีการอื่นๆข้างต้น ปรากฏพีคของยาอย่างชัดเจน พีคยามีความสูงมากและมีลักษณะแคบ สมมาตร ดังแสดงในรูปที่ 16

จากผลการศึกษาในข้อ ง และ จ นี้ เป็นการยืนยันว่า ยูเรียสามารถช่วยทำให้วิเคราะห์ตัวยาได้มากขึ้นจริง ๆ ซึ่งมีรายงานมาแล้วว่ายูเรียนั้น สามารถทำให้คุณลักษณะของพลาสมาโปรตีนเสียไป ซึ่งจะทำให้ Biological Function ของพลาสมาโปรตีนเสียไป หรือผิดไปจากธรรมชาติ โดยที่จะไม่มีผลต่อ Primary Structure ของพลาสมาโปรตีน ซึ่งเรียกว่าการแปลงสภาพ (Denaturation)(Harper, Rodwell, and Mayers, 1977; Montgomery, Dryer, Conway, and Spector, 1977; Rodwell , 1988) การแปลงสภาพพลาสมาโปรตีนด้วยยูเรีย จะไม่ทำให้พลาสมาโปรตีนตกตะกอนลงมา (Bach, 1983) แต่จะมีผลทำให้มีตัวยาถูกปลดปล่อยออกมาในตัวอย่างพลาสมาได้มากขึ้น การทดลองของ Kauzmann

และผู้ร่วมงาน (Tanford, 1961) เกี่ยวกับการแปลงสภาพ Ovalbumin โดยยูเรียนั้น พบว่ายูเรีย 8.01 โมลาร์ จะมีผลทำให้ Specific Optical Rotation ($[\alpha]_D$) ของ Ovalbumin ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วมากในช่วงแรกนั้น สามารถคงที่ได้ โดยใช้เวลาที่ทำให้ $[\alpha]_D$ คงที่ พอ ๆ กับยูเรีย 8.61 และ 9.31 โมลาร์ ส่วนยูเรีย 6.85, 6.44 หรือ 6.00 โมลาร์นั้น มีผลทำให้ $[\alpha]_D$ เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเรื่อย ๆ ไม่คงที่ จึงได้ใช้สารละลายยูเรีย ความเข้มข้น 8.0 โมลาร์ 2 ส่วนต่อพลาสมา 1 ส่วน เพื่อแปลงสภาพพลาสมาโปรตีน

ลักษณะโครมาโทแกรมที่ได้จาก วิธีการ ง และ จ จะคล้ายกัน เพียงแต่ว่า พีคยาที่ได้จากวิธีการ จ จะมีขนาดสูงกว่าพีคยาที่ได้จาก วิธีการ ง ซึ่งแสดงว่า การปรับสภาพพลาสมา ให้เป็นด่างร่วมกับการแปลงสภาพพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายยูเรีย จะมีผลเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดตัวยาเข้ามาในชั้นเอทิลอะซีเตทได้ดีกว่าการใช้สารละลายยูเรียเพียงอย่างเดียว

กล่าวโดยสรุปได้ว่า ลักษณะโครมาโทแกรมที่ได้จากการสกัดตัวอย่างพลาสมาที่มีไนเฟดิพีนโดยวิธีการทั้ง 5 วิธีนั้น จะเห็นว่าการสกัดด้วยวิธีการทั้ง 5 วิธีนั้น ต่างก็ให้โครมาโทแกรมที่ปราศจากการรบกวนของ Endogenous Substance โดยที่ Endogenous Substance จะถูกชะออกมาจากคอลัมน์หมดภายใน 6 นาที แบลงค์พลาสมา ที่สกัดตามวิธีการ ก จะให้ขนาดของ Endogenous Substance Peak ทีใหญ่กว่าวิธีการอื่น ๆ ส่วนวิธีการ จ จะให้ขนาดของ Endogenous Substance Peak ที่เล็กที่สุด พีคยาที่ได้จากวิธีการ ก ข ง และ จ ปรากฏได้อย่างชัดเจน แต่วิธีการ ค จะทำให้สามารถวิเคราะห์ได้พีคยาที่เล็กมาก พีคยาที่ได้ชัดจากวิธี ก ง และ จ นั้น พบว่า พีคยามีความสมมาตรและแคบ ยกเว้น พีคยาจากวิธีการ ข จะค่อนข้างมี Tailing เมื่อเปรียบเทียบความสูงของพีคยาที่ได้ จะเห็นว่า วิธีการ จ จะให้พีคยาที่มีความสูงมากที่สุด

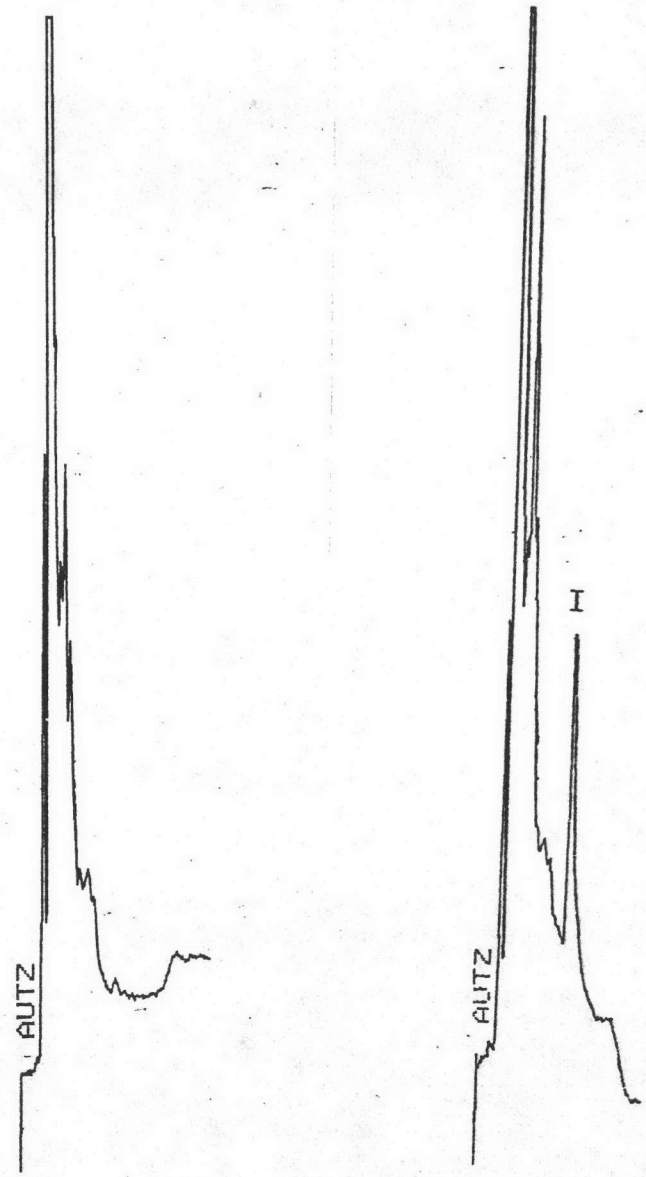


รูป ก รูป ข

รูปที่ 15 โครมาโทแกรมของตัวอย่างพลาสมาที่ได้จากการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ภายหลังจากที่เติมสารละลายยูเรียแล้ว (ข้อ 2.3 ง)

รูป ก เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา

รูป ข เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่เติมไนเฟดิพีน (พีค I)
ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา = 160.0 นาโนกรัม/มล.



รูป ก รูป ข

<u>รูปที่ 16</u> โครมาโทแกรมของตัวอย่างพลาสมาที่ได้จากการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ภายหลังจากที่ปรับสภาพตัวอย่างด้วยโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 1.0โมลาร์ และเติมสารละลายยูเรีย 8.0 โมลาร์ (ข้อ 2.3 จ)

รูป ก เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา

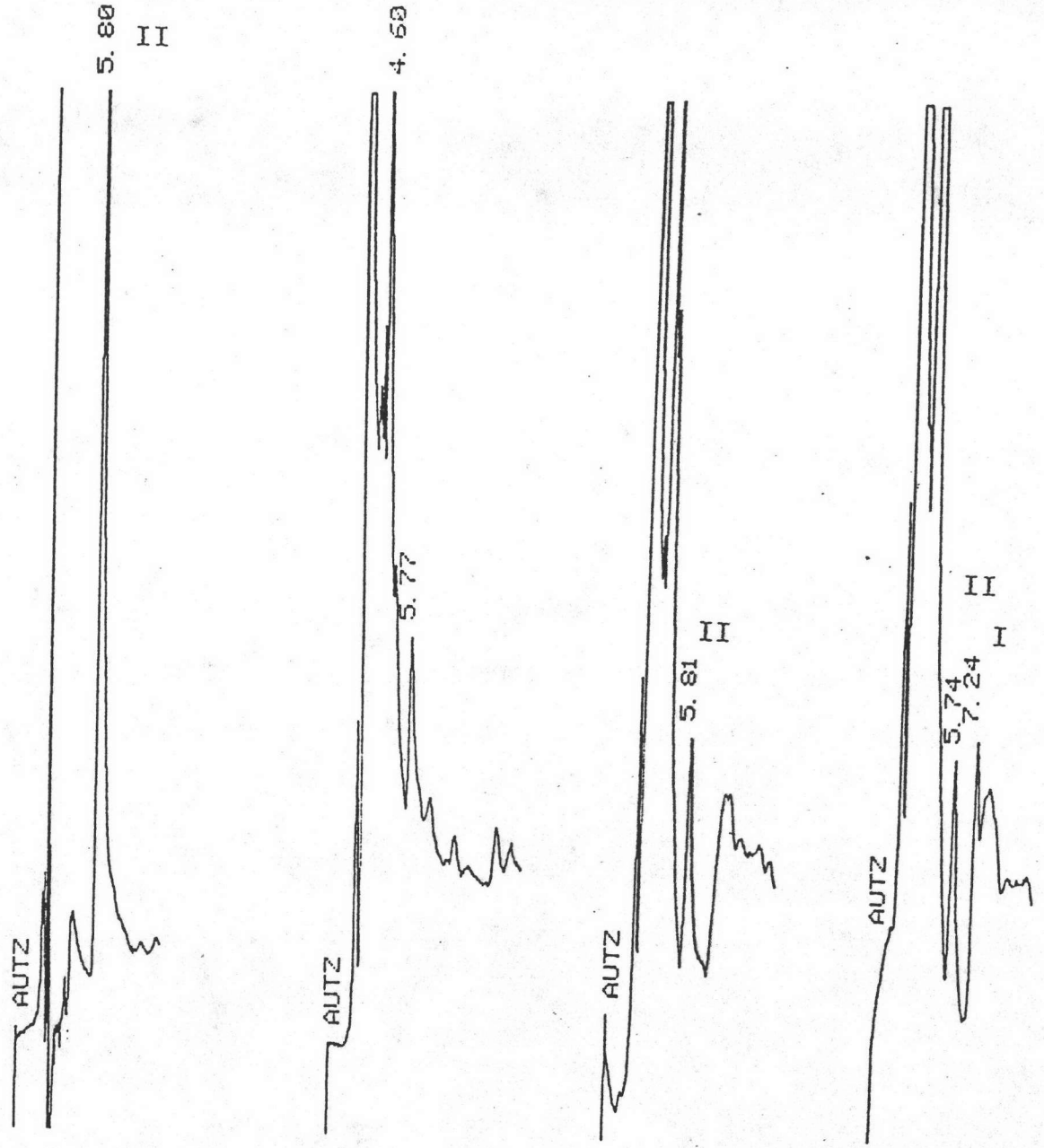
รูป ข เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่เติมไนเฟดิพีน (พีค I) ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา = 160.0 นาโนกรัม/มล.

ดังนั้น กระบวนการที่วิเคราะห์ไนเฟดิพีนในพลาสมาที่สมบูรณ์ จึงประกอบด้วย :-

- การปรับสภาพตัวอย่างพลาสมา ให้เป็นด่างด้วยสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์
- การแปลงสภาพพลาสมาโปรตีน ด้วยสารละลายยูเรีย 8.0 โมลาร์
- สกัดตัวยาออกจากตัวอย่างพลาสมาด้วยเอทิลอะซีเตท

ส่วนที่ 3 การคัดเลือก Internal Standard ที่เหมาะสมและสรุปวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดีพีนในพลาสมาที่พัฒนาขึ้น

IS_1, IS_2, IS_3 และ IS_4 ต่างก็มีการรีเทนใน HPLC คอลัมน์ใกล้เคียงกับไนเฟดีพีน สามารถแยกจากพีคไนเฟดีพีนได้อย่างชัดเจน โดยที่ IS_1 มีค่า Retention Time = 5.80 นาที ส่วน IS_2 และ IS_3 มีค่า Retention Time = 13.40 และ 13.20 นาทีตามลำดับ และ IS_4 มีค่า Retention Time = 8.45 นาที ดังนั้น IS_1, IS_2, IS_3, และ IS_4 ต่างก็มีแนวโน้มที่จะใช้เป็น IS และ เมื่อทดลองวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาได้โดยมีไนเฟดีพีนอยู่ในพลาสมาด้วยพบว่า IS_1 จะเกิดพีคที่ทับกับพีคของ Endogenous Substance (รูปที่ 17) โดยที่ Endogenous Substance มีพีคที่ ประมาณ 5.77 นาที ดังนั้น IS_1 จึงไม่เหมาะที่จะใช้เป็น IS สำหรับ IS_2 และ IS_3 นั้น จะมีพีคที่ห่างจากตัวยานานถึง 6 นาที (รูปที่ 18, 19) พีคของ IS_2 ที่ได้โดยผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ยังมีลักษณะ Tailing (รูปที่ 18) ในขณะที่ IS_4 ให้โครมาโทแกรมที่ดี คือ ทั้งพีคยาและพีค IS_4 จะมีความแคบ, สมมาตร, ไม่เกิด Peak Tailing สามารถแยกจากพีคอื่น ๆ ทั้งหมดในโครมาโทแกรมได้ นอกจากนั้นยังมีค่า Retention Time ห่างจากไนเฟดีพีน 1.3 นาที ซึ่งจะสามารถประหยัดเวลาการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างได้ (รูปที่ 20) ดังนั้น จึงเลือกบิวแทมเบน เป็น IS สำหรับการวิเคราะห์ไนเฟดีพีนในพลาสมาที่พัฒนาขึ้น



รูป ก รูป ข รูป ค รูป ง

รูปที่ 17 โครมาโทแกรมของไนเฟดิพีน (พีค I) และ IS_1 (พีค II) เมื่อวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น

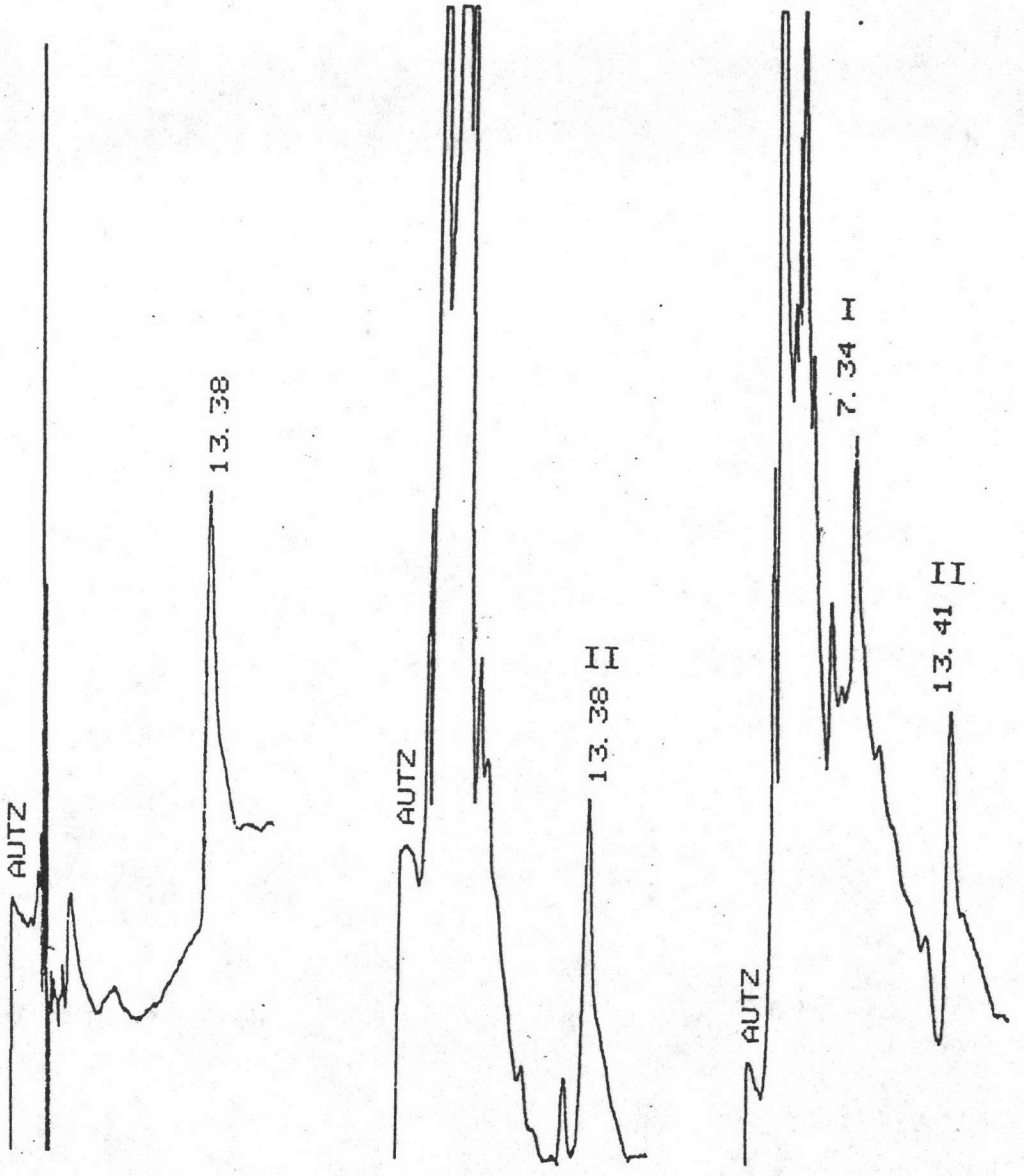
รูป ก เป็นโครมาโทแกรมของ IS_1 ในเมทานอล (ความเข้มข้น 10.0 มคก./มล.)

รูป ข เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา

รูป ค, ง เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่มี IS_1 และ พลาสมาที่มีทั้งไนเฟดิพีน และ IS_1 ตามลำดับ โดยที่

ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา = 160.0 นาโนกรัม/มล.

ความเข้มข้นของ IS_1 ในพลาสมา = 400.0 นาโนกรัม/มล.



รูป ก รูป ข รูป ค

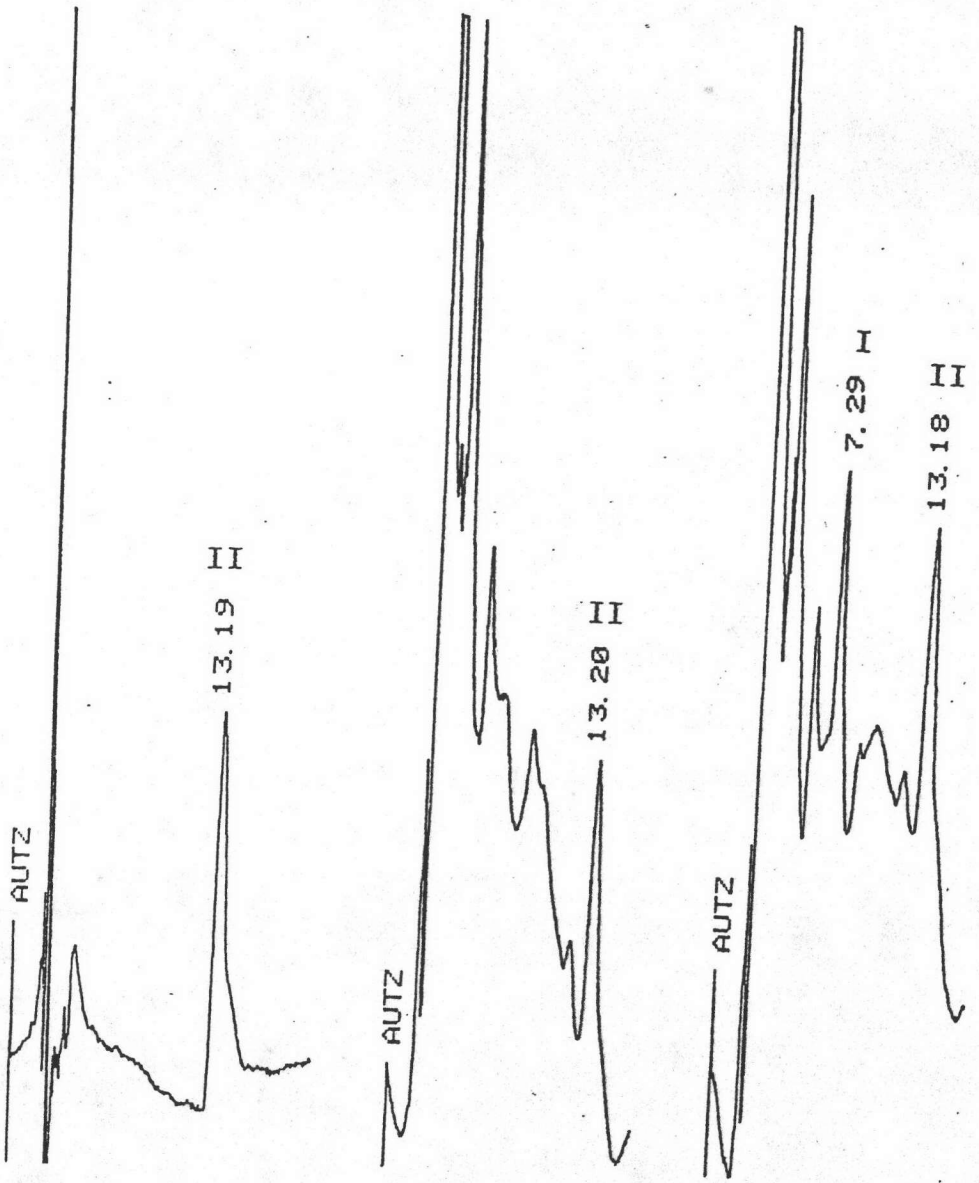
<u>รูปที่ 18</u> โครมาโทแกรมของไนเฟดิพีน (พีค I) และ IS_2 (พีค II) เมื่อวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น

รูป ก เป็นโครมาโทแกรมของ IS_2 ในเมทานอล (ความเข้มข้น 3.0 มคก./มล.)

รูป ข, ค เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่มี IS_2 และ พลาสมาที่มีทั้งไนเฟดิพีน และ IS_2 ตามลำดับ โดยที่

ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา = 160.0 นาโนกรัม/มล.

ความเข้มข้นของ IS_2 ในพลาสมา = 120.0 นาโนกรัม/มล.



รูป ก รูป ข รูป ค

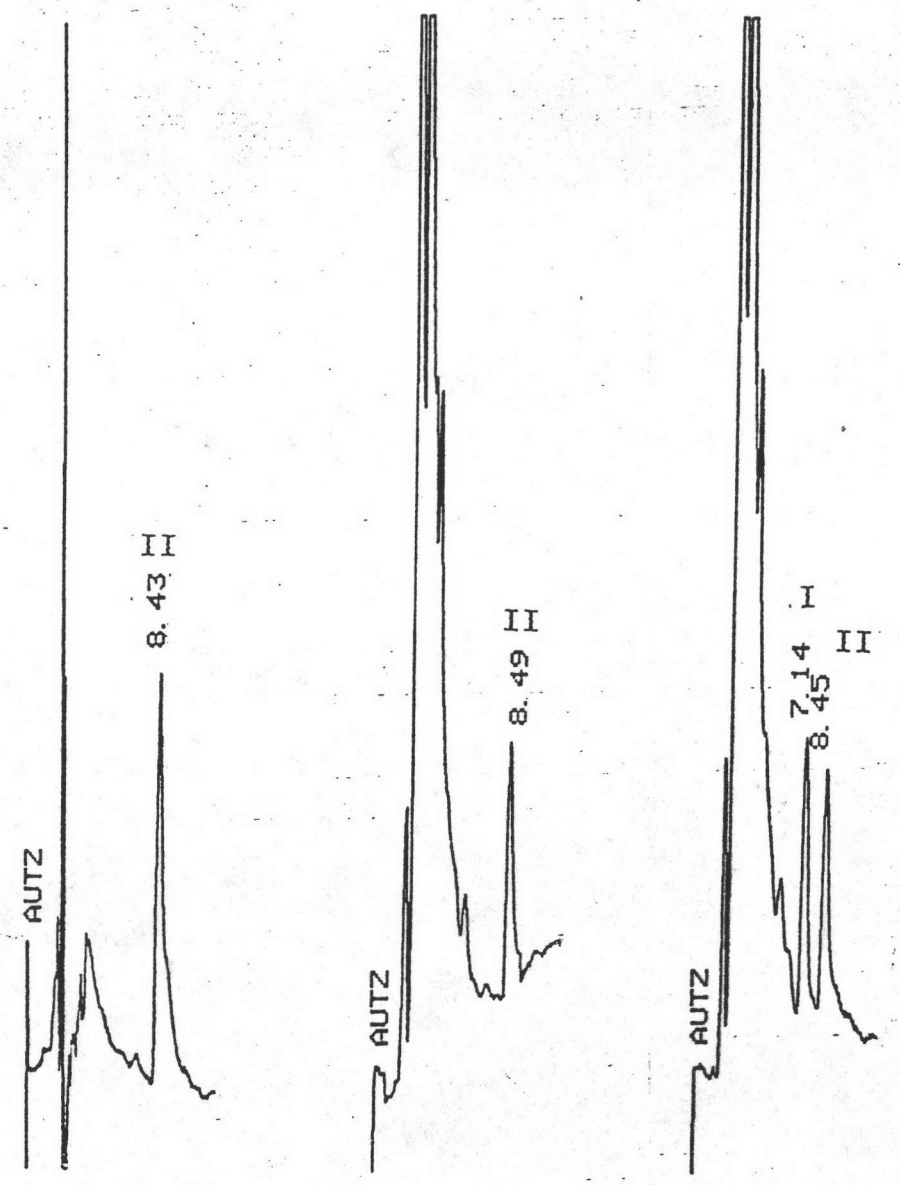
รูปที่ 19 โครมาโทแกรมของไนเฟดิพีน (พีค I) และ IS_3 (พีค II) เมื่อวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น

รูป ก เป็นโครมาโทแกรมของ IS_3 ในเมทานอล (ความเข้มข้น 6.0 มคก./มล.)

รูป ข, ค เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่มี IS_3 และ พลาสมาที่มีทั้งไนเฟดิพีนและ IS_3 ตามลำดับ โดยที่

ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา = 160.0 นาโนกรัม/มล.

ความเข้มข้นของ IS_3 ในพลาสมา = 240.0 นาโนกรัม/มล.



รูป ก รูป ข รูป ค

รูปที่ 20 โครมาโทแกรมของไนเฟดิพีน (พีค I) และ IS_4 (พีค II) เมื่อวิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น

รูป ก เป็นโครมาโทแกรมของ IS_4 ในเมทานอล (ความเข้มข้น 12.0 มคก./มล.)

รูป ข, ค เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่มี IS_4 และ พลาสมาที่มีทั้งไนเฟดิพีน และ IS_4 ตามลำดับ โดยที่

ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา = 120.0 นาโนกรัม/มล.

ความเข้มข้นของ IS_4 ในพลาสมา = 480.0 นาโนกรัม/มล.

<u>กระบวนการวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดีพีนในพลาสมาที่พัฒนาขึ้นโดยใช้เทคนิคทาง HPLC</u>

ผสมพลาสมา 0.5 มล. เข้ากับ สารละลายไนเฟดิพีนในเมทานอล จำนวน 20 มคล. ในหลอดทดลองฝาเกลียว

↓

เติมสารละลายโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1.0 โมลาร์ จำนวน 0.6 มล., วอร์เทกซ์นาน 15 วินาที

↓

เติมสารละลายยูเรีย 8.0 โมลาร์ จำนวน 1.0 มล. และสารละลายบิวแทมเบนในเมทานอล 12.0 มคก./มล.จำนวน 20 มคล., วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เติม EA จำนวน 4.0 มล., วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 1,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่ อุณหภูมิห้อง

↓

ปิเปตชั้นสารละลายใส (ซึ่งอยู่ชั้นบน) มาจำนวน 3.5 มล. ลงในหลอดทดลองใหม่

↓

ระเหยตัวทำละลายออกให้หมด โดยใช้กระแสของแก๊สไนโตรเจน

↓

ละลายสารที่เหลือจากการระเหยด้วยเมทานอลจำนวน 200 มคล. และนำไปฉีดเข้า HPLC จำนวน 20 มคล.

<u>สภาวะทางโครมาโทกราฟี</u> :-

โครมาโทกราฟิกคอลัมน์:- เหมือนสภาวะการทดลองเริ่มแรกข้อ 1.2

การ์ดคอลัมน์ :- เหมือนสภาวะการทดลองเริ่มแรกข้อ 1.2

Mobile Phase :- อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.1 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์:เมทานอล ในอัตราส่วน 38:62

อัตราการไหลของ Mobile Phase:- 1.0 มล./นาที

Detector :- UV 247 นาโนเมตร

ปริมาตรของสารที่ฉีดต่อตัวอย่าง :- 20 มคล.

Integrator:-

Attenuation :- 2

ความเร็วของกระดาษบันทึก

(Chart Speed) :- 2.0 มม./นาที

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง สำหรับวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น โดยการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทเพียง 1 ครั้งนั้น สะดวกกว่าวิธีอื่น ๆ ที่ใช้การสกัดถึง 2 ครั้ง (Huebert et al., 1986 ; Snedden , Fernandez, Galway et al.,1984 ; Snedden, Fernandez, and Nath , 1986) หรือใช้วิธีการแยกพลาสมาโปรตีนออกก่อน แล้วจึงสกัดยา (Miyazaki et al., 1984) หรือ โดยการผ่าน C_{18} Extraction column ก่อน แล้วจึงสกัดยา (Bach, 1983) ดังนั้น วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาได้ จึงเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ซึ่งเหมาะกับการที่เป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมา

ส่วนที่ 4 การประเมินประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้

4.1 การศึกษา Linearity

4.1.1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบ PHR กับ PAR นั้น พบว่า ค่า % CV ของ PHR ในแต่ละความเข้มข้นของยา มีค่าน้อยกว่า ค่า % CV ของ PAR ดังแสดงในตารางที่ 7 ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่วิธีวิเคราะห์นี้เป็นการตรวจวัดปริมาณยาในร่างกายที่อยู่ในระดับต่ำมาก ค่าพื้นที่พีคของสารที่ถูก Integrate ออกมาจึงมีความแปรปรวนสูง ดังนั้น ในการศึกษาพัฒนาครั้งนี้ จึงเลือกใช้ค่า PHR ตลอดทุกขั้นตอน

4.1.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความสูงพีค (PHR) ของยาและบิวแทมเบน (IS) กับ ค่าความเข้มข้นต่างๆ ของตัวยาในพลาสมา นั้นอยู่ในรูปของ $PHR = a (Conc)^b$ เมื่อ Conc คือ ความเข้มข้นของยาในพลาสมา โดยเมื่อพลอตระหว่าง ค่า log ของ PHR กับ ค่า log ของ ความเข้มข้นของยาในพลาสมา จะได้กราฟเส้นตรง ดังแสดงในรูปที่ 21 สมการของเส้นตรงที่ได้คือ $\log Y = 0.8620 \log X - 1.5957$ เมื่อ Y เป็น PHR ของไนเฟดิพีนต่อบิวแทมเบน และ X เป็น ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา และ Correlation Coefficient (r) = 0.99495

4.2 การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ ที่จะสามารถตรวจพบไนเฟดิพีนในพลาสมา

จากการทดลอง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของไนเฟดิพีนในพลาสมาที่จะให้ค่า S/N Ratio มากกว่า 2:1 คือ 7.0 นาโนกรัม/มล.(S/N เฉลี่ย = 3.2) ดังแสดงในตารางที่ 8

4.3 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์แสดงในรูปที่ 22 พิจารณาจากค่า Retention Time ของไนเฟดิพีน เมื่ออยู่ในพลาสมาและเมื่ออยู่ในเมทานอล มีค่าใกล้เคียงกันมาก (ไนเฟดิพีน = 7.12 และ7.15

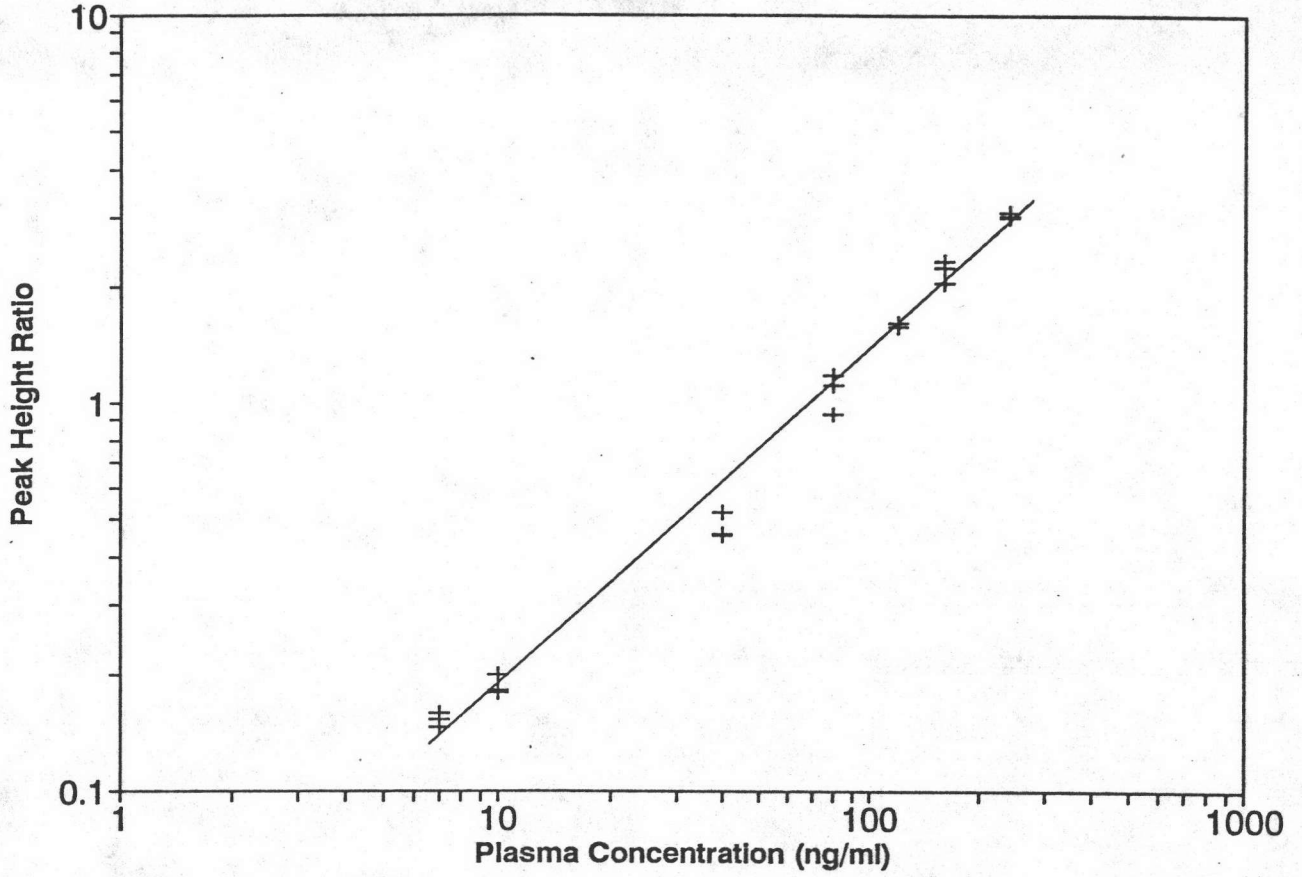
ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมา เมื่อคำนวณโดยการใช้พื้นที่พีค และ ความสูงพีค

ความเข้มข้น[ก] นาโนกรัม/มล.	คำนวณโดยใช้พื้นที่พีค		คำนวณโดยใช้ความสูงพีค	
	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนพื้นที่พีค[ข] (S.D.)	% CV	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนความสูงพีค[ค] (S.D.)	% CV
40.0	0.36 (0.03)	8.35	0.49 (0.02)	3.96
80.0	1.07 (0.18)	16.78	1.01 (0.13)	12.94
120.0	1.46(0.07)	5.19	1.48 (0.08)	5.19
160.0	2.00 (0.56)	15.67	1.93 (0.08)	4.20
240.0	4.04 (0.52)	12.92	3.05 (0.35)	11.49

[ก] ความเข้มข้นไนเฟดิพีนในพลาสมา

[ข] อัตราส่วนพื้นที่พีคของไนเฟดิพีน ต่อ ขิวแทมเบน

[ค] อัตราส่วนความสูงพีคของไนเฟดิพีน ต่อ ขิวแทมเบน



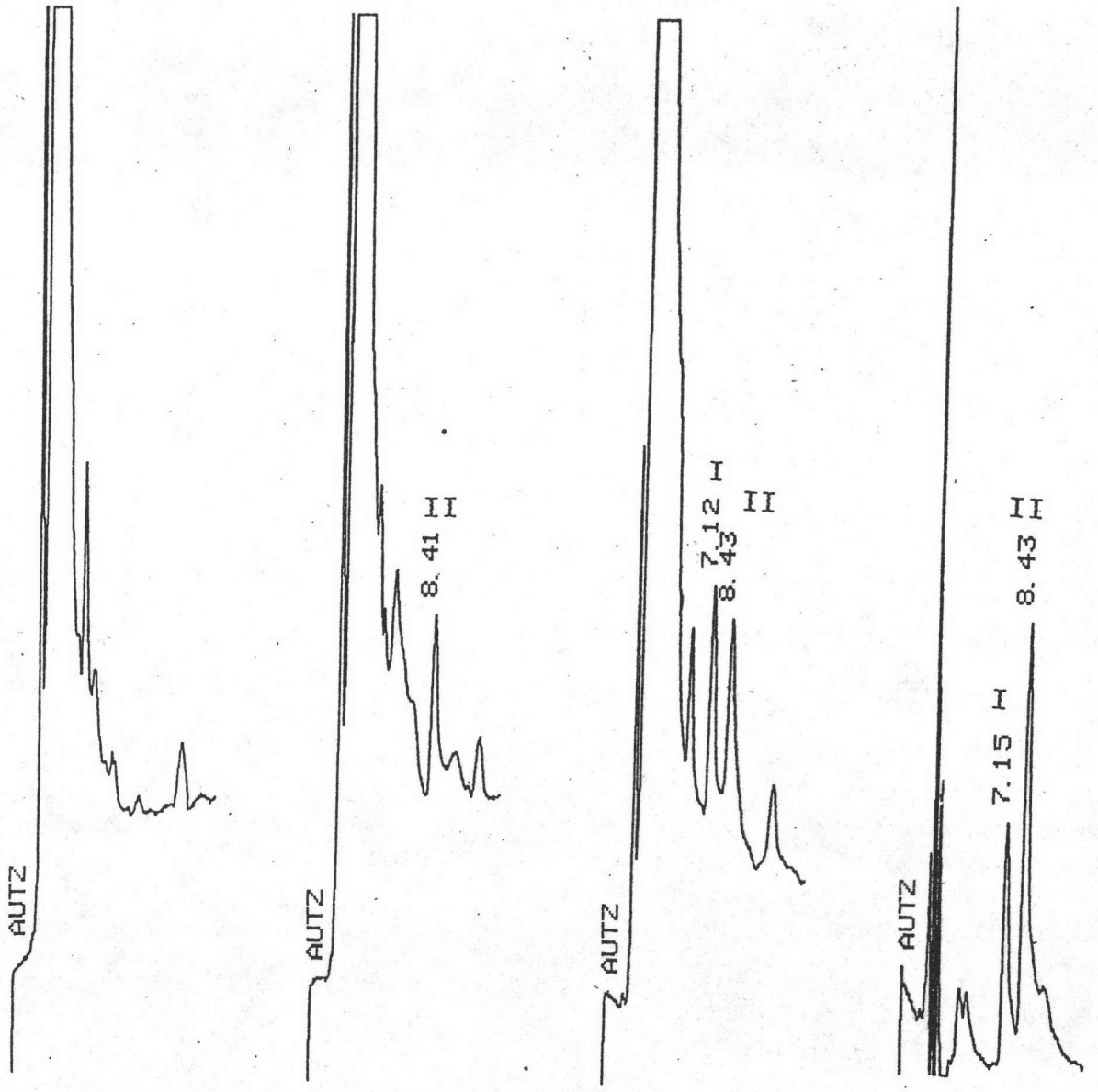
รูปที่ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความสูงพีคของไนเฟดิพีนต่อบิวแทมเบน กับความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา

สมการของเส้นตรง คือ log y = 0.8620 log x - 1.5958

r = 0.9950

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

การทดลองที่	S/N
1	3.40
2	3.22
3	3.06
4	3.10
5	3.46
6	3.18
7	3.12
ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D.	3.21 $\pm$ 0.16
% CV	4.93



รูป ก รูป ข รูป ค รูป ง

รูปที่ 22 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีน ในพลาสมาโดยเทคนิค HPLC

รูป ก, ข เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา และ พลาสมาที่มีบิวแทมเบน ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่มีไนเฟดิพีน และ บิวแทมเบน

รูป ง เป็นโครมาโทแกรมของสารผสมไนเฟดิพีน และบิวแทมเบนในเมทานอล

พีค I ไนเฟดิพีน ความเข้มข้นในพลาสมา = 120.0 นาโนกรัม/มล.

พีค II บิวแทมเบน ความเข้มข้นในพลาสมา = 480.0 นาโนกรัม/มล.

นาที เมื่ออยู่ในพลาสมา และเมทานอล ตามลำดับ) ส่วนบิวแทมเบนจะมีค่า Retention Time เมื่ออยู่ในพลาสมา เท่ากับเมื่ออยู่ในเมทานอล (= 8.43 นาที) แม้จะมีพีคของ Endogenous Substance ที่ใกล้เคียงกับ พีคของไนเฟดิพีน แต่พีคของ Endogenous นั้นสามารถแยกจากพีคยาได้เป็นอย่างดี ดังนั้น วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมาที่พัฒนาขึ้นนี้ จึงมีความจำเพาะค่อนข้างสูง และใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างเพียง 10 นาที ซึ่งน้อยกว่าวิธีอื่นๆ ที่ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างนานมากกว่า 20 นาที (Huebert et al., 1986; Miyazaki et al., 1984)

4.4 ประสิทธิภาพของการสกัดสาร ในเทอมของเปอร์เซนต์การกลับคืนของตัวยาในการแยกออกจากพลาสมา

ผลการทดลองหาเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาและ บิวแทมเบนที่แยกจากพลาสมา เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานในเมทานอลที่มีความเข้มข้นเท่ากัน ดังแสดงในตารางที่ 9 ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของไนเฟดิพีน และบิวแทมเบน ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ จะอยู่ระหว่าง 76.35-88.46 เปอร์เซนต์ และ 40.51 - 46.85 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

เปอร์เซนต์การกลับคืนของยาที่ไม่ขึ้นกับความเข้มข้น แสดงว่าขั้นตอนการสกัด และ สารสกัดที่ใช้สามารถสกัดตัวยาได้สมบูรณ์ สำหรับบิวแทมเบนที่นำมาใช้เป็น IS ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนที่มีค่าต่ำไม่ได้ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการสกัดตัวยา ซึ่งยืนยันได้จากค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของตัวยาที่ไม่ขึ้นกับความเข้มข้น และปริมาณของบิวแทมเบนที่เติมก็อยู่ในปริมาณที่ไม่ทำให้เปอร์เซนต์การกลับคืนของยาเปลี่ยนแปลงไป

ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนที่ได้นอกจากจะบอกถึงประสิทธิภาพในการสกัดตัวยาแล้ว ยังแสดงถึงความถูกต้องของกระบวนการวิเคราะห์ด้วย และ จากการศึกษาในช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมความเข้มข้นของยาในพลาสมา ดังนั้น วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้จึงสามารถวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมาได้อย่างถูกต้อง

ตารางที่ 9 เปอร์เซนต์การกลับคืนของไนเฟดิพีน และ ขิวแทมเซนในการแยกออกจากพลาสมา ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (n=3)

ความเข้มข้น[n] นาโนกรัม/มล.	ไนเฟดิพีน		ขิวแทมเซน	
	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืน (S.D.)	% CV	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืน (S.D.)	% CV
7.0	84.66 (9.16)	10.82	46.85 (3.24)	6.93
10.0	78.26 (11.5)	14.70	44.12 (3.21)	7.28
40.0	88.46 (6.66)	7.52	43.80 (3.29)	7.53
80.0	76.35 (5.22)	6.84	42.97 (3.88)	9.03
120.0	82.55 (6.32)	7.66	43.41 (3.68)	8.47
160.0	82.79 (2.58)	3.12	41.37 (1.86)	4.49
240.0	79.52 (3.22)	4.05	40.51 (3.24)	8.01
ค่าเฉลี่ยรวม	81.80 (7.05)	8.62	43.29 (2.05)	4.73

[n] ความเข้มข้นไนเฟดิพีนในพลาสมา

นอกจากนี้ การศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ยังสามารถทำได้โดยการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของยาในพลาสมาที่เตรียมโดยผู้อื่นหรือ โดยต่างห้องปฏิบัติการ แล้วนำค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ มาคำนวณเทียบกับค่าความเข้มข้นที่แท้จริง

4.5 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ในการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายใน 1 วัน (Within-Run Precision) และความเที่ยงตรงต่างวัน (Between-Run Precision) แสดงในตารางที่ 10 และ ตารางที่ 11 ตามลำดับ จะเห็นว่าผลการวิเคราะห์ภายใน 1 วัน และ ต่างวัน ของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 7.0 -240.0 นาโนกรัม/มล.ของพลาสมา มีค่า % CV ของอัตราส่วนของความสูงพีคอยู่ในช่วง 1.57 - 11.81 % และ 1.10 - 11.85 % ตามลำดับ สำหรับที่ความเข้มข้น 7.0 นาโนกรัม/มล.นั้น ให้ค่า % CV ทั้ง Within-run และ Between-run = 4.11 และ 5.22 % ตามลำดับ ดังนั้น จึงยอมรับได้ว่า ที่ 7.0 นาโนกรัม/มล. เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณ (Lowest Limit of Quantitation)ได้ด้วย (Buick et al., 1990)

ตารางที่ 10 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมา ภายใน 1 วัน (Within-Run Precision , n=3)

ความเข้มข้น[n] (นาโนกรัม/มล.)	อัตราส่วนความสูงพีค[*] (PHR)				% CV
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย (SD)	
7.0	0.16	0.15	0.15	0.15 (0.00)	4.11
10.0	0.18	0.18	0.20	0.18 (0.01)	6.00
40.0	0.52	0.46	0.45	0.47 (0.03)	8.12
80.0	0.93	1.18	1.11	1.07 (0.12)	11.81
120.0	1.62	1.57	1.57	1.58 (0.02)	1.57
160.0	2.32	2.23	2.04	2.19 (0.14)	6.46
240.0	3.10	3.03	3.00	3.04 (0.04)	1.60

[n] ความเข้มข้นของไนเฟดิพีนในพลาสมา

[*] อัตราส่วนความสูงพีคของไนเฟดิพีน ต่อ บิวแทมเบน

ตารางที่ 11 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดีนีนในพลาสมา ระหว่างวัน (Between-Run Precision , n=4)

ความเข้มข้น[n] (นาโนกรัม/มล.)	อัตราส่วนความสูงพีค[*] (PHR)					% CV
	1	2	3	4	ค่าเฉลี่ย (SD)	
7.0	0.15	0.16	0.14	0.15	0.15 (0.00)	5.22
10.0	0.19	0.18	0.18	0.18	0.18 (0.00)	1.10
40.0	0.46	0.48	0.47	0.46	0.46 (0.01)	2.11
80.0	0.91	1.04	0.95	1.18	1.01 (0.12)	11.85
120.0	1.50	1.49	1.53	1.57	1.52 (0.04)	2.46
160.0	1.91	1.96	2.00	2.23	2.02 (0.14)	7.17
240.0	3.29	3.10	3.23	3.03	3.16 (0.12)	3.75

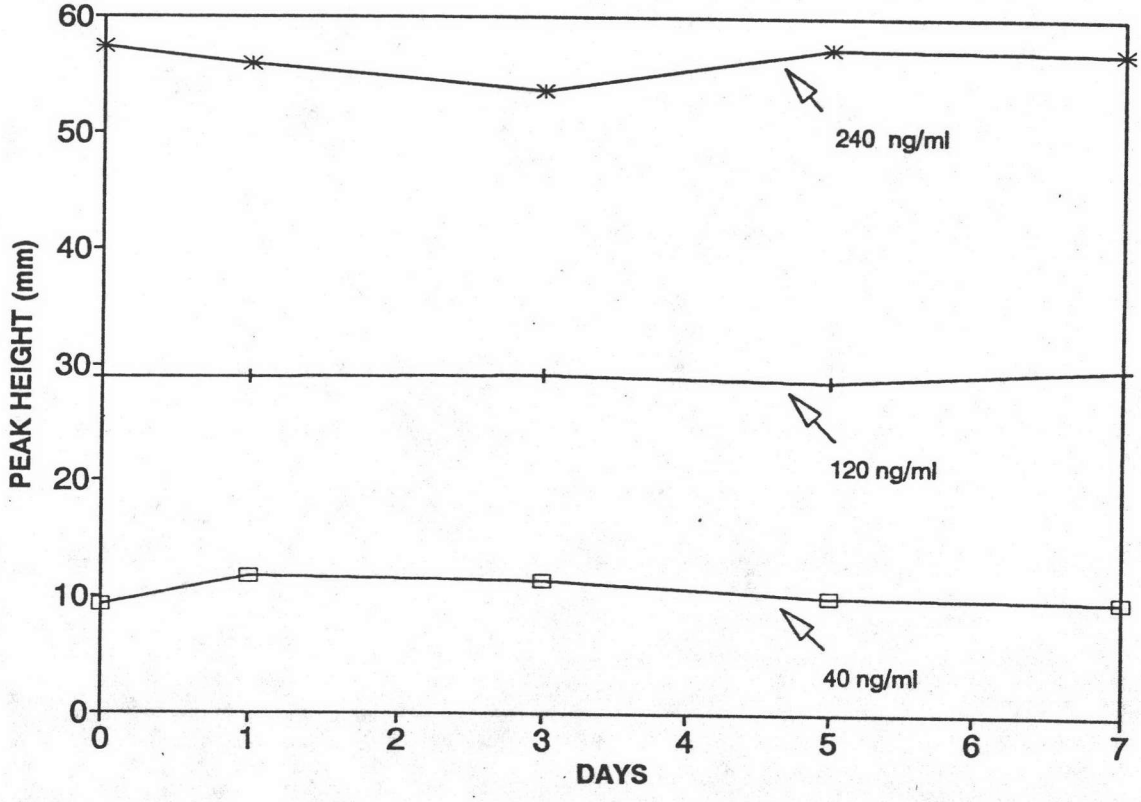
[n] ความเข้มข้นของไนเฟดีนีนในพลาสมา

[*] อัตราส่วนความสูงพีคของไนเฟดีนีน ต่อ บิวแทมเบน

ส่วนที่ 5 การศึกษาช่วงระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างพลาสมา ที่มีไนเฟดิพีน ในช่องแช่แข็ง

ผลการทดลองศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไนเฟดิพีนในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ หลังจากเก็บในช่องแช่แข็ง ที่ความเข้มข้น = 40.0, 120.0 และ 240.0 นาโนกรัม/มล. ของพลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 23 และ ตารางที่ 12

กราฟที่พลอตระหว่างความสูงของพีคยากับเวลาที่เก็บตัวอย่างพลาสมาไว้ เป็นเส้นตรงในแนวนอน ความชัน (Slope) ของเส้นตรงดังกล่าวมีค่าประมาณ 0 โดยความชันมีค่า = -0.08, 0.08, 0.07 สำหรับความเข้มข้นของไนเฟดิพีน = 40.0, 120.0, 240.0 นาโนกรัม/มล.ของพลาสมา ตามลำดับ แสดงว่า ปริมาณตัวยา ไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายใน 7 วัน ดังนั้นตัวอย่างพลาสมาที่มีไนเฟดิพีนอยู่จะสามารถเก็บไว้ได้นานถึง 7 วัน ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ โดยที่จะต้องเก็บในที่ที่ปราศจากแสงและในช่องแช่แข็งของตู้เย็น



รูปที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของพีคของไนเฟดิพีน (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) กับระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างพลาสมาที่มีไนเฟดิพีนไว้

ตารางที่ 12 ความสูงพีคไนเฟดีนีน เมื่อเก็บตัวอย่างพลาสมาที่มีไนเฟดีนีนไว้ที่เวลาต่างๆ

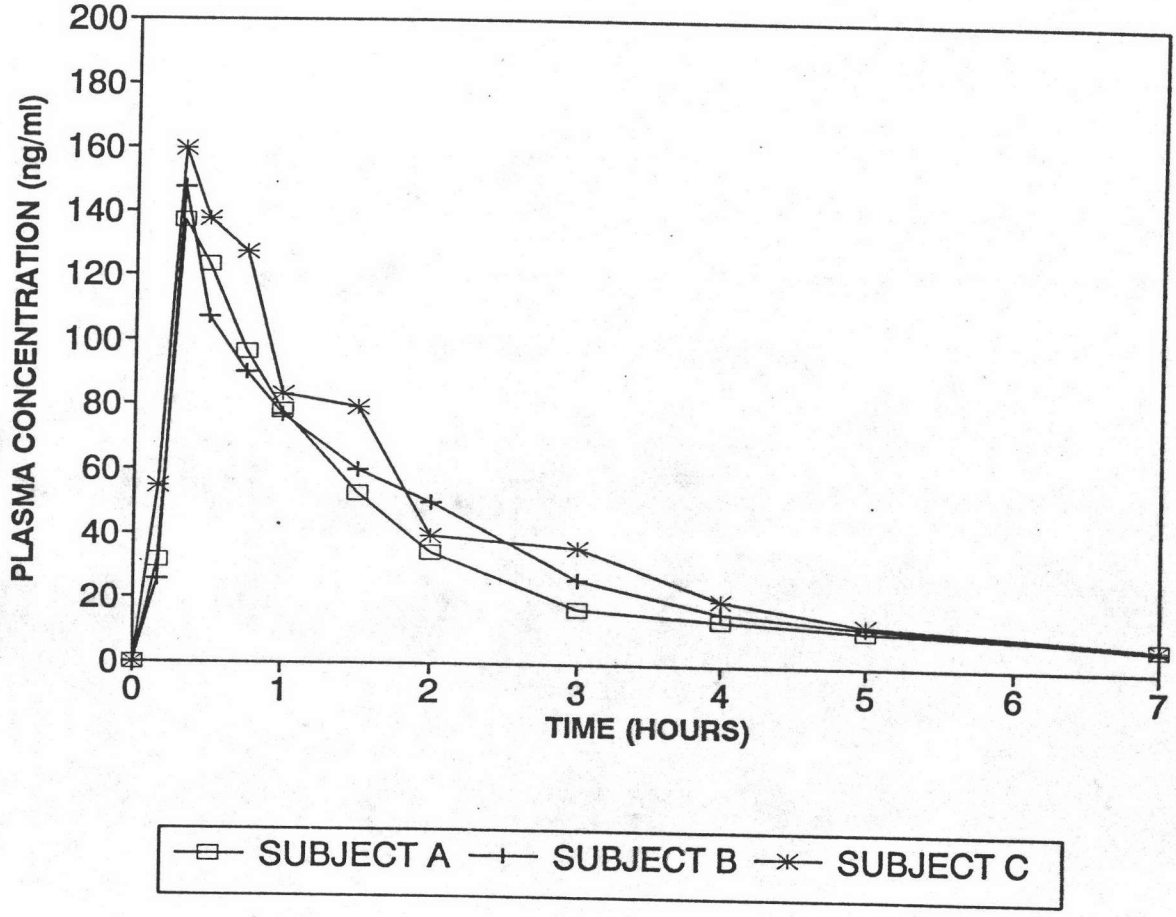
เวลาที่เก็บ (วัน)	ค่าเฉลี่ยความสูงพีคของไนเฟดีนีน(มม., n=3)(S.D.)		
	40.0[n]	120.0	240.0
0	9.33 (1.04)	29.00 (1.00)	57.33 (0.57)
1	11.73 (0.68)	29.00 (1.41)	55.83 (0.76)
3	11.35 (0.21)	29.16 (2.76)	53.63 (1.55)
5	9.97 (1.34)	28.67 (2.08)	57.27 (3.02)
7	9.83 (0.57)	29.83 (1.04)	56.93 (1.00)
Slope	-0.0802	0.0771	0.0735
r^2	0.0489	0.2646	0.0183

[n] ความเข้มข้นของไนเฟดีนีนในพลาสมา (นาโนกรัม/มล.)

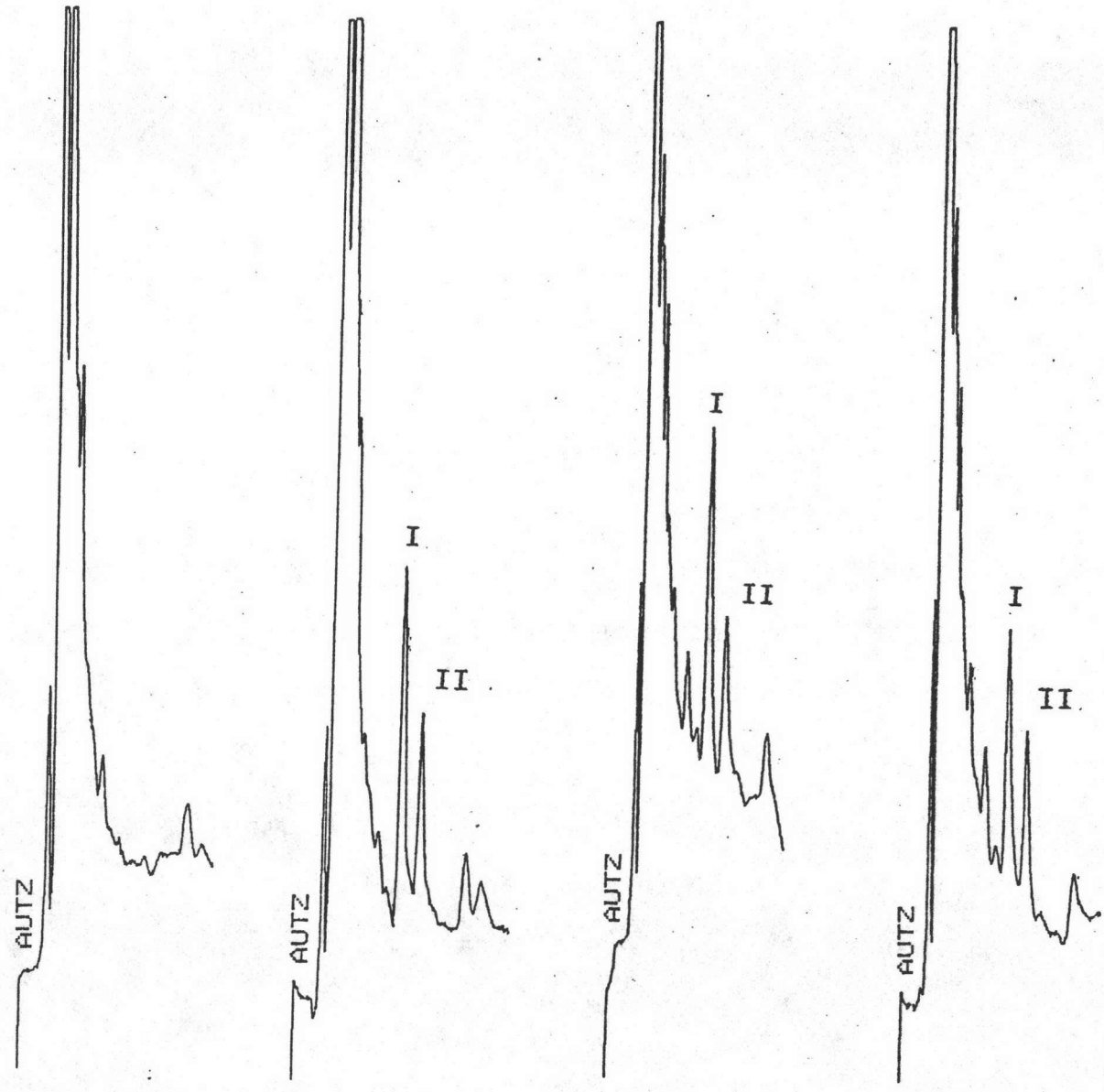
ส่วนที่ 6 การวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในตัวอย่างพลาสมาของผู้ที่ได้รับยา

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นได้นี้ สามารถนำมาหาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมาของผู้ที่ได้รับยาได้จริง โดยผลการทดลอง ดังแสดงในกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยาในพลาสมา กับเวลาหลังรับยาแสดงในรูปที่ 24 จะเห็นว่าไนเฟดิพีนจะถูกดูดซึมอย่างรวดเร็ว และจะให้ระดับยาสูงสุดในพลาสมาภายใน 20 นาที ระดับยาในพลาสมาสูงสุดเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 148.17 นาโนกรัม/มล. ซึ่งค่าที่วิเคราะห์ได้นี้จะสอดคล้องกับรายงานต่าง ๆ ที่มีก่อนหน้านี้ (Dokladalova et al, 1982 ; Raemsch and Sommer, 1983 ; Snedden et al, 1984 ; Suzuki et al, 1985)

ระดับยาในพลาสมาจากอาสาสมัครทั้ง 3 คน อยู่ในช่วงความเข้มข้นของไนเฟดิพีนที่ได้ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ยังมีความจำเพาะเจาะจง ดังแสดงในรูปที่ 25 สามารถวิเคราะห์ไนเฟดิพีนในตัวอย่างพลาสมา โดยปราศจากการรบกวนของ Endogenous Substance หรือ เมตาบอไลท์ของยา โดยสามารถวัดหาระดับปริมาณยาได้ แม้หลังรับประทานยาไปแล้วกว่า 7 ชั่วโมงก็ตาม



รูปที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยาในพลาสมา ของอาสาสมัคร 3 คน กับเวลาภายหลังที่รับไนเฟดิพีน ขนาด 10 มก. โดยการรับประทานเพียงครั้งเดียว



รูป ก รูป ข รูป ค รูป ง

<u>รูปที่ 25</u> โครมาโทแกรมของพลาสมา ที่ได้จากอาสาสมัคร ภายหลังรับประทานยาไนเฟดิพีน 10 มก. เพียงครั้งเดียว

รูป ก, ข เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา และพลาสมาที่เติม (Spike) ไนเฟดิพีน ในความเข้มข้น 160.0 นาโนกรัม/มล. ของพลาสมา ตามลำดับ

รูป ค, ง เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมา จากอาสาสมัคร ภายหลังที่ได้รับไนเฟดิพีนไป 30 นาที และ 45 นาที ตามลำดับ

พีค I = ไนเฟดิพีน

พีค II = บิวแทมเบน ซึ่งมีความเข้มข้นในพลาสมา = 480.0 นาโนกรัม/มล.