บทที่ 1

บทนำ

ที่มาของปัญหา

การวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา มีความสำคัญและมีประโยชน์ในการศึกษาข้อมูลหลาย ๆ ด้าน (Smith and Stewart, 1981) อาทิเช่น การพัฒนาตำรับยาเตรียมรูปแบบต่างๆ การศึกษาทางเภสัชวิทยา เภสัชจลนศาสตร์ของยา และกลไกการออกฤทธิ์ของยา การควบคุมระดับยาในผู้ป่วย ฯลฯ โดยเฉพาะที่สำคัญในประเทศไทย คือ การหาการเอื้อประโยชน์สัมพัทธ์ (Relative Bioavailability) ระหว่างยาที่ผลิตในประเทศไทยกับยาที่ผลิตจากต่างประเทศ

ในการวิเคราะห์หาปริมาณยา ขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งคือ การทำให้ตัวอย่างพลาสมาสะอาดมากพอที่จะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณยาได้ โดยปราศจากสิ่งรบกวนต่าง ๆ เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องตรงตามความเป็นจริง (Lim, 1988; Millipore, Waters Chromatography Division, 1988) การทำให้ตัวอย่างพลาสมาสะอาดมีอยู่ 2 หลักการใหญ่ ๆ (Bye and Brown, 1977; Lim, 1988; Mcdowall, 1989; Smith and Stewart,1981; Szepesi, 1990) คือ

1. การแยกยาออกจากตัวอย่างพลาสมา วิธีนี้เน้นที่การพยายามหาสาร หรือตัวทำละลายที่ยาชอบ หรือละลายยาได้ดีที่สุด เพื่อให้ตัวยาเกิดการกระจายตัวแยกจากตัวอย่างพลาสมาไปอยู่ในสารตัวทำละลายแทน ซึ่งสาร

ที่ใช้แยกยามีทั้งที่เป็นของแข็ง และของเหลว วิธีที่ใช้หลักการนี้ ได้แก่ Liquid-Liquid Extraction (LLE) และ Liquid-Solid Extraction (LSE) เป็นต้น

2. การแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา วิธีนี้เน้นที่การพยายามแยกเฉพาะพลาสมาโปรตีนออกจากส่วนต่าง ๆ ของตัวอย่างพลาสมา แล้วสามารถนำส่วนที่เหลือของตัวอย่างพลาสมาไปวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาต่อได้ทันที ทั้งนี้เนื่องจากในพลาสมาแม้จะประกอบด้วยสารต่าง ๆ มากมาย แต่สารที่มีอยู่ในปริมาณมากที่สุดคือ พลาสมาโปรตีนจะมีมากถึง 7% ส่วนอื่น ๆ คือ เกลืออนินทรีย์ต่าง ๆ ประมาณ 0.9% นอกจากนี้จะเป็นส่วนประกอบที่เป็นอินทรีย์และอนินทรีย์ที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein organic and inorganic components) (White, et al., 1973)

วิธีวิเคราะห์ที่ใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาจึงเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายมากกว่าวิธีวิเคราะห์ที่ใช้หลักการแยกยาออกจากตัวอย่างพลาสมา (Berkman,1953; Brigg,1949 Goldstein, 1949; Heide, Haupt and Schwick,1977; Henry,1964; Koch and Hanke, 1953; Peter and Slyke, 1932; Russel, 1923; Smith and Stewart, 1981; Somogyi, 1930, 1931)

ตามธรรมชาติไม่ว่ายาถูกบริหารเข้าสู่ร่างกาย จะโดยวิธีใดก็ตามเมื่อยานั้นเข้าสู่กระแสโลหิต มันจะอยู่ในสภาวะสมดุลกับพลาสมาโปรตีนในร่างกาย (La Du,et al.,1971) โดยการจับอยู่กับพลาสมาโปรตีนในลักษณะที่สามารถผันกลับได้ (reversible) ด้วยแรงยึดเหนี่ยวทางกายภาพ (Van der Waal's ferces)หรือพันธะอื่น ๆ เช่น พันธะไฮโดรเจน พันธะไอออนิก พันธะที่ไม่ชอบน้ำ พันธะที่ชอบน้ำ เป็นต้น (Lehinger, 1975; Piafsky, 1983) ยาแต่ละชนิด

จะมีคุณสมบัติในการจับกับพลาสมาโปรตีนได้แตกต่างกัน ซึ่งอาจแบ่งได้เป็น 3 ระดับ (Grahame-Smith and Aronson, 1984) คือ

- weakly bound จับกับพลาสมาโปรตีน น้อยกว่า 50%
- moderately bound จับกับพลาสมาโปรตีน 50-80%
- highly bound จับกับพลาสมาโปรตีน มากกว่า 80%

เทคนิคที่ใช้ในการวัดค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีน (Chan,Vyas and Brandt,1987; Chignell,1977,1980; Koch-Weser and Seller, 1976; Piafsky,1983) ได้แก่ Equilibrium Dialysis (ED), Ultrafiltration และ Ultracentrifugation เป็นต้น โดย ED เป็นเทคนิคที่นิยมใช้มาก ในการวัดค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนรวม วิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย มีความเที่ยงตรงพอสมควร สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายไม่มากนัก แต่เป็นวิธีที่ช้า ใช้เวลาในการทดลองมาก และไวต่อ Donna และ membrane effect นอกจากนี้แล้วยังต้องใช้โปรตีนในการทดลองเป็นปริมาณมาก และสมดุลของการจับของยากับพลาสมาโปรตีน (binding equilibrium) ถูกรบกวนจากขั้นตอนการเจือจาง (dilution) ได้ง่าย ทำให้ดัดแปลงใช้กับตัวอย่างทางคลีนิคได้ไม่ง่ายนัก Ultrafiltration เป็นวิธีที่ทำได้รวดเร็ว เนื่องจากส่วนของโปรตีนอิสระ (protein-free phase) จะถูกขับดันผ่านเยื่อเลือกผ่าน (semi-permeable membrane) ด้วยแรงดันแก๊ส (gas pressure) วิธีนี้สามารถใช้กับตัวอย่างทางคลีนิคที่มีปริมาณน้อยๆได้ แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเป็นวิธีที่ต้องใช้ membrane จึงมีข้อเสียจาก Donna และ membrane effect เช่นเดียวกับ ED ในขณะที่ Ultracentrifugation จะเป็นวิธีที่แยกส่วนของโปรตีนอิสระโดยการปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็วสูง จึงไม่จำเป็นต้องใช้ membrane เหมือนใน 2 เทคนิคแรก ดังนั้นเทคนิคนี้จึงไม่มีปัญหาในเรื่อง Donna และ membrane effect แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้จำเป็นต้องใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงซึ่งเป็นเครื่องมือเฉพาะที่มีราคาค่อนข้างแพง

พลาสมาโปรตีนมีอยู่หลายชนิด มีหน้าที่แตกต่างกันไป แต่ที่มีมากที่สุด คือ อัลบูมิน (Montgomery, et al., 1977; White, et al., 1973) โดยทั่วไปยาที่เป็นกรดและเป็นกลางมักจะจับกับอัลบูมิน (Koch-Weser and Sellers, 1976 a,1976 b; White, et al., 1973) ซึ่งเป็นพลาสมาโปรตีนที่มีมากที่สุดในพลาสมา ส่วนยาที่เป็นเบสก็สามารถจับกับอัลบูมินได้เช่นกัน แต่จะไม่ดีเท่ากับการจับกับพลาสมาโปรตีนชนิดอื่นๆ (Bickel, 1975; Danon, 1979; Piafsky,1983; White,et al.,1973) โดยยาจะจับกับอัลบูมินได้ที่ binding sites ที่แตกต่างกันบนโมเลกุลของอัลบูมิน (White,et al.,1973) จากการศึกษาและรวบรวมข้อมูลทางเอกสารเกี่ยวกับ binding sites บนอัลบูมินเท่าที่สามารถค้นหาได้ (Birkett,1980;Chignell,1969 a,1969 b; Mae, et al., 1980; Mean, et al., 1982; Nicholas, Sollenne and Means, 1979; Sawazin, et al., 1979; Sjoholm, 1980; Sjoholm, et al., 1980; Sudlow, Birkett and Wade, 1976, 1977; Wollert, Fehske and Muller,1980) พบว่า มี binding site บนอัลบูมินอย่างน้อย 2 binding sites ที่มี common binding กับยา คือ site I หรือ Warfarin binding site และ site II หรือ Tryptophan binding site ยาที่ชอบจับกับ site II ส่วนใหญ่มักจะมีลักษณะเป็นกรดอะโรมาติคคาบอกซิลิค ที่แตกตัวได้ดีที่ pH ของร่างกาย ในโมเลกุลสามารถมีได้หลายโครงแบบ (configuration) แต่ละโครงแบบก็มีบทบาทในการจับกับ binding site นี้ด้วย ประจุลบบนโมเลกุลมักอยู่ที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งของโมเลกุลที่อยู่ห่างจากส่วนที่ไม่มีขั้ว ยาที่จับกับ site นี้ได้แก่ ยาต้านเบาหวาน ยากลุ่มเบนโซไดอะซีพีน (Benzodiazepines) คลอไดอะซีพอกไซด์ (Chlordiazepoxide) กรดเอทาครายนิค (Ethacrynic acid) ยากลุ่มกรดฟีนามิค(Fenamic acids) เฟลอบิโปรเฟน(Flurbiprofen) ไอบูโปรเฟน (Ibuprofen) และ นาโปรเซน (Naproxen) เป็นต้น ส่วนยาที่ชอบจับกับ site I มักจะมีลักษณะเป็นกรดอะโรมาติค และเป็นโมเลกุลเฮทเทอโรไซคลิก

ที่มีขนาดใหญ่ (bulk) มีการใช้ประจุลบร่วมกันระหว่างกลุ่มอีนอล 2 กลุ่ม หรือกลุ่มคีโตและกลุ่มอีนอล ประจุลบมีการเคลื่อนที่ (delocalize) มาก และมักอยู่ที่ศูนย์กลางของโมเลกุล ในส่วนที่ไม่มีขั้วที่มีขนาดใหญ่กว่า เช่น อะซีโนคูมาริน (Acenocoumarin) กรดไอโอฟีนอกซิค (Iophenoxic acid) อินโดเมทาซิน (Indomethacin) ฟีนิลบิวทาโซน (Phenylbutazone) เฟนโพรคูมอน (Phenprocoumon) ซัลฟินไพราโซน (Sulfinpyrazone) และ วาร์ฟาริน (Warfarin) เป็นต้น

วิธีเคราะห์ที่ใช้หลักแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายมากกว่าวิธีวิเคราะห์ที่ใช้หลักการแยกยาออกจากตัวอย่างพลาสมา มีรายงานการวิเคราะห์ที่ใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาปรากฏมากมาย แต่มีการศึกษาบางส่วนกล่าวถึงวิธีการแยกพลาสมาโปรตีนว่า การดึงพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาโดยการแยกพลาสมาโปรตีน จะทำให้ยาติดไปกับส่วนของพลาสมาโปรตีนที่แยกออก โดยเฉพาะยาที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูง (Bruke, et al., 1980; Burke and Thenot, 1985; Bye and Brown, 1977; Chen and Chia, 1981; Eksberg and Ehrsson, 1985; Lankelma and Poppe, 1978; Lowson, et al.,1981; Mcdowall, 1989; Parkhurt, 1984; Rovan, 1985; Smith and Stewart, 1981) ปี 1988 Lim (Lim, 1988) ได้รายงานในทำนองเดียวกันว่า ถ้ายามีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูงตัวยาอาจถูกดูดซับอยู่บนผิวของพลาสมาโปรตีนทำให้ยาบางส่วนอาจติดไปกับส่วนของพลาสมาโปรตีนที่แยกออก และในปี 1989 Mcdowell (Mcdowell, 1989) ได้กล่าวถึงปัญหาของการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนว่า ยาอาจจะเข้าไปรวม (occlude) กับพลาสมาโปรตีนที่ถูกแยกออกทำให้ผลการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาไม่ถูกต้องตรงตามความเป็นจริง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากนี้การทดลองเบื้องต้นเพื่อแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาของยาที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีน และมีคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพแตกต่างกันหลายตัวในห้องปฏิบัติการ พบว่าผลการทดลองดังกล่าวมีส่วนสัมพันธ์กับรายงานการศึกษาถึงการจับของยากับ albumin binding sites แบบต่างๆ ผลการศึกษานี้ จึงอาจใช้ในการคาดคะเนในเรื่อง binding sites ได้ด้วย

จากการสำรวจวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา โดยอาศัยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาตามวารสารต่าง ๆ ทางด้านการวิเคราะห์ พบว่าข้อมูลที่รายงานยังมีความไม่ชัดเจนและสมบูรณ์ ในด้านการรายงานผลการวิเคราะห์และการ validate วิธีวิเคราะห์โดยเฉพาะยากลุ่มที่มีการจับกับพลาสมาโปรตีนสูง อาทิเช่น บางรายงานไม่แสดงเปอร์เซนต์การคืนกลับของยา และ/หรือ ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Avgerinos and Hutt, 1986; Avgerinos and Malamataris, 1989; Dusci and Hackett, 1979; Kiang, Lee and Kushinsky, 1986; Lin, et al., 1979; Lee, Ti and Khoo, 1988; Macek and Vacha, 1987; Mawatari, Iinuma and Watanabe, 1989; Repaka, et al., 1982; Sato, Owada and Ito, 1989; Stubb, et al., 1986; Teare, et al., 1982; Yuusry, et al.,1988) ในขณะที่บางรายงานไม่แสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Banza, et al., 1985; Bury, 1985; Guermouche, et al., 1985; Kiang, Lee and Kushinsky, 1986; Lee, Ti and Khoo, 1988; Macek and Vacha, 1987; Nation, Peng and Chiou, 1979; Rapaka, et al., 1982; Rudrik and Bowdon, 1981; Teare, et al., 1982) เป็นต้น นอกจากนี้ ก็ไม่ปรากฏว่าได้มีผู้ใดรวบรวมข้อมูล หรือหลักการทำให้ตัวอย่างพลาสมาสะอาดมากพอที่จะนำไปวิเคราะห์ โดยปราศจากสิ่งรบกวนด้วยหลักการแยกพลาสมา

โปรตีนไว้อย่างชัดเจน และเป็นมาตรฐานเพียงพอ จึงเป็นที่น่าสนใจในการที่จะศึกษาหาความเป็นไปได้ของการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโดยวิธีการแยกพลาสมาโปรตีนเพื่อให้ได้มาซึ่งแบบอย่างการวิเคราะห์ โดยการแยกพลาสมาโปรตีนที่ได้มาตรฐานมีเหตุมีผล โดยจะเน้นศึกษาในกลุ่มยาที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูง ซึ่งมีรายงานกล่าวถึงปัญหาของวิธีการแยกพลาสมาโปรตีนว่าการดึงพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา โดยการแยกพลาสมาโปรตีน จะทำให้ยาติดไปกับส่วนของพลาสมาโปรตีนที่แยกออก โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มยาที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูงที่มีคุณสมบัติเป็นกรด ซึ่งเป็นกลุ่มยาที่พบว่ามีการผลิตขึ้นภายในประเทศ (local made) ค่อนข้างมากด้วย ทั้งนี้เพื่อให้ได้แบบอย่างการวิเคราะห์ที่ทำให้สามารถนำผลการศึกษาไปใช้ประโยชน์ได้ทันที

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาผลและประสิทธิภาพของการแยกพลาสมาโปรตีนต่อการวิเคราะห์หาปริมาณยาในตัวอย่างพลาสมาของยากลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นกรดที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูง
2. เพื่อสร้างกระสวนของการวิเคราะห์หาปริมาณยาในตัวอย่างพลาสมาของยากลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นกรดที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูงโดยอาศัยผลการศึกษาจากข้อ 1.

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการศึกษา

1. ทราบแนวทางความเป็นไปได้ ในการใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีน ออกจากตัวอย่างพลาสมาในการวิเคราะห์ยากลุ่มที่มีการจับกับพลาสมาโปรตีนสูง และมีคุณสมบัติเป็นกรด กลุ่มอื่น ๆ ต่อไป

2. จากข้อมูลที่ได้ ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของยาที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูง ต่อการวิเคราะห์ปริมาณยาในพลาสมา โดยวิธีการแยกพลาสมาโปรตีน

3. ได้กระสวนของการวิเคราะห์ยาในพลาสมาของยาที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูงและมีคุณสมบัติเป็นกรด

4. สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้เป็นรากฐาน ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาได้อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสมแก่การใช้งานในประเทศไทย

5. ได้แนวทางที่ใช้คาดการณ์การจับของยากับ albumin binding sites แบบต่าง ๆ ของยากลุ่มกรดที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูง