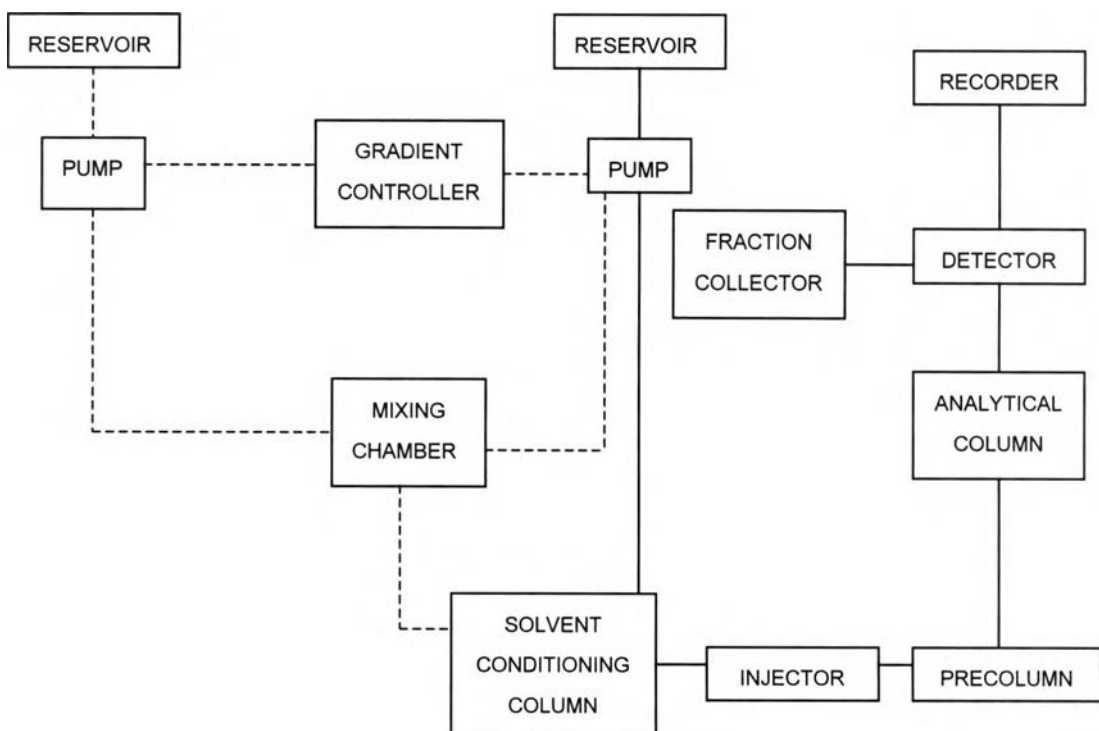


บทที่ 6

วิธีวิเคราะห์หาระดับยาในพลาสมาด้วยวิธี HPLC

HPLC (High – performance or high – pressure liquid chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกส่วนประกอบของสารเคมีออกจากกันเป็นส่วนๆ โดยอาศัยหลักการที่ว่า สารเคมีแต่ละอย่างจะมีความแตกต่างกันเมื่ออยู่ในตัวกลาง (media) 2 ตัว ที่แตกต่างกัน ตัวกลางตัวหนึ่งคือ mobile phase ซึ่งในที่นี้ใช้เป็นของเหลว (moving fluid or solvent) ส่วนตัวกลางอีกตัวหนึ่งคือ stationary phase หรือ sorbent เมื่อนำตัวอย่างพลาสมาที่เก็บมาฉีดผ่านตัวกรองเข้าไปใน column ภายใต้ความดันที่สูงมาก (ค่าความดันประมาณ 1000 – 5000 psi) เข้าไปในระบบร่วมกับตัวกลาง 2 ตัวดังกล่าว จะสามารถวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาออกมาได้ตามค่าความแตกต่างของ peak ใน chromatogram ที่ออกมาในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

ขั้นตอนการทำงานของ HPLC ในการวิเคราะห์ระดับยาในพลาสมามีลักษณะดังรูปที่ 6.1



รูปที่ 6.1 แสดง block diagram ของการวิเคราะห์ด้วยระบบ HPLC

วัสดุและวิธีการวิจัยด้วยวิธี HPLC

สารเคมี – Methanol (HPLC grade), Labscan

KH_2PO_4 (HPLC grade), Merck

Ethyl Acetate (HPLC grade), Labscan

Methimazole standard, Eli-Lilly (lot. No. H11009)

PTU, Juritex (lot. No. 9354874) as an internal standard

น้ำกรองสำหรับ HPLC (double distilled water)

Chromatographic condition

เครื่อง HPLC: Waters, USA

Column: ODS2, 5 μm , 250 x 4.6 mm, Spherisorb

Mobile phase: Methanol: 25 mM KH_2PO_4 (pH 3.0); 10:90

Detector: UV 258 nm

Flow rate: 1 mL/min.

Injected volume: 50 μL

Retention time: Methimazole ~ 6 min., PTU ~ 34 min.

Plasma extraction preparation

Plasma 0.5 mL

↓ + 35 μL IS (PTU 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Methanol)

↓ + 5 ml Ethyl acetate

Centrifuged at 4,000 rpm นาน 10 min.

↓
Organic phase

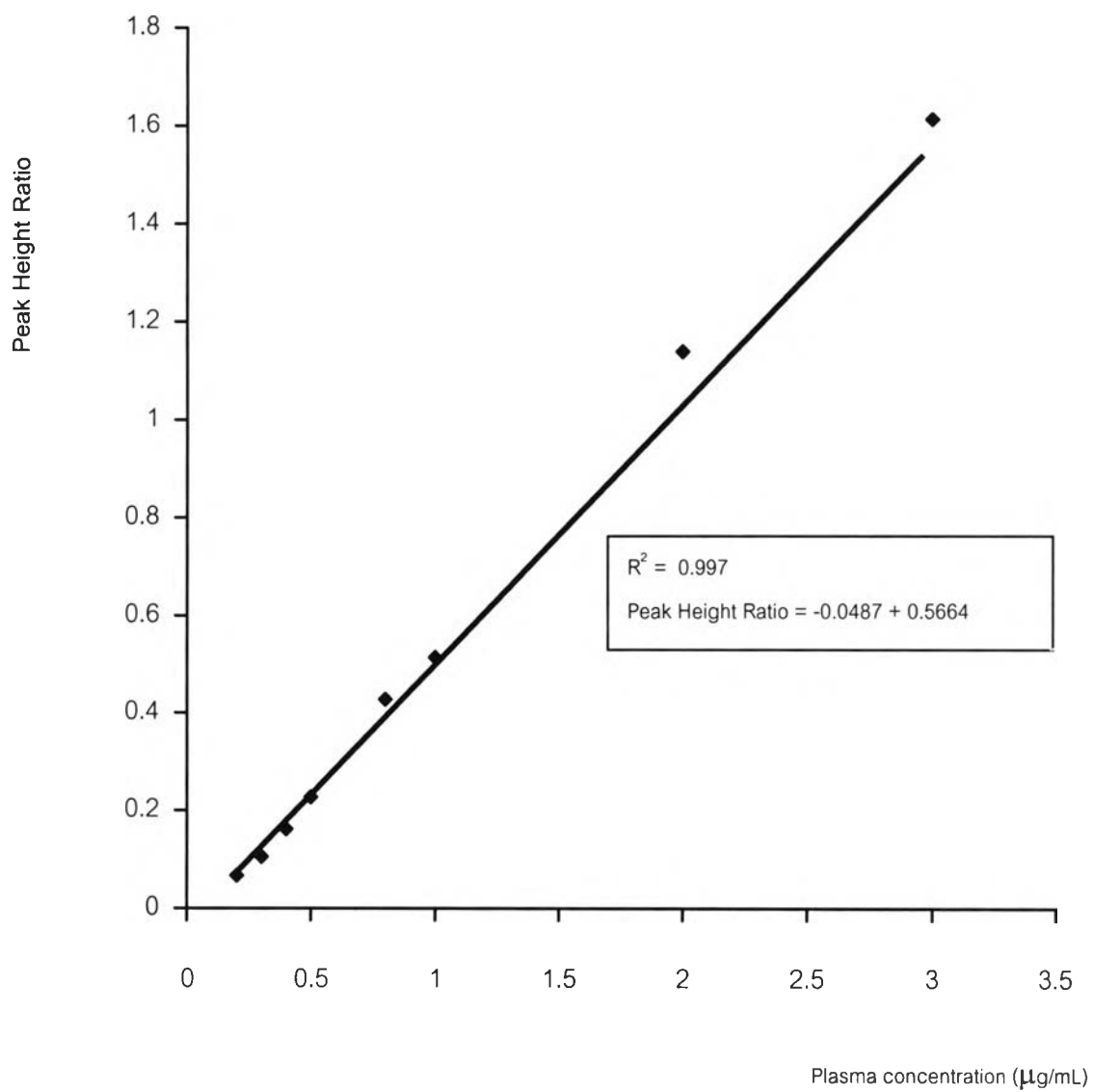
↓
Evaporated to dryness by Dry keeper (Maxi dry plusTM)

↓ + 200 μL of mobile phase

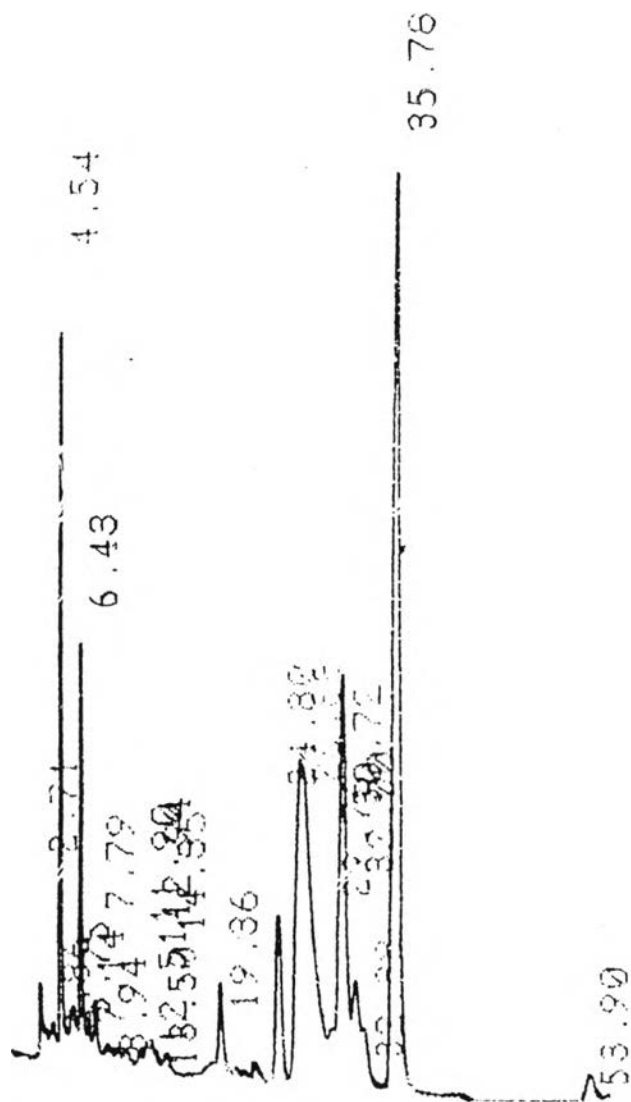
50 μL was injected into HPLC

ตารางที่ 6.1 แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของยา methimazole ในพลาสมากับ สัดส่วนพื้นที่ของยา methimazole : internal standard

ความเข้มข้นยา ($\mu\text{g/mL}$)	Peak height ratio
0.2	0.0670
0.3	0.1051
0.4	0.1612
0.5	0.2271
0.8	0.4281
1.0	0.5137
2.0	1.1387
3.0	1.6142



แผนภูมิที่ 6.1 แสดงกราฟมาตรฐานของ methimazole ในพลาสมา



รูปที่ 6.2

Chromatogram แสดงลักษณะ peak ของการแยกยาออกจาก plasma retention time ของ MMI อยู่ที่เวลาประมาณ 6 นาที retention time ของ PTU (IS) อยู่ที่เวลาประมาณ 34 นาที

การประเมินวิธีวิเคราะห์

- หาค่าความเที่ยงตรง:ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision) ในวันเดียวกัน (within run precision) และ ระหว่างวัน (between run precision)

ตารางที่ 6.2 แสดงความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (n = 3)

Known conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Peak Height Ratio		% CV
	\bar{X}	S.D.	
0.2	0.0674	0.0041	6.08
0.4	0.1582	0.0029	1.83
0.8	0.4257	0.0064	1.50
2.0	1.1532	0.0149	1.29

ตารางที่ 6.3 แสดงความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ในระหว่างวัน (n = 3)

Known conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Peak Height Ratio		% CV
	\bar{X}	S.D.	
0.2	0.0784	0.0109	13.90
0.4	0.1745	0.0141	8.08
0.8	0.4243	0.0124	2.92
2.0	1.2354	0.1004	8.13

- หาค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy) จากการคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนตัวของยา (% recovery) ที่เทียบระหว่าง methimazole ในน้ำกับในพลาสมา

ตารางที่ 6.4 แสดงค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

Known conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Estimated conc. ($\mu\text{g/mL}$)	% Recovery
0.2	0.2043	102.15
0.4	0.3706	92.65
0.8	0.8418	105.23
2.0	2.0964	104.82