



สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# การวิเคราะห์ ตัวอย่างในชีวสาร

เพ็ญศรี ทองนพเนื่อ

# การวิเคราะห์ตัวยาในชีวสาร

# การวิเคราะห์ตัวยาในชีวสาร

เพ็ญศรี ทองนพเนื่อ



สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2553

เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ

การวิเคราะห์ตัวยาในชีวะสาร / เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ

1. ยา -- การวิเคราะห์. 2. สารน้ำในร่างกาย -- การวิเคราะห์.

610.28

ISBN 978-974-03-2659-5

สปจ. 1455



สรรคุณคำวิชาการ สู้สังคม

www.ChulaPress.com

*Knowledge to All*

ลิขสิทธิ์ของสำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ครั้งที่ 1 จำนวน 1,000 เล่ม พ.ศ. 2553

การผลิตและการลอกเลียนหนังสือเล่มนี้ไม่ว่ารูปแบบใดทั้งสิ้น

ต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากสำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้จัดทำหน้าย ศูนย์หนังสือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

สาขา

ศาลาพระเกี้ยว โทร.0-2218-7000-3 โทรสาร0-2255-4441

สยามสแควร์ โทร.0-2218-9881-2 โทรสาร 0-2254-9495

ม.นครสวรรค์ จ.พิษณุโลก โทร. 0-5526-0162-4 โทรสาร 0-5526-0165

ม.เทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา โทร. 0-4421-6131-4 โทรสาร 0-4421-6135

ม.บูรพา จ.ชลบุรี โทร. 0-3839-4855-9 โทรสาร 0-3839-3239

โรงเรียนนายร้อย จปร. จ.นครนายก โทร. 0-3739-3023 โทรสาร 0-3739-3023

ม.พะเยา จ.พะเยา โทร. 0-5446-6799-800 โทรสาร 0-5446-6798

จัตุรัสจามจุรี (CHAMCHURI SQUARE) ชั้น 4 โทร. 0-2160-5301-2 โทรสาร0-2160-5304

รัตนานิเบศร์ (แยกแคราย) โทร. 0-2950-5408-9 โทรสาร 0-2950-5405

ม.เทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี จ.นครราชสีมา โทร. 0-4492-2662-3 โทรสาร 0-4492-2664

มือถือ 08-6392-7785

Call Center (จัดส่งทั่วประเทศ) โทร. 0-2255-4433 <http://www.chulabook.com>

และเครือข่าย

ร้านค้าติดต่อ แผนกขายส่ง สาขารัตนานิเบศร์ (แยกแคราย) โทร. 0-2950-5408-9 โทรสาร 0-2950-5405

มีจำหน่ายที่ ร้านซีเ็ดทุกสาขา ร้านนายอินทร์ทุกสาขา และร้านหนังสือชั้นนำทั่วประเทศ

กองบรรณาธิการ : ทิพวรรณ โหละสุต

ออกแบบปก : กิตติกร สุรางค์ ออกแบบรูปเล่ม : ศ. ภาณุ. ดร.เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ

พิมพ์ที่ : บริษัท แอคทีฟ พรินท์ จำกัด โทร. 0-2215-7698 โทรสาร 0-2214-0038

# คำนำ

หนังสือ “การวิเคราะห์ตัวยาในชีวสาร” ได้ถูกเรียบเรียงขึ้นด้วยวัตถุประสงค์ เพื่อใช้เป็นหนังสือหลักในการเรียนการสอนระดับบัณฑิตศึกษา ในวิชา Advanced biomedical analysis และวิชา Drug determination และเป็นหนังสือวิชา Biomedical analysis ที่ใช้สอนในระดับปริญญาตรี อีกทั้งใช้เป็นหนังสือสำหรับนักวิทยาศาสตร์ผู้ปฏิบัติงานการตรวจติดตามระดับยาในผู้ป่วยในสถานพยาบาล และผู้ปฏิบัติงานศึกษาเกี่ยวกับชีวสมมูลของตัวยาที่ผลิตในประเทศ รวมถึงนักวิจัยที่ทำการศึกษาด้านเภสัชจลนศาสตร์ของตัวยาและสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และด้านวิศวกรรมชีวเวชที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิต ดังนั้น หนังสือเล่มนี้จึงเป็นประโยชน์ในการเป็นแหล่งความรู้พื้นฐานด้านทฤษฎีสู่การปฏิบัติจริง เพื่องานวิจัย วิทยานิพนธ์ ปริญญานิพนธ์ ของนิสิต นักศึกษา ผู้ปฏิบัติงาน นักวิจัย ตลอดจนบุคคลทั่วไปที่มีความสนใจงานวิเคราะห์ตัวยาในชีวสาร

หนังสือเล่มนี้ นอกจากจะได้เรียบเรียงและค้นคว้าจากหลักวิชา และพัฒนาการของเทคโนโลยีการวิเคราะห์แล้ว ยังนำมาจากความรู้ที่เกิดจากประสบการณ์ของผู้เขียนเกี่ยวกับการวิเคราะห์ตัวยาในชีวสาร ทั้งจากการสอน การวิจัย การเป็นที่ปรึกษา และเป็นวิทยากร มา มากกว่า 20 ปี โดยผลงานที่สร้างสมต่างๆ ได้ถูกนำมาเป็นตัวอย่างในการอธิบายเชื่อมโยงจากหลักทฤษฎีสู่การปฏิบัติจริง และได้เน้นเทคนิคการวิเคราะห์ที่นิยมใช้กันอย่างมากในปัจจุบัน เพื่อให้เกิดประโยชน์ในการนำไปใช้ปฏิบัติได้จริง หรือเพื่อเป็นหลักการให้เห็นถึงแนวทางเพื่อการปฏิบัติ พร้อมทั้งมีการอธิบายเฉพาะเจาะจงในรายละเอียดที่สำคัญในกระบวนการวิเคราะห์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการเลือกและพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ที่เหมาะสม ซึ่งต้องอาศัยทั้งหลักวิชาและทักษะซึ่งเป็นทั้งศาสตร์และศิลป์ และแม้ว่าหนังสือเล่มนี้จะกล่าวถึงหลักการสำคัญของเครื่องมือประเภทต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ แต่มิได้เน้นรายละเอียดในส่วนประกอบต่างๆ ของเครื่องมือวิเคราะห์เหล่านั้น เนื่องจากส่วนประกอบของเครื่องมือจะมีการพัฒนาหรือเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลาตามแหล่งผลิตและการเปลี่ยนแปลงของเทคโนโลยี อีกทั้งความรู้และข้อมูลดังกล่าวมักมีอยู่ในคู่มือของเครื่องมือ หรือตำราในด้านเครื่องมือการวิเคราะห์โดยตรง ดังนั้น จุดเน้นสำคัญของหนังสือเล่มนี้จึงเป็นการเชื่อมโยงให้ผู้อ่านได้เข้าใจในการนำหลักการสำคัญต่างๆ ที่เรียบเรียงไว้ไปเชื่อมต่อการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นในอนาคต เพื่อให้หนังสือนี้เป็นได้ทั้งพื้นฐานทฤษฎี และหลักการปฏิบัติของการวิเคราะห์ตัวยา

ในชีวิตจริง และเข้ากับยุคสมัยได้ตลอดเวลา นอกจากนี้การรวบรวมและเรียบเรียง  
จนเป็นหนังสือดังปรากฏอยู่นี้ ได้เคยนำมาใช้เป็นเอกสารในการเรียนการสอนทั้งระดับ  
บัณฑิตศึกษา และระดับปริญญาตรี โดยมีการปรับปรุงและปรับแต่งจนมั่นใจได้ว่าจะทำให้อ่าน  
ได้เข้าใจง่าย รวมถึงมีเนื้อหาที่ประสานเชื่อมโยงกันได้ดีตลอดทั้งเล่ม

การเรียงลำดับเนื้อหาในหนังสือ “การวิเคราะห์ด้วยยาในชีวิตจริง” นี้ เป็นการลำดับตาม  
ขั้นตอนของกระบวนการวิเคราะห์ด้วยยาในชีวิตจริง โดยตั้งต้นจากการทำความเข้าใจกับงาน  
วิเคราะห์ทางชีวสาร ในบทที่ 1 การทำความเข้าใจกับข้อมูลสำคัญของการวิเคราะห์ทั้งส่วนของ  
ตัวอย่าง และส่วนของชีวสาร ในบทที่ 2 รายละเอียดในบทที่ 3 เป็นเนื้อหาเกี่ยวกับการเตรียม  
ตัวอย่างชีวสารให้พร้อมสำหรับการวิเคราะห์ สำหรับบทที่ 4 และบทที่ 5 เป็นเทคนิควิธี  
วิเคราะห์ ที่เน้นเฉพาะเทคนิค HPLC และเทคนิคอิมมูโนแอสเซย์ ตามลำดับ ดังนั้น เพื่อให้  
ผู้อ่านได้รับประโยชน์อย่างแท้จริง และเข้าใจการวิเคราะห์ด้วยยาในชีวิตจริงอย่างถ่องแท้ ผู้อ่านจึง  
ควรอ่านติดต่อกันมาตั้งแต่บทที่ 1 จนถึงบทที่ 3 และเลือกบทที่ 4 หรือบทที่ 5 ตามแต่เทคนิค  
ที่สนใจหรือต้องการใช้ นอกจากนี้หลักการและทฤษฎีของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC  
ในบทที่ 4 ยังเหมาะกับผู้ที่ต้องใช้เทคนิค HPLC ในงานวิเคราะห์ ซึ่งอาจไม่จำเป็นต้องเป็น  
ตัวอย่างชีวสาร เช่น การใช้เทคนิค HPLC เพื่อการวิเคราะห์ยาในเภสัชภัณฑ์ ในอาหาร ใน  
เครื่องสำอาง ในสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ อีกทั้งเทคนิคอิมมูโนแอสเซย์ในบทที่ 5 ยัง  
เหมาะกับงานด้านอิมมูโนวิทยา ที่ต้องการพื้นฐานและหลักการทฤษฎีของการวิเคราะห์ด้วย  
หลักการทางอิมมูโนที่ยังไม่เคยมีการรวบรวมหรือเรียบเรียงมาก่อนหน้านี้

ทั้งนี้ เพื่อให้หนังสือเล่มนี้ใช้ภาษาไทยที่ถูกต้อง ดังนั้นจึงใช้คำศัพท์ต่างๆ ตามมาตรฐาน  
ของ “ศัพท์วิทยาศาสตร์ อังกฤษ-ไทย ไทย-อังกฤษ” ฉบับราชบัณฑิตยสถาน พิมพ์ครั้งที่ 5  
(แก้ไขเพิ่มเติม) พ.ศ. 2546 หลักเกณฑ์การทับศัพท์ภาษาอังกฤษ ราชบัณฑิตยสถาน และ  
“ศัพท์เภสัชศาสตร์ อังกฤษ-ไทย ไทย-อังกฤษ” ฉบับราชบัณฑิตยสถาน พิมพ์ครั้งที่ 2 (แก้ไข  
เพิ่มเติม) พ.ศ. 2551 ยกเว้นคำที่มีการใช้เป็นตัวย่อในภาษาอังกฤษ จนเป็นที่รู้จักคุ้นเคย  
จำเป็นต้องคงตัวย่อเหล่านั้น รวมถึงชื่อตัวยาต่างๆ เป็นภาษาอังกฤษดั้งเดิม เช่น HPLC  
Theophylline เพื่อให้อิงกับระบบสากลได้ด้วย

# สารบัญ

|                                                                             | หน้า      |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>คำนำ</b>                                                                 |           |
| <b>1 บทนำ</b>                                                               | <b>1</b>  |
| 1.1 ความจำเป็นของการวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสาร                          | 1         |
| 1.2 ความแตกต่างของการวิเคราะห์ตัวยาในเภสัชภัณฑ์และตัวยา<br>ในตัวอย่างชีวสาร | 5         |
| 1.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสาร                                | 7         |
| เอกสารอ้างอิง                                                               | 9         |
| <b>2 ข้อมูลของตัวยาและชีวสาร เพื่อการวิเคราะห์</b>                          | <b>11</b> |
| 2.1 ข้อมูลของตัวยาเพื่อการวิเคราะห์                                         | 11        |
| 2.1.1 ข้อมูลของตัวยาเมื่ออยู่นอกร่างกาย                                     | 11        |
| 2.1.2 ข้อมูลของตัวยาเมื่ออยู่ในร่างกายสิ่งมีชีวิต                           | 14        |
| 2.1.3 สารมาตรฐานของตัวยา                                                    | 16        |
| 2.2 ชีวสาร                                                                  | 17        |
| 2.2.1 ตัวกลางชีวสาร และตัวอย่างชีวสาร                                       | 18        |
| 2.2.2 ตัวอย่างชีวสารสามัญ                                                   | 20        |
| 2.2.2.1 เลือด พลาสมา ซีรัม                                                  | 20        |
| 2.2.2.2 น้ำลาย                                                              | 32        |
| 2.2.2.3 ปัสสาวะ                                                             | 36        |
| 2.2.2.4 อูจจาระ                                                             | 39        |
| 2.2.3 ตัวอย่างชีวสารเฉพาะ                                                   | 40        |
| เอกสารอ้างอิง                                                               | 42        |

|                                                               | หน้า      |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3 การเตรียมตัวอย่างชีวสาร เพื่อการวิเคราะห์</b>            | <b>45</b> |
| 3.1 เทคนิคการเตรียมตัวอย่างชีวสาร                             | 46        |
| 3.2 การปรับสภาพชีวสาร ก่อนการเตรียมตัวอย่าง                   | 47        |
| 3.2.1 การเจือจางตัวอย่าง                                      | 48        |
| 3.2.2 การทำแห้งเยือกแข็ง                                      | 48        |
| 3.2.3 การปั่นผสมเป็นเนื้อเดียว                                | 48        |
| 3.2.4 การแยกสลายคู่ด้วยน้ำ                                    | 49        |
| 3.2.5 การทำอนุพันธ์เคมี                                       | 50        |
| 3.3 การแยกโปรตีน                                              | 51        |
| 3.3.1 หลักการในการแยกโปรตีน                                   | 52        |
| 3.3.2 การแยกโปรตีนด้วยการตกตะกอน                              | 54        |
| 3.3.2.1 กลุ่มสารแยกโปรตีนที่ทำให้โปรตีนขาดน้ำ                 | 55        |
| 3.3.2.2 กลุ่มสารแยกโปรตีนที่ทำให้เกิดเกลือโปรตีนที่ไม่ละลาย   | 57        |
| 3.3.2.3 วิธีการเตรียมตัวอย่างชีวสารด้วยการแยกโปรตีน           | 61        |
| 3.3.2.4 ประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่างชีวสารด้วยการแยกโปรตีน | 65        |
| 3.3.3 อัลตราฟิลเทรชัน                                         | 66        |
| 3.3.4 ไดแอลลิซิส                                              | 67        |
| 3.3.5 ไมโครไดแอลลิซิส                                         | 67        |
| 3.3.6 เรสทริกต์แอกเซสมีเดีย (Restricted access media, RAM)    | 69        |
| 3.3.6.1 ประเภทของ RAM                                         | 70        |
| 3.3.6.2 การใช้ RAM ในการวิเคราะห์ตัวอย่างชีวสาร               | 70        |
| 3.4 การสกัดด้วยสารสกัดของเหลว                                 | 73        |
| 3.4.1 กฎการกระจายตัวของเน็นสต์                                | 74        |
| 3.4.2 การเลือกใช้สารสกัดของเหลว                               | 76        |
| 3.4.3 การปรับสภาวะของตัวอย่างชีวสารเพื่อการสกัด               | 77        |
| 3.4.4 วิธีการสกัดตัวอย่างชีวสารด้วยสารสกัดของเหลว             | 79        |
| 3.4.5 ประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่างชีวสารด้วยการสกัด        | 82        |

|                                                                                                 | หน้า       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.5 การสกัดด้วยสารสกัดของแข็ง                                                                   | 83         |
| 3.5.1 วิวัฒนาการของสารสกัดของแข็ง                                                               | 83         |
| 3.5.2 กลไกการสกัดด้วย SPE                                                                       | 87         |
| 3.5.3 ขั้นตอนพื้นฐานในการใช้ SPE                                                                | 88         |
| 3.5.4 การเตรียมตัวอย่างชีวสารด้วย SPE                                                           | 90         |
| 3.5.5 การหาประสิทธิภาพของการสกัด                                                                | 100        |
| 3.6 การเปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างชีวสารด้วยการแยกโปรตีนและการสกัดด้วยสารสกัดของเหลวและของแข็ง | 101        |
| 3.7 การสกัดด้วยสารสกัดอื่น ๆ                                                                    | 101        |
| 3.7.1 การสกัดด้วยของเหลวเหนือจุดวิกฤต                                                           | 101        |
| 3.7.2 การสกัดด้วยสารสกัดที่เป็นแอนติบอดี                                                        | 103        |
| 3.7.2.1 กลไกการสกัดด้วยแอนติบอดี                                                                | 103        |
| 3.7.2.2 การเตรียมสารสกัด IAC                                                                    | 105        |
| 3.7.2.3 ขั้นตอนการสกัดด้วย IAC                                                                  | 108        |
| 3.8 การสกัดระดับจุลภาค                                                                          | 111        |
| 3.8.1 การสกัดระดับจุลภาคด้วยเฟสของแข็ง (SPME)                                                   | 111        |
| 3.8.1.1 ประเภทของเฟสของแข็งและการใช้งาน                                                         | 112        |
| 3.8.1.2 หลักการของการสกัดด้วยเทคนิค SPME                                                        | 113        |
| 3.8.1.3 การใช้ SPME ในการเตรียมตัวอย่างชีวสาร                                                   | 116        |
| 3.8.1.4 วิธีการสกัดด้วย SPME                                                                    | 119        |
| 3.8.2 การสกัดระดับจุลภาคด้วยเฟสของเหลว                                                          | 120        |
| 3.8.2.1 หลักการของการสกัดด้วย LPME                                                              | 121        |
| 3.8.2.2 การเตรียมตัวอย่างชีวสารด้วยวิธี LPME                                                    | 124        |
| 3.9 การวิเคราะห์ที่ไม่ต้องเตรียมตัวอย่างชีวสาร                                                  | 126        |
| เอกสารอ้างอิง                                                                                   | 128        |
| <b>4 การวิเคราะห์ตัวอย่างในตัวอย่างชีวสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี</b>                             | <b>135</b> |
| 4.1 พัฒนาการของวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างชีวสาร                                                   | 136        |

|                                                    | หน้า |
|----------------------------------------------------|------|
| 4.2 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC                    | 139  |
| 4.2.1 รูปแบบของเทคนิค HPLC                         | 141  |
| 4.2.2 รากฐานการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC            | 143  |
| 4.3 คอลัมน์ HPLC                                   | 146  |
| 4.3.1 สารที่บรรจุภายในคอลัมน์ HPLC                 | 146  |
| 4.3.1.1 สมบัติทางเคมีของสารบรรจุภายในคอลัมน์       | 146  |
| 4.3.1.2 สมบัติทางกายภาพของสารบรรจุภายในคอลัมน์     | 153  |
| 4.3.2 โครงแบบของคอลัมน์                            | 155  |
| 4.3.3 การเลือกส่วนประกอบของคอลัมน์                 | 158  |
| 4.3.4 การ์ดคอลัมน์                                 | 159  |
| 4.3.5 การใช้งานและการดูแลรักษาคอลัมน์              | 161  |
| 4.3.5.1 การดูแลรักษาคอลัมน์                        | 162  |
| 4.3.5.2 การใช้งานคอลัมน์                           | 162  |
| 4.3.5.3 ประสิทธิภาพคอลัมน์                         | 165  |
| 4.4 เฟสเคลื่อนที่                                  | 169  |
| 4.4.1 เฟสเคลื่อนที่สำหรับ RPLC                     | 170  |
| 4.4.1.1 ส่วนประกอบหลักของเฟสเคลื่อนที่สำหรับ RPLC  | 170  |
| 4.4.1.2 ส่วนประกอบเสริมของเฟสเคลื่อนที่สำหรับ RPLC | 172  |
| 4.4.2 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่สำหรับ RPLC            | 177  |
| 4.5 เครื่องตรวจ                                    | 180  |
| 4.5.1 เครื่องตรวจ UV                               | 180  |
| 4.5.1.1 ประเภทของเครื่องตรวจ UV                    | 182  |
| 4.5.1.2 ข้อจำกัดของการตรวจค่าการดูดกลืนแสงยูวี     | 184  |
| 4.5.2 เครื่องตรวจ FL                               | 186  |
| 4.5.2.1 ข้อพิจารณาในการเลือกใช้เครื่องตรวจ FL      | 188  |
| 4.5.3 เครื่องตรวจ EC                               | 189  |
| 4.5.3.1 รูปแบบของเครื่องตรวจ EC                    | 189  |
| 4.5.3.2 การใช้เครื่องตรวจ EC แบบวัดค่ากระแส        | 190  |

|                                                       | หน้า |
|-------------------------------------------------------|------|
| 4.5.4 เครื่องตรวจยูนิเวอร์แซล                         | 191  |
| 4.5.5 เครื่องตรวจ MS                                  | 191  |
| 4.5.5.1 ลักษณะเฉพาะของการวิเคราะห์ด้วย LC-MS          | 192  |
| 4.6 การกำหนดสภาวะ HPLC                                | 193  |
| 4.6.1 ข้อมูลของสภาวะ HPLC                             | 193  |
| 4.6.1.1 การกำหนดสภาวะ HPLC สำหรับงานวิเคราะห์หนึ่ง ๆ  | 194  |
| 4.6.2 การคัดเลือกเครื่องตรวจ                          | 195  |
| 4.6.2.1 วิธีการตรวจสอบประสิทธิภาพการดูดกลืนแสง        | 195  |
| 4.6.2.2 ข้อพิจารณาในการเลือกชนิดของเครื่องตรวจ        | 196  |
| 4.6.3 กลไกการคงอยู่ของสารสำหรับ RPLC                  | 199  |
| 4.6.4 การคัดเลือกคอลัมน์ HPLC                         | 200  |
| 4.6.5 การกำหนดส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่              | 202  |
| 4.6.5.1 ส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่สำหรับ RPLC            | 202  |
| 4.6.5.2 อัตราเร็วการไหลของเฟสเคลื่อนที่               | 207  |
| 4.6.6 การทดสอบสภาวะ HPLC                              | 208  |
| 4.7 สภาวะ HPLC แบบพิเศษ                               | 211  |
| 4.7.1 การแยกไคแรล                                     | 211  |
| 4.7.1.1 การแยกไคแรลลิตีของยาในตัวอย่างชีวสาร          | 211  |
| 4.7.1.2 หลักในการวิเคราะห์ยาไคแรล                     | 212  |
| 4.7.1.3 การเลือกใช้การแยกไคแรล                        | 214  |
| 4.7.2 โครมาโทกราฟีแบบไมเซลล์ (Micelle chromatography) | 214  |
| 4.7.2.1 สมบัติของสารลดแรงตึงผิวในการใช้กับ MLC        | 214  |
| 4.7.2.2 สภาวะ HPLC สำหรับ MLC                         | 215  |
| 4.8 กระบวนการวิเคราะห์ตัวอย่างในตัวอย่างชีวสาร        | 216  |
| 4.8.1 สภาวะ HPLC ของตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์       | 216  |
| 4.8.2 วิธีการเตรียมตัวอย่างชีวสาร                     | 216  |
| 4.9 การวิเคราะห์ข้อมูล                                | 229  |
| 4.9.1 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ                          | 229  |

|                                                                         | หน้า       |
|-------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.9.2 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ                                            | 229        |
| 4.9.2.1 พื้นที่ภายใต้เส้นกราฟ หรือความสูงพีค                            | 230        |
| 4.9.2.2 วิธีการเทียบมาตรฐาน                                             | 231        |
| 4.9.2.3 รูปแบบของเส้นกราฟเทียบมาตรฐาน                                   | 239        |
| 4.10 การตรวจรับรองวิธีการวิเคราะห์ชีวสาร                                | 245        |
| 4.10.1 ระดับของการตรวจรับรอง                                            | 246        |
| 4.10.2 สารมาตรฐานอ้างอิง                                                | 248        |
| 4.10.3 รายละเอียดของแต่ละพารามิเตอร์ในการตรวจรับรอง                     | 248        |
| 4.10.3.1 ประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่าง                                | 248        |
| 4.10.3.2 สภาพเชิงเส้น                                                   | 250        |
| 4.10.3.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้                       | 251        |
| 4.10.3.4 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์                                     | 253        |
| 4.10.3.5 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์                                     | 255        |
| 4.10.3.6 สภาพจำเพาะ หรือสภาพคัดเลือกของวิธีวิเคราะห์                    | 256        |
| 4.10.3.7 เสถียรภาพของตัวอย่าง                                           | 257        |
| เอกสารอ้างอิง                                                           | 260        |
| <b>5 เทคนิคการวิเคราะห์ตัวอย่างในตัวอย่างชีวสารด้วยหลักการทางอิมมูน</b> | <b>267</b> |
| 5.1 หลักการของเทคนิคอิมมูโนแอสเซย์                                      | 269        |
| 5.1.1 อิมมูโนแอสเซย์แบบมีการแย่งที่                                     | 270        |
| 5.1.2 อิมมูโนแอสเซย์แบบไม่มีการแย่งที่                                  | 270        |
| 5.1.3 อิมมูโนแอสเซย์เป็นเนื้อเดียวกัน และไม่เป็นเนื้อเดียวกัน           | 271        |
| 5.2 แอนติเจน                                                            | 272        |
| 5.2.1 แอนติเจนไม่สมบูรณ์                                                | 272        |
| 5.2.2 แอนติเจนสังยุค                                                    | 273        |
| 5.2.3 เอพิโทป (Epitope)                                                 | 274        |
| 5.2.4 บทบาทแอนติเจนในเทคนิคอิมมูโนแอสเซย์                               | 274        |

|                                                            | หน้า |
|------------------------------------------------------------|------|
| 5.3 แอนติบอดี                                              | 274  |
| 5.3.1 โครงสร้างของอิมมูโนโกลบูลินจี (IgG)                  | 275  |
| 5.3.2 แอนติบอดีที่ใช้ในการวิเคราะห์                        | 276  |
| 5.3.3 การผลิตแอนติบอดีพอลีโคลน (PAb)                       | 277  |
| 5.3.4 การผลิตแอนติบอดีโมโนโคลน (MAb)                       | 283  |
| 5.4 ตัวติดฉลาก (Labels)                                    | 285  |
| 5.4.1 ติดฉลากกัมมันตรังสี                                  | 285  |
| 5.4.2 ติดฉลากเอนไซม์                                       | 287  |
| 5.4.3 ติดฉลากฟลูออเรสเซนต์                                 | 290  |
| 5.4.4 ติดฉลากอนุภาคทองคำ                                   | 292  |
| 5.5 เทคนิคอิมมูโนแอสเซย์สำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างในชีวสาร    | 294  |
| 5.5.1 เทคนิค RIA                                           | 294  |
| 5.5.1.1 การแยกสารกัมมันตรังสีอิสระ                         | 295  |
| 5.5.1.2 วิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RIA                        | 297  |
| 5.5.1.3 เทคนิค RIA เป็นเนื้อเดียวกัน                       | 297  |
| 5.5.2 เทคนิค ELISA                                         | 298  |
| 5.5.2.1 ลักษณะเฉพาะของเทคนิค ELISA                         | 298  |
| 5.5.2.2 รูปแบบพื้นฐานของเทคนิค ELISA                       | 299  |
| 5.5.2.3 วิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA                   | 303  |
| 5.5.3 เทคนิค ELISA ด้วยหลักการเฮเทอโรโลยี                  | 305  |
| 5.5.4 เทคนิคเมมเบรน อิมมูโนแอสเซย์                         | 307  |
| 5.6 การวิเคราะห์ข้อมูล                                     | 309  |
| 5.6.1 การสร้างเส้นกราฟเทียบมาตรฐาน                         | 310  |
| 5.6.2 การคำนวณค่าความเข้มข้นของตัวอย่าง                    | 312  |
| 5.7 การตรวจรับรองวิธีการวิเคราะห์ ด้วยเทคนิคอิมมูโนแอสเซย์ | 312  |
| เอกสารอ้างอิง                                              | 313  |
| คำย่อและสัญลักษณ์                                          | 319  |
| บรรณานุกรม                                                 | 323  |



# 1 บทนำ

- 1.1 ความจำเป็นของการวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสาร
- 1.2 ความแตกต่างของการวิเคราะห์ตัวยาในเมทริกซ์และตัวยาในตัวอย่างชีวสาร
- 1.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสาร

การวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสารเป็นการนำตัวอย่างเลือด หรือปัสสาวะ หรือน้ำลาย หรือเนื้อเยื่อ ฯลฯ มาจากสิ่งมีชีวิตซึ่งอาจเป็นคนหรือสัตว์ เพื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณหรือความเข้มข้นของตัวยาหรือสารเมแทบอไลต์ที่เกิดจากยา ด้วยเทคนิคและกระบวนการของการวิเคราะห์ที่ได้รับการตรวจรับรองว่า สามารถวิเคราะห์ตัวยานั้นๆ ได้อย่างถูกต้อง ผลลัพธ์จากการวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสาร คือ ข้อมูลของค่าความเข้มข้นของตัวยา และ/หรือเมแทบอไลต์ของตัวยาในตัวอย่างนั้นๆ ณ เวลาที่เก็บตัวอย่างมา

## 1.1 ความจำเป็นของการวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสาร

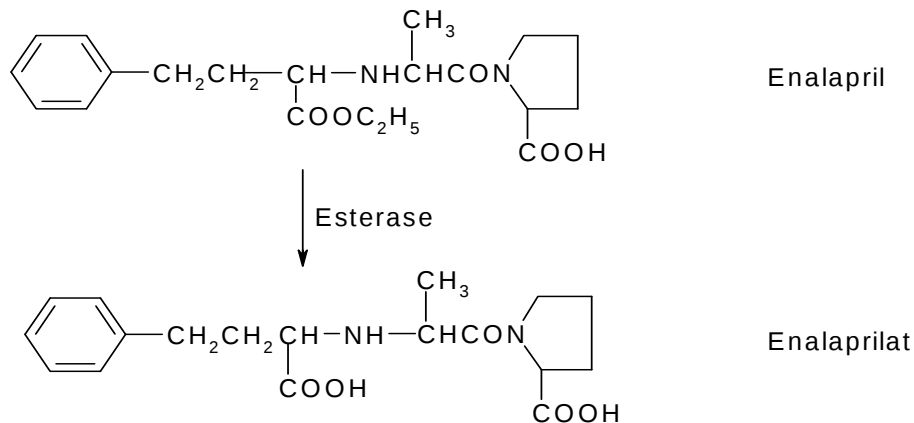
การวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสาร มีความจำเป็นในกระบวนการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องระหว่างยากับสิ่งมีชีวิต ยกตัวอย่างเช่น การวิจัยพัฒนายาใหม่ (New Drug Research and Development, R&D) การศึกษาชีวสมมูล (Bioequivalence study, BE) การตรวจติดตามระดับยา (Therapeutic Drug Monitoring, TDM) การตรวจพิสูจน์ด้านพิษวิทยา นิติเวช การใช้ยาเกินขนาด การใช้ในทางที่ผิด (Drug abuse)

### การวิจัยพัฒนายาใหม่ (R&D)

ในกระบวนการของการวิจัยเพื่อการพัฒนาใหม่จากสารเคมีหรือสารชีวเคมีที่มีการทดสอบพบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจหรือเป็นที่ต้องการ ก่อนที่จะตัดสินใจว่า ควรพัฒนาสารนี้เป็นยาหรือไม่? ในรูปแบบเมทริกซ์แบบใด? จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการหา

ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics) และหาอัตราสารเข้าระบบชีวภาพ (Bioavailability) ของสารนี้ในสิ่งมีชีวิต ซึ่งมักใช้สัตว์ทดลอง และจำเป็นต้องทำการวิเคราะห์สารที่ศึกษาในตัวอย่างเลือดหรือพลาสมาที่เก็บวิเคราะห์ที่เวลาต่าง ๆ หลังจากสัตว์ทดลองได้รับสารนี้เข้าสู่ร่างกายทั้งทางหลอดเลือดและทางหลอดอาหาร เพื่อให้ได้คำตอบสำคัญของสารที่ศึกษานี้ว่า ควรพัฒนาสารที่ศึกษาไปเป็นยาในสูตรโครงสร้างเดิม หรือควรมีการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้าง หรือควรพัฒนาต่อไปเพื่อเป็นยาสำหรับรับประทานได้หรือไม่

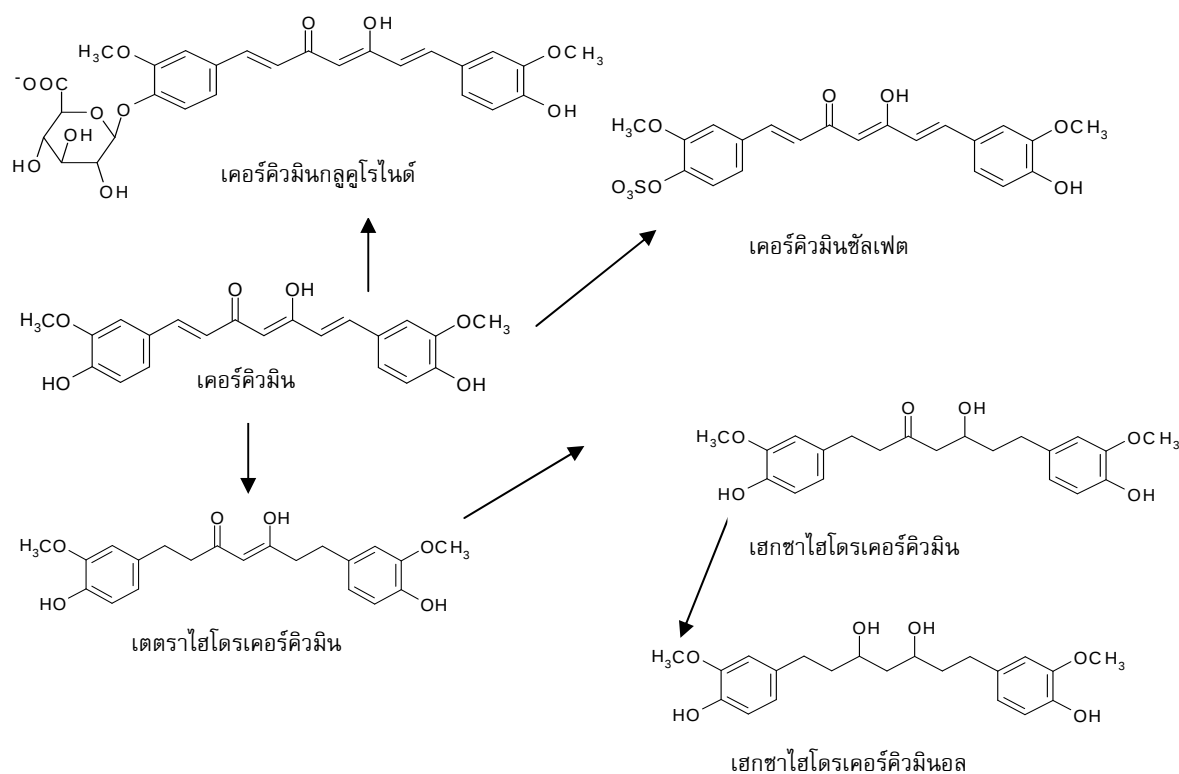
ยกตัวอย่างเช่น enalaprilat เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการลดความดันโลหิต จากการวิเคราะห์ enalaprilat ในตัวอย่างเลือด พบว่ามีการดูดซึมในทางเดินอาหารไม่ดี จึงได้มีการดัดแปรสูตรโครงสร้างจาก enalaprilat เป็น enalapril เพื่อให้ผลิตเป็นยาสำหรับรับประทานได้ โดย enalapril หลังการรับประทานจะถูกเปลี่ยนเป็น enalaprilat ในร่างกาย ดังแสดงในรูปที่ 1-1<sup>1-2</sup>



**รูปที่ 1-1** การเปลี่ยนแปลงของ Enalapril ในร่างกายไปเป็น Enalaprilat

อีกตัวอย่างที่น่าสนใจและเป็นประโยชน์อย่างมาก จากการที่วิเคราะห์หาปริมาณของสารสำคัญจากตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ หรือของเหลวอื่น ๆ จากสิ่งมีชีวิต ได้แก่ การพยายามพัฒนาสารเคอร์คิวมิน (curcumin) เพื่อใช้รับประทาน สารเคอร์คิวมินเป็นสารสกัดที่ได้จากสมุนไพรขมิ้นชัน จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดที่ได้จากการศึกษาทดลองในหนู พบว่าสารเคอร์คิวมินเมื่อเข้าสู่ทางเดินอาหารจะถูกเอนไซม์ในร่างกายเปลี่ยนสารเคอร์คิวมินไปเป็นสารเมแทบอลิต์อีกหลายตัว มีเตตราไฮโดรเคอร์คิวมิน (tetrahydrocurcumin, THC) เคอร์คิวมินกลูคูโรไนด์ (curcumin glucuronide) เป็นต้น (รูปที่ 1-2)<sup>3</sup> และวิเคราะห์พบสารเคอร์คิวมินใน

กระแสเลือดในระดับที่ต่ำมาก ผลประโยชน์จากการวิเคราะห์นี้จึงช่วยให้เกิดการพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเคอร์คิวมินกับฟอสโฟลิพิด ซึ่งช่วยให้อัตราสารเข้าระบบชีวภาพของเคอร์คิวมินเพิ่มมากขึ้นเป็นเท่าตัว<sup>4</sup>



รูปที่ 1-2 การเปลี่ยนแปลงของเคอร์คิวมินในหนู

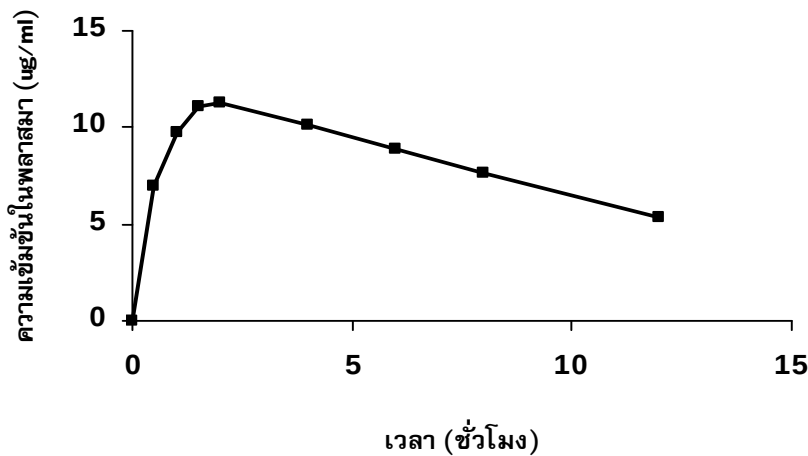
### การศึกษาชีวสมมูล (BE)

ในการเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์อย่างน้อยสองผลิตภัณฑ์ว่ามีความเท่าเทียมกันหรือไม่ ในด้านการที่ตัวยาในผลิตภัณฑ์ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิต ทั้งด้านอัตราเร็วของการดูดซึมและปริมาณยาที่ถูกดูดซึม หัวใจสำคัญของการได้มาซึ่งคำตอบข้างต้น คือ การที่ต้องทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด/พลาสมา หรือปัสสาวะ ที่เก็บจากอาสาสมัครที่ได้รับผลิตภัณฑ์ต้นแบบและผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นของตัวยาที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างชีวสาร จึงจะนำไปคำนวณเพื่อตอบการมีชีวสมมูลระหว่างสารเปรียบเทียบกับสารต้นแบบ ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาชีวสมมูลของยา gemfibrosil<sup>5</sup> ที่ผลิตในประเทศ เทียบกับยาต้นแบบจากบริษัทที่

เป็นผู้คิดค้นตัวยานี้ จำเป็นต้องทำการศึกษาพัฒนาให้ได้มาซึ่งวิธีการวิเคราะห์ตัวยานี้ในพลาสมาของคน จึงจะทำการศึกษาชีวสมมูลได้

### การตรวจติดตามระดับยา (TDM)

เป็นอีกบทบาทที่จำเป็นต้องสามารถตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างชีวสารที่เก็บมาจากผู้ป่วย เพื่อให้รู้ถึงระดับของตัวยานั้น ๆ ในผู้ป่วย สำหรับการคำนวณปรับขนาดของตัวยานั้นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมในการออกฤทธิ์ในผู้ป่วย ยกตัวอย่าง เช่น การตรวจติดตามระดับยา theophylline<sup>6</sup> ในผู้ป่วยโรคหอบหืด ให้มีความเข้มข้นของตัวยานี้ในกระแสเลือดระหว่าง 10–20 µg/ml (รูปที่ 1-3)



รูปที่ 1-3 ระดับความเข้มข้นของ Theophylline ในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ

การทำ TDM นี้ถือเป็นสิ่งสำคัญมาก สำหรับยาที่มีขอบเขตของความเข้มข้นของตัวยานี้ในกระแสโลหิตที่จำกัดในการทำให้เกิดผลต่อการรักษา เพราะผู้ป่วยแต่ละคนมีความแตกต่างกัน การใช้ขนาดเดียวกันอาจให้ผลการรักษาที่แตกต่างกันได้ ในประเทศที่พัฒนาแล้วทั้งหลายตระหนักความสำคัญของ TDM และจัดเข้าเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการรักษาผู้ป่วย ตัวอย่างยาในรายการที่จำเป็นต้องมีการตรวจติดตามระดับยา (TDM) ดังตารางที่ 1-1 ซึ่งให้เห็นความจำเป็นของการใช้วิธีวิเคราะห์ตัวยานี้ในตัวอย่างชีวสารสำหรับการทำ TDM เพื่อช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย

**ตารางที่ 1-1** ตัวอย่างรายการยาที่จำเป็นต้องทำ TDM<sup>7</sup>

| ชื่อยา        | สรรพคุณในการรักษา | ช่วงความเข้มข้นยาที่มีผล<br>ทางการรักษา (µg/mL) |
|---------------|-------------------|-------------------------------------------------|
| Carbamazepine | โรคลมชัก          | 3–12                                            |
| *Digoxin      | โรคหัวใจ          | 0.5–2                                           |
| Phenytoin     | โรคลมชัก          | 10–30                                           |
| Theophylline  | โรคหอบหืด         | 10–20                                           |
| Procainamide  | โรคหัวใจ          | 4–8                                             |

\*หน่วยความเข้มข้นเป็น ng/mL

นอกจากความสำคัญต่างๆ ของการที่ต้องตรวจวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาในตัวอย่างชีวสาร ดังได้กล่าวมาข้างต้นแล้ว การวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสารยังมีความจำเป็นอย่างมากในการรักษากลุ่มผู้ใช้ยาในทางที่ผิด (Drug abuse) เช่น ผู้ติดหรือเสพยาอื่น ยาบ้า ผู้ใช้ยาเกินขนาด ผู้ที่เกิดอาการพิษจากการใช้ยา หรือแม้แต่เสียชีวิตจากการใช้ยาซึ่งต้องตรวจทางนิติเวช คำตอบของชนิด ปริมาณ และช่วงระยะเวลาของการใช้ยาหรือสารในทางที่ผิดเหล่านี้ล้วนต้องได้มาจากการนำตัวอย่างจากผู้ใช้ ผู้เสพ หรือแม้กระทั่งศพของผู้เสียชีวิตมาทำการตรวจวิเคราะห์ทั้งสิ้น เช่น การตรวจปัสสาวะของผู้เสพยาบ้า<sup>8</sup> การตรวจอูรีนในปัสสาวะนักกีฬา<sup>9</sup>

จากที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ ย่อมเป็นที่ตระหนักแล้วว่า การวิเคราะห์ตัวยา/สารต่างๆ ในตัวอย่างชีวสาร เข้าไปมีบทบาทสำคัญต่อการหาคำตอบในด้านต่างๆ มากมาย จึงทำให้เกิดศาสตร์เฉพาะขึ้นอีกสาขาหนึ่ง คือ ด้านการวิเคราะห์ตัวยา/สารในตัวอย่างชีวสาร เรียกเป็นชีวเวชวิเคราะห์ (Biomedical Analysis) และเรียกนักวิเคราะห์สาขานี้ว่า นักชีวเวชวิเคราะห์

## 1.2 ความแตกต่างของการวิเคราะห์ตัวยาในเภสัชภัณฑ์ และตัวยาในตัวอย่างชีวสาร

ตัวยาในเภสัชภัณฑ์ หมายถึง ตัวยาในรูปแบบที่พร้อมใช้ เช่น ยาเม็ด paracetamol ขนาด 500 mg ต่อเม็ด พร้อมรับประทานแก้ปวด หรือยาเม็ด nifedipine ขนาด 10 mg ต่อเม็ด พร้อม

รับประทานลดความดันโลหิต ด้วยยาในตัวอย่างชีวสาร เช่น ด้วยยา paracetamol หรือ nifedipine ในตัวอย่างเลือด/พลาสมา หรือปัสสาวะ ภายหลังจากร่างกายได้รับยาเข้าไปแล้ว

การที่จะวิเคราะห์ด้วยยาในเภสัชภัณฑ์หรือในตัวอย่างชีวสาร แม้เป็นยาเดียวกัน เช่น การวิเคราะห์ paracetamol ในยาเม็ด กับในตัวอย่างเลือดหรือพลาสมา มีความแตกต่างกันในสองหัวข้อการวิเคราะห์ ได้แก่ ความแตกต่างด้านสภาพไว (sensitivity) และด้านสภาพจำเพาะ (specificity) ของวิธีวิเคราะห์ดังนี้

### สภาพไวของการวิเคราะห์

สภาพไวของการวิเคราะห์แสดงได้ด้วยปริมาณหรือความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารที่ยังสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ ในที่นี้ลองเปรียบเทียบระหว่างการวิเคราะห์ยาเม็ด paracetamol ซึ่ง 1 เม็ดมีด้วยยา paracetamol มากถึง 500 mg กับการวิเคราะห์ paracetamol ในพลาสมาคนปกติเมื่อกินยาเม็ด paracetamol เข้าไป จนยาถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิต จะมีความเข้มข้นของ paracetamol มากที่สุดเพียงประมาณ 20 µg/mL ของพลาสมา ดังนั้น วิธีวิเคราะห์ที่ใช้วิเคราะห์ยาเม็ด paracetamol อาจไม่ต้องการมีความไวมากนักก็สามารถวิเคราะห์ได้ แต่หากวิเคราะห์ paracetamol ในพลาสมา ซึ่งมีปริมาณของตัวยาต่างจากในยาเม็ดถึง 25 เท่า จำเป็นต้องใช้เครื่องมือและวิธีวิเคราะห์ที่มีความไวของการวิเคราะห์มากกว่าการวิเคราะห์ด้วยยา paracetamol ในยาเม็ด จึงจะสามารถวิเคราะห์ด้วยยา paracetamol ในพลาสมาได้ ยิ่งถ้าเป็นยา nifedipine ซึ่ง 1 เม็ด มีด้วยยา nifedipine 10 mg การวิเคราะห์ด้วยยา nifedipine ในยาเม็ดสามารถนำยามาได้มากถึง 20 เม็ด เพื่อให้วิเคราะห์ได้ ขณะเดียวกัน nifedipine ในพลาสมาของคนที่ได้รับประทานยาเม็ด nifedipine เข้าไป มีความเข้มข้นสูงสุดเพียงประมาณ 0.1 µg/mL ของพลาสมา วิธีวิเคราะห์ที่นำมาใช้ยังต้องมีความไวของการวิเคราะห์มากกว่าการวิเคราะห์ยาเม็ด nifedipine เป็นหมื่นเป็นแสนเท่า

### สภาพจำเพาะของการวิเคราะห์

สภาพจำเพาะของการวิเคราะห์เป็นความสามารถของวิธีวิเคราะห์ ในการที่จะแยกความแตกต่างของตัวยาที่วิเคราะห์กับสิ่งอื่นๆที่มีอยู่ในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ในยาเม็ดนอกจากประกอบด้วยตัวยาแล้วยังมักต้องมีส่วนประกอบอื่น ๆ เช่น สารช่วยการแตกตัว แป้ง ฯลฯ ส่วนประกอบเหล่านี้ทางผู้ผลิตหรือเจ้าของตำรับยานั้นย่อมรู้ปริมาณและชนิดของสารเหล่านี้ ในการวิเคราะห์ยาเม็ดจึงมักสามารถใช้วิธีที่เหมาะสม เช่น ใช้ตัวทำละลายในการละลายตัวยาออกมาและนำไปวิเคราะห์ได้ แต่หากเป็นตัวอย่างชีวสาร เป็นที่ทราบกันว่าสิ่งมีชีวิตมักมีส่วนประกอบที่สลับซับซ้อนและแตกต่างกันในแต่ละคนหรือสัตว์แต่ละตัว การวิเคราะห์ด้วย

ในตัวอย่างเลือด หรือพลาสมา หรือปัสสาวะ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีวิธีวิเคราะห์ที่เลือกวิเคราะห์เฉพาะตัวยาโดยไม่ถูกรบกวนด้วยสิ่งอื่น ๆ ในตัวอย่าง ดังนั้น ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์จึงสำคัญมากสำหรับการวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสารต่าง ๆ

**ตารางที่ 1-2** เปรียบเทียบปริมาณยาในเภสัชภัณฑ์ และระดับความเข้มข้นสูงสุดของยาในคนไทย<sup>5, 10-14</sup>

| ชื่อยา        | ปริมาณยาในเภสัชภัณฑ์<br>(mg/tab) | ระดับยาสูงสุดในพลาสมา<br>(µg/mL) |
|---------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Gemfibrozil   | 600                              | 24–25                            |
| Theophylline  | 300                              | 10–12                            |
| Nifedipine    | 10                               | 0.14–0.16                        |
| *Enalapril    | 10                               | 0.035                            |
| Imipramine    | 50                               | 0.2                              |
| Amitriptyline | 50                               | 0.12                             |

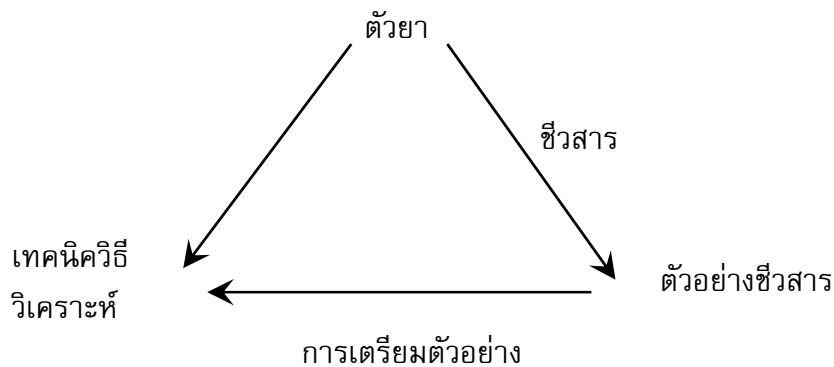
\*ระดับความเข้มข้นของ Enalaprilat (ดูรูปที่ 1-1)

จากตัวอย่างที่กล่าวมาข้างต้นนี้พอจะทำให้เห็นได้ว่า เทคนิควิธีวิเคราะห์ที่ใช้วิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสาร กับที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวยาในเภสัชภัณฑ์ ต้องมีความแตกต่างกัน การวิเคราะห์ตัวยาและ/หรือสารเมแทบอไลต์ของตัวยาในตัวอย่างชีวสาร จำเป็นต้องมีลำดับขั้นตอน เพื่อให้ได้คำตอบของการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง น่าเชื่อถือ และนำผลการวิเคราะห์ไปใช้ได้

### 1.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสาร

การวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสารเป็นการประสานความรู้เข้าด้วยกันสี่ส่วน คือ ความรู้เกี่ยวกับตัวยาที่ต้องการวิเคราะห์ ความรู้เกี่ยวกับชีวสารที่นำมาเป็นตัวอย่าง ความรู้ถึงหลักการแยกสารในการจัดการกับตัวอย่างชีวสารที่มีตัวยา เพื่อเตรียมพร้อมกับการนำไปใช้วิเคราะห์ และความรู้ด้านเทคนิควิธีการวิเคราะห์ที่คัดเลือกไว้ ทั้งสี่ส่วนนี้เชื่อมโยงเกี่ยวพันกัน ดังแสดงในแผนภาพ

การประสานส่วนต่าง ๆ เหล่านี้เข้าด้วยกัน ต้องอาศัยพื้นฐานของศาสตร์หลายด้านด้วยกัน ทั้งเคมี เคมีคลินิก เคมีวิเคราะห์ ชีวเคมี สรีรวิทยา เภสัชจลนศาสตร์ ทั้งนี้ สามารถกำหนดเป็นลำดับขั้นตอนของการวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสารได้ดังต่อไปนี้



1. วางแผนการวิเคราะห์ โดยดูจากสมบัติของตัวอย่างและ/หรือเมแทบอลิต์ที่ต้องวิเคราะห์ สมบัติของตัวอย่างชีวสารที่ต้องใช้ เพื่อคัดเลือกวิธีการเตรียมตัวอย่างและเทคนิควิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม โดยคำนึงถึงวัตถุประสงค์ของการนำข้อมูลจากการวิเคราะห์ไปใช้

2. ทดลองวิเคราะห์สารมาตรฐานของตัวอย่างและเมแทบอลิต์ ด้วยเทคนิควิธีวิเคราะห์ที่คัดเลือกไว้ โดยเทคนิควิธีวิเคราะห์ที่ใช้ต้องสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างถูกต้องภายในเวลาที่เหมาะสม

3. เตรียมตัวอย่างชีวสารให้พร้อมสำหรับนำไปวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 2 ได้อย่างถูกต้อง

4. ตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ (Bio-analytical method validation)

5. ทดสอบการใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กับตัวอย่างชีวสารจริงที่ได้มาจากการศึกษาในคนหรือสัตว์

ลำดับขั้นตอนที่กล่าวทั้งหมดนี้ได้นำมาใช้ในการเรียบเรียงแบ่งเป็นบท ๆ โดยเริ่มจากบทที่ 2 จากส่วนยอดของแผนภาพ คือ ส่วนของข้อมูลของตัวอย่างของชีวสาร มาสู่การเป็นตัวอย่างชีวสาร ก่อนเข้าสู่บทที่ 3 ซึ่งครอบคลุมการเตรียมตัวอย่างชีวสาร เพื่อให้พร้อมนำไปวิเคราะห์ต่อไปในบทที่ 4 และบทที่ 5 ซึ่งว่าด้วยวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่างชีวสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีและด้วยเทคนิคอิมมูโนแอสเซย์ ตามลำดับ ซึ่งนอกจากผู้อ่านจะสามารถนำไปใช้ปฏิบัติได้จริงยังเป็นแนวทางในการคิดค้นพัฒนา หรือดัดแปร ปรับปรุง แกไขวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างและ/หรือเมแทบอลิต์ในชีวสารต่าง ๆ ได้

## เอกสารอ้างอิง

1. Daries RO, Irvin JD, Kramsch DK, Walker JF, and Moncloa F. *Am. J. Med.* 1987; 77: 23.
2. Ulm EH. Enalapril maleate (MK-421). *Drug Metab. Rev.* 1983; 14(1): 99.
3. Asai A, Miyazawa T. *Life Sci.* 2000; 67(23): 2785.
4. Liu A, Lou H, Zhao L, Fan P. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006; 40:720.
5. Thongnopnua P, Wittayalertpunya S, Rodragkwan C and Chompootaweep S. *Analytical method development for serum gemfibrozil determination by high-performance liquid chromatography.* Proceeding for the 14<sup>th</sup> Annual research meeting in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand; 3 December, 1997; 15.
6. Thongnopnua P, Ampassavate C and Karnjanaves K. *Srinakharinwirot J. Pharm. Sci.* 2001; 6(1): 14.
7. Sadee W, Beelen GCM. *Drug Level Monitoring: Analytical technique, Metabolism and Pharmacokinotics.* Canada: John Wiley & Sons, 1980.
8. Matapatara W, Thongnopnua P, Lipipun V. *Asian Biomed.* 2007; 1(2): 167.
9. Thongnopnua P, Sirikatitham A. *Ephedrine analytical method development through immunoassay.* E-proceeding of 20<sup>th</sup> FAPA Congress 2004, Thailand; 30 November-3 December, 2004.
10. Thongnopnua P. *Pharmacokinetics of theophylline in Thais.* Proceeding Research conference 80<sup>th</sup> anniversary of Chulalongkorn University, 15-17 October 1997; 669.
11. Thongnopnua P, Viwatwongsa K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1994; 12(1): 119.
12. Thongnopnua P, Poeknapo C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005; 37: 763.
13. Karnjanaves K, Thongnopnua P. *Thai J. Pharm. Sci.* 2003; 27 (Suppl.): 53.
14. Thongnopnua P, Karnjanaves K. *Thai J. Pharm. Sci.* 2006; 30 (Suppl.): 101.



## 2 ข้อมูลของตัวยาและชีวสารเพื่อการวิเคราะห์

### 2.1 ข้อมูลของตัวยาเพื่อการวิเคราะห์

#### 2.2 ชีวสาร

ข้อมูลของทั้งตัวยาและชีวสารที่จะวิเคราะห์ มีความสำคัญต่อการวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสาร ในการช่วยกำหนดวิธีการเตรียมตัวอย่างชีวสารและคัดเลือกเทคนิควิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสม การเข้าถึงข้อมูลที่จำเป็นและเข้าใจความหมายของข้อมูลที่ได้ ตลอดจนรู้จักนำมาใช้เพื่อประโยชน์การวิเคราะห์ เป็นสาระสำคัญของบทนี้

### 2.1 ข้อมูลของตัวยาเพื่อการวิเคราะห์

เมื่อต้องวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสาร ข้อมูลที่ต้องมีเกี่ยวกับตัวยาที่ต้องวิเคราะห์ แบ่งเป็นข้อมูลของตัวยาเมื่ออยู่นอกร่างกายและข้อมูลของตัวยานั้นเมื่ออยู่ในร่างกายสิ่งมีชีวิต

#### 2.1.1 ข้อมูลของตัวยาเมื่ออยู่นอกร่างกาย

ข้อมูลของตัวยาเมื่ออยู่นอกร่างกายประกอบด้วยข้อมูลเฉพาะของตัวยานั้น ข้อมูลของตัวยาเมื่อถูกผลิตในรูปแบบเภสัชภัณฑ์ และข้อมูลตัวยาเมื่ออยู่ในตัวอย่างชีวสารที่ได้รับมาหลังจากการให้ยาเข้าสู่ร่างกายสิ่งมีชีวิต

#### ข้อมูลเฉพาะของตัวยา

ข้อมูลเฉพาะของตัวยาเป็นข้อมูลรายละเอียดเบื้องต้นของตัวยานั้น ๆ ซึ่งถ้าเป็นยาที่ค่อนข้างใหม่ อาจต้องสืบค้นจากเอกสารของบริษัทที่เป็นผู้ผลิตยานั้น แต่ถ้าเป็นยาที่เป็นที่รู้จัก

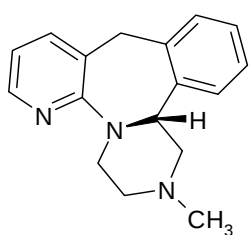
หรือผลิตรอกจำหน่ายแล้ว สามารถสืบค้นข้อมูลของตัวยานั้นได้จากเอกสารกำกับยา หรือเอกสารอ้างอิงต่าง ๆ<sup>1-3</sup> ข้อมูลเฉพาะของตัวยาที่ควรรู้ ได้แก่

### • ที่มาของตัวยา

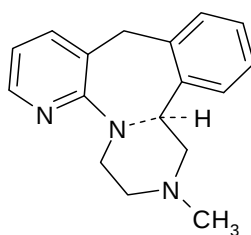
การได้มาซึ่งตัวยาหนึ่ง ๆ มีที่มาที่แตกต่างกัน การมีข้อมูลถึงที่มาของตัวยาที่ต้องการวิเคราะห์ ทำให้รู้สมบัติเบื้องต้นในการกำหนดวิธีวิเคราะห์ได้ ถึงแม้ว่าตัวยาส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาทางเคมี แต่ก็ยังมีที่เป็นสารเคมีกึ่งสังเคราะห์ เช่น วิตามินอี (d- $\alpha$ -tocopherol acetate) หรือเป็นสารจากธรรมชาติโดยตรง เช่น สารสกัดขมิ้นชัน นอกจากนี้ยังมีสารประกอบโปรตีนที่นำมาเป็นยา เช่น อินซูลิน (insulin) หรือสารชีวเคมีกึ่งสังเคราะห์ เช่น ยาเพปไทด์ (peptide drug)

### • สูตรโครงสร้าง และน้ำหนักมวลต่อโมเลกุล

การได้เห็นสูตรโครงสร้างและรู้น้ำหนักมวลโมเลกุลของทั้งตัวยาและเมแทบอลิต์ เป็นข้อมูลที่เชื่อมโยงกับที่มาของตัวยา ทำให้รู้ถึงส่วนของโครงสร้างที่แสดงสมบัติเฉพาะต่าง ๆ เช่น สูตรโครงสร้างที่แสดงส่วนกำเนิดสีควบคู่ (conjugated chromophores) ช่วยบ่งบอกสมบัติการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (ultra-violet, UV)<sup>4</sup> หรือตัวยาที่สูตรโครงสร้างมีศูนย์กลางไครเรล (chiral center) เป็นข้อมูลที่ทำให้รู้การจัดตัวของโครงสร้างของตัวยานั้นว่า สามารถมีสูตรโครงสร้างได้มากกว่าหนึ่งรูปแบบเป็นเอแนนทิโอเมอร์ (enantiomer) ที่แตกต่างกันเพียงสมบัติการบิดลำแสงโพลาไรส์ (turn plane polarized light) แต่ก็มีมีความแตกต่างของฤทธิ์หรือพิษ รวมทั้งเภสัชจลนศาสตร์ของยาในร่างกาย ยกตัวอย่างเช่น ยา mirtazapine ซึ่งเป็นยารักษาโรคซึมเศร้า มีศูนย์กลางไครเรลที่ทำให้สามารถมีรูปแบบโครงสร้างเป็น (+)-(S) และ (-)-(R)-mirtazapine (รูปที่ 2-1) ทั้งสองรูปแบบมีความแตกต่างกันในการจับกับตัวรับ (receptor) และในการเกิดเมแทบอลิซึม<sup>5</sup> นอกจากนี้ การแสดงหมู่ฟังก์ชันและน้ำหนักมวลโมเลกุลยังช่วยคาดคะเนการเป็นสารแสปแทนหรือเป็นอิมมูโนเจน ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางอิมมูโน<sup>6</sup>



(-)-(R)-mirtazapine



(+)-(S)-mirtazapine

รูปที่ 2-1 โครงสร้างทางเคมี  
ของ Mirtazapine enantiomers

### • สมบัติทางเคมี สมบัติทางฟิสิกส์

ข้อมูลของสมบัติทางเคมี สมบัติทางฟิสิกส์ของตัวยาที่ต้องการวิเคราะห์ ถือเป็นข้อมูลสำคัญที่เป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์ เช่น สมบัติความเป็นกรด-เบส การละลายของตัวยาในตัวทำละลายต่าง ๆ การดูดกลืนแสง จุดหลอมเหลวหรือจุดเดือด

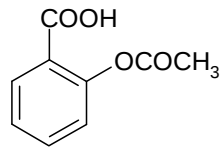
### ข้อมูลของตัวยาในรูปเภสัชภัณฑ์

แม้เป็นการวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสาร นักวิเคราะห์ต้องรับรู้ข้อมูลของตัวยาว่าตัวยาในตัวอย่างชีวสารนั้นได้จากการให้ยาด้วยทางใด เช่น ด้วยการรับประทานหรือฉีดเข้าหลอดเลือด หรือโดยการเหน็บ ฯลฯ อยู่ในรูปแบบเภสัชภัณฑ์อะไร เช่น เป็นยาเม็ด ยาเม็ดเคลือบฟิล์ม แคปซูล หรือยาน้ำ เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีตัวยาเดียวในเภสัชภัณฑ์หรือร่วมกับตัวยาอื่น ๆ ต้องใช้ขนาดยา (dose) ในการศึกษาเพื่อการเก็บตัวอย่างชีวสารจำนวนเท่าใด ตัวยาในเภสัชภัณฑ์กับตัวยาที่ออกฤทธิ์เป็นตัวย่อยกันหรือไม่ เมแทบอลิต์มีฤทธิ์ในการรักษาหรือไม่ หากทั้งตัวยาและเมแทบอลิต์มีผลในการรักษา ต้องมีข้อมูลของทั้งตัวยาและสารเมแทบอลิต์ เพราะต้องทำการวิเคราะห์ทั้งตัวยาและเมแทบอลิต์ เช่น pentoxifylline มี hydroxyl pentoxifylline เป็นเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ด้วย จำเป็นต้องมีข้อมูลของทั้งสองตัวเพื่อใช้ในการกำหนดการวิเคราะห์

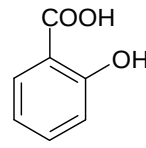
### ข้อมูลของตัวยาในตัวอย่างชีวสาร

ชีวสารที่นำมาเป็นตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ เช่น พลาสมา น้ำลาย ปัสสาวะ ฯลฯ มีสมบัติเฉพาะของแต่ละชีวสาร ซึ่งอาจไปมีผลต่อตัวยาบางชนิดในตัวอย่างชีวสารได้ ควรมีข้อมูลของตัวยาในชีวสารก่อนการวิเคราะห์โดยเฉพาะหากตัวอย่างชีวสารเป็นเลือดหรือพลาสมาหรือซีรัม เพราะในเลือดมีเอนไซม์เอสเตอเรส (esterase) ซึ่งหากตัวยามีหมู่เอสเตอร์ในสูตรโครงสร้าง อาจถูกเอนไซม์เอสเตอเรสเปลี่ยนแปลงขณะเก็บในหลอดทดลองได้ ตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดกับตัวอย่างพลาสมาที่เก็บจากการรับประทานยาเม็ด aspirin (acetyl salicylic acid)<sup>7-8</sup> โดยหากไม่เติมโซเดียมฟลูออไรด์ลงไปในหลอดที่ใช้เก็บตัวอย่างพลาสมา ตัวยา aspirin ในพลาสมาจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ไปเป็นกรดซาลิไซลิก ทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ผิดไปจากความเป็นจริงได้ erythromycin propionate<sup>9</sup> และ cocaine<sup>10</sup> ก็เป็นตัวยาที่มีปัญหาดังกล่าวเช่นกัน ซึ่งป้องกันด้วยการเก็บตัวอย่างพลาสมาในหลอดที่มีสารโซเดียมฟลูออไรด์เช่นเดียวกับ aspirin หรือในตัวยา etretinate ซึ่งไวต่อการเกิดออกซิเดชัน จำเป็นต้องเก็บตัวอย่างเลือดที่มีตัวยา etretinate ในภาชนะที่เติมสาร BHT (butylated hydroxytoluene)<sup>11-12</sup>

เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชันของตัวยาในตัวอย่างชีวสาร หรือหากเป็นตัวยาในปัสสาวะ ซึ่งความเป็นกรด-เบสของปัสสาวะอาจมีผลต่อความคงตัวของตัวยาหรือเมแทบอลิต์ที่ถูกขับออกมาในปัสสาวะได้ ก็ต้องมีการปรับ pH ของปัสสาวะก่อนการเก็บ



Aspirin  
(Acetyl salicylic acid)



Salicylic acid

ข้อมูลของตัวยาในตัวอย่างชีวสารมีความสำคัญอย่างมากต่อการวิเคราะห์ ต้องตระหนักไว้เสมอว่า **สภาพของตัวยา หรือสารเมแทบอลิต์ในตัวอย่างชีวสารที่ต้องการวิเคราะห์ ต้องอยู่ในสภาพเช่นเดียวกับเมื่ออยู่ในร่างกาย ณ เวลาที่เก็บตัวอย่างชีวสารจากสิ่งมีชีวิต** ทั้งนี้ เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องตามความเป็นจริง

### 2.1.2 ข้อมูลของตัวยาเมื่ออยู่ในร่างกายสิ่งมีชีวิต

ตัวยาในรูปแบบสัณฐานหรือในรูปแบบที่เตรียมเพื่อการศึกษาวิจัย เมื่อถูกนำเข้าสู่ร่างกายสัตว์หรือคน ข้อมูลของตัวยาที่ควรรู้เพื่อการวิเคราะห์ คือ กระบวนการเปลี่ยนแปลงของตัวยานั้นในร่างกายสิ่งมีชีวิต ตั้งแต่การที่ตัวยาถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิต การเกิดการเปลี่ยนแปลงของตัวยา เช่น การเกิดเมแทบอลิซึม โดยเฉพาะการเกิดเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ในการรักษา การกระจายของตัวยาในร่างกาย ตลอดจนการที่ตัวยาถูกกำจัดออกจากร่างกาย ข้อมูลเหล่านี้เป็นข้อมูลเภสัชจลนศาสตร์ของตัวยาและ/หรือเมแทบอลิต์ของตัวยานั้น ซึ่งแสดงด้วยค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของตัวยาวิเคราะห์ที่ควรรู้ ได้แก่

#### ค่าระดับยาสูงสุดในร่างกาย (Maximum drug concentration, $C_{max}$ )

ค่าระดับยาสูงสุดในร่างกายเป็นค่าความเข้มข้นสูงสุดของตัวยาที่ศึกษา เมื่อให้เข้าสู่ร่างกายสิ่งมีชีวิต โดยถ้าให้เภสัชภัณฑ์ด้วยการรับประทาน เวลาที่ตรวจพบระดับยาสูงสุด ( $t_{max}$ ) อาจเร็วหรือช้าขึ้นกับการดูดซึมของตัวยาเข้าสู่กระแสโลหิต แต่หากฉีดเภสัชภัณฑ์เข้าหลอดเลือดจะปรากฏค่าความเข้มข้นสูงสุดของตัวยา ( $C_{max}$ ) ทันทีที่ตัวยาเข้าสู่กระแสโลหิต ทั้งค่า  $t_{max}$

และ  $C_{max}$  ของตัวยาที่ต้องวิเคราะห์ มีประโยชน์ในการช่วยกำหนดช่วงความเข้มข้นของตัวยาในตัวอย่างชีวสารที่วิเคราะห์และช่วงความถี่ห่างของการเก็บตัวอย่าง

### ค่าครึ่งชีวิตในการกำจัดออกของตัวยาในร่างกาย (Elimination half-life, $t_{1/2}$ )

ค่าครึ่งชีวิตเป็นค่าที่บ่งบอกระยะเวลาที่ระดับตัวยาในกระแสโลหิตลดลงไปครึ่งหนึ่ง หรือร้อยละ 50 ของปริมาณทั้งหมดที่เข้าสู่กระแสโลหิต เนื่องจากถูกกำจัดออกจากร่างกาย ค่า  $t_{1/2}$  นี้ มีประโยชน์ในการช่วยกำหนดระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างชีวสารเพื่อการวิเคราะห์ โดยเฉพาะในการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ หรือการศึกษาชีวสมมูลของตัวยา

### ค่าปรากฏปริมาตรการกระจายตัวของตัวยา (Apparent volume of distribution, $V_{dapp}$ )

ค่าปรากฏปริมาตรการกระจายตัว หรือค่า  $V_{dapp}$  เป็นค่าคงที่ ที่แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของตัวยาในพลาสมากับปริมาณตัวยาทั้งหมดในร่างกาย  $V_{dapp}$  มีค่ามากหรือน้อย ขึ้นกับสมบัติของตัวยาในการจับกับพลาสมาโปรตีน หรือกระจายไปในเนื้อเยื่อต่างๆ หากตัวยามีการจับกับพลาสมาโปรตีนมาก จะปรากฏความเข้มข้นของตัวยาในพลาสมาหรือในกระแสโลหิตมาก  $V_{dapp}$  ของตัวยานั้นจะมีค่าน้อยกว่าการที่ตัวยาจับกับเนื้อเยื่อต่างๆ ค่าของ  $V_{dapp}$  มีหน่วยเป็นลิตร (L) หรือ เป็น L/Kg ตัวอย่างค่า  $V_{dapp}$  ของตัวยาต่าง ๆ ในคนปกติที่มีน้ำหนักตัว 70 kg แสดงในตารางที่ 2-1

**ตารางที่ 2-1** ตัวอย่างค่าปรากฏปริมาตรการกระจายตัว ( $V_{dapp}$ ) ของตัวยาต่างๆ\*

| <10 L          | 10-20 L        | 20-40 L          | 40-100 L      | >100 L        |
|----------------|----------------|------------------|---------------|---------------|
| Chlorpropamide | Amikacin       | Chlordiazepoxide | Carbamazepine | Digoxin       |
| Furosemide     | Amoxicillin    | Digitoxin        | Lithium       | Morphine      |
| Tolbutamide    | Aspirin        | Lignocaine       | Nifedipine    | Nortriptyline |
| Valproic acid  | Cephalexin     | Phenobarbital    | Paracetamol   | Procainamide  |
| Warfarin       | Gentamicin     | Methotrexate     | Phenytoin     | Propanolol    |
|                | Indomethacin   | Theophylline     | Procainamide  | Quinidine     |
|                | Salicylic acid | Vancomycin       | Propranolol   | Terbutaline   |

\* ดัดแปลงจาก Shargel L, Wu-Pong S, and Yu ABC. Applied pharmaceuticals and pharmacokinetics 5<sup>th</sup>. McGraw-Hill, 2005, pp. 864-868.

ค่า  $V_{dapp}$  จึงเป็นอีกพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ที่มีประโยชน์ในการกำหนดช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างและกำหนดวิธีวิเคราะห์ โดยตัวยาที่มีค่า  $V_{dapp}$  มากมักมีค่าความเข้มข้นของตัวยานั้นในกระแสโลหิตค่อนข้างต่ำ วิธีวิเคราะห์ที่ใช้จึงควรมีความไวสูงมาก ขณะเดียวกันช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างชีวสารเพื่อการวิเคราะห์ก็อาจต้องยาวนานขึ้น เพื่อครอบคลุมเวลาทั้งหมดของตัวยานั้นในร่างกาย

### 2.1.3 สารมาตรฐานของตัวยา

เมื่อมีข้อมูลต่างๆ ของตัวยาแล้ว สิ่งที่ขาดไม่ได้ในการวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวสาร คือการที่ต้องมีสารมาตรฐานของตัวยาและ/หรือเมแทบอลิต์ เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ขึ้นมาใหม่ หรือการดัดแปรปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ที่มีอยู่ โดยการเติมสารมาตรฐานนั้นลงไปในช่วงเวลาที่เลือกมาเป็นตัวอย่าง เป็นการจำลองตัวอย่างชีวสารเพื่อการวิเคราะห์ และยังเป็นการวิเคราะห์เพื่อใช้ในการสร้างเส้นกราฟเทียบมาตรฐาน (calibration curve) ในทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างชีวสาร

#### สมบัติของสารมาตรฐาน สารมาตรฐานอ้างอิง

สารมาตรฐาน (standard) หรือสารมาตรฐานอ้างอิง (reference standard) เป็นตัวยาหรือเมแทบอลิต์ที่มีความบริสุทธิ์สูงมาก จึงมีราคาค่อนข้างสูง ซึ่งหากได้จากการสังเคราะห์ ควรมีเอกสารกำกับความบริสุทธิ์ของตัวยาแนบมาด้วย แต่หากสังเคราะห์ขึ้นใช้เองในห้องปฏิบัติการ หรือซื้อมาจากแหล่งอื่น ควรต้องตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารก่อนนำมาใช้ ซึ่งทำได้โดยการนำสารมาหาจุดหลอมเหลว สารที่บริสุทธิ์มีช่วงของการหลอมเหลวค่อนข้างแคบ โดยเทียบค่าหรือช่วงการหลอมเหลวกับค่ามาตรฐานของตัวยานั้นที่มีกำหนดไว้ หากตัวยามีสมบัติการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต การกราฟดูลักษณะของสเปกตรัมเทียบกับสเปกตรัมมาตรฐาน ก็ช่วยบ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ได้เช่นกัน โดยทั่วไป หากการตรวจค่าการหลอมเหลวและอัลตราไวโอเลตสเปกตรัมมีความใกล้เคียงหรือเหมือนข้อมูลมาตรฐาน ให้ถือว่าสารที่มีอยู่มีความบริสุทธิ์ประมาณ 98% แต่หากการตรวจสอบได้ผลค่อนข้างแตกต่าง อาจต้องทำการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทสโกปี (IR spectroscopy) และ/หรือควบคู่กับการใช้สเปกโทสโกปีมวล (mass spectroscopy) และเอ็นเอ็มอาร์สเปกโทสโกปี (NMR spectroscopy) และควรมีการทำให้สารบริสุทธิ์มากขึ้นเพื่อทดสอบสมบัติใหม่ การทำสารให้บริสุทธิ์สามารถทำได้ง่าย ๆ โดยใช้การตกผลึกในตัวทำละลายที่เหมาะสม หรืออาจเป็นการระเหิด ทั้งนี้ขึ้นกับสมบัติของตัวยานั้น ๆ

สารมาตรฐานใช้งาน (working standard) เป็นสารมาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์น้อยกว่า สารมาตรฐานอ้างอิง โดยทั่วไปมักมีความบริสุทธิ์ประมาณ 90-95% เนื่องจากการวิเคราะห์ตัวอย่างในตัวอย่างชีวสารเป็นการวิเคราะห์สารปริมาณน้อย (trace analysis) และชีวสารแต่ละชนิดก็ ยังมีความสลับซับซ้อนในตัวเอง ดังนั้น สารมาตรฐานที่ควรใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างในชีวสาร จึงแนะนำให้ใช้สารมาตรฐานอ้างอิงเท่านั้น

ข้อมูลต่าง ๆ ของตัวอย่างที่เกี่ยวข้องกับความเป็นสารละลาย นับเป็นข้อมูลที่จำเป็นและมีประโยชน์ในกระบวนการวิเคราะห์ตัวอย่างชีวสาร เพราะการที่จะวิเคราะห์ตัวอย่างในชีวสารได้ ตัวอย่างจำเป็นต้องอยู่ในสภาพที่ละลายอยู่ในชีวสารที่จะวิเคราะห์นั้น ข้อมูลการละลายของตัวอย่างในตัวทำละลายต่าง ๆ และค่าคงที่ของการแตกตัวของตัวอย่างในสารละลาย (Dissociation constant) เป็นประโยชน์อย่างมากในการกำหนดวิธีการเตรียมตัวอย่างชีวสารเพื่อการวิเคราะห์ ซึ่งจะได้กล่าวรายละเอียดเพิ่มเติมในบทที่ 3

### การเก็บรักษาสารมาตรฐาน

สารมาตรฐานของตัวอย่างหรือเมแทบอลิต์ชนิดใดชนิดหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์ ควรมีวิธีการเก็บรักษาอย่างถูกต้องเหมาะสม เพื่อให้สารมาตรฐานนั้นคงสภาพหรือสมบัติของตัวเอง ตลอดเวลาที่ต้องใช้สารมาตรฐานนั้น หากมีปริมาณของสารมาตรฐานค่อนข้างมากอยู่ในขวดหรือภาชนะเฉพาะ ควรแบ่งสารมาตรฐานนั้นใส่ขวดแก้วซึ่งมักใช้สีชา โดยแบ่งไว้ในปริมาณที่พอใช้ในการวิเคราะห์และเก็บไว้ในภาชนะที่มีสารดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้องหรือที่อุณหภูมิ 4°C ตามแต่ความคงตัวของสารแต่ละตัว โดยทั่วไปแล้วการเก็บสารที่อุณหภูมิต่ำ รักษาสภาพเดิมของสารได้ดีกว่า

ภาชนะที่ใส่สารมาตรฐานต้องปิดฉลาก บอกชื่อสาร วันหมดอายุ (หากมี) ความบริสุทธิ์ น้ำหนักสารที่บรรจุอยู่ภายใน และหักกลบออกทุกครั้งที่น่าสารออกมาใช้โดยบันทึกการใช้ทุกครั้ง

## 2.2 ชีวสาร

ชีวสาร เป็นคำรวม มีความหมายกว้าง สืบถึงสารที่อาจอยู่ในสถานะของแข็ง ของเหลว หรือแก๊ส ที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตไม่ว่าเป็นคนหรือสัตว์ ในการวิเคราะห์อาจมีการใช้คำชีวสารตามบทบาทต่างๆ ดังต่อไปนี้

### 2.2.1 ตัวกลางชีวสาร และตัวอย่างชีวสาร

#### ตัวกลางชีวสาร (Biologic media)

เมื่อตัวยานำเข้าสู่ร่างกายสิ่งมีชีวิตไม่ว่าคนหรือสัตว์ และไม่ว่าผ่านทางให้ยาอย่างไร อาจเป็นการรับประทาน การฉีด การเหน็บ ฯลฯ ตัวยาจะออกฤทธิ์ได้ต้องเข้าสู่กระแสโลหิต ซึ่งนำพาตัวยาไปยังอวัยวะและส่วนต่างๆ ของร่างกาย อวัยวะใดของร่างกายที่ตัวยาถูกพาไป เรียกอวัยวะนั้นว่าเป็น “ตัวกลางชีวสาร” ทุกส่วนของร่างกายตั้งแต่ศีรษะจรดเท้าเป็นตัวกลางชีวสารได้ทั้งสิ้น เช่น เส้นผม เล็บ น้ำมัน น้ำลาย เลือด ปัสสาวะ

การที่ตัวยาถูกพาไปสู่ส่วนใดของร่างกายขึ้นกับสมบัติทางเคมีและสมบัติทางฟิสิกส์ของตัวยานั้นๆ ในร่างกาย ดังนั้น ตัวกลางชีวสารของตัวยาหนึ่งจึงอาจแตกต่างไปจากอีกตัวยาหนึ่งได้ ยกตัวอย่างเช่น น้ำไขสันหลัง (cerebrospinal fluid, CSF) เป็นตัวกลางชีวสารของยาต้านการชัก แต่ไม่เป็นตัวกลางชีวสารของยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้การดัดแปรสูตรโครงสร้างของตัวยา หรือการปรับปรุงสูตรตำรับ หรือรูปแบบของผลิตภัณฑ์ สามารถปรับเปลี่ยนสมบัติของตัวยา ส่งผลต่อความจำเพาะของตัวยาต่อตัวกลางชีวสารได้ เช่น ยารักษาโรคมะเร็ง มีเซลล์มะเร็งเป็นตัวกลางชีวสาร

#### ตัวอย่างชีวสาร (Biologic samples)

ในการวิเคราะห์ตัวยาจากชีวสาร จำเป็นต้องพิจารณาเลือกตัวกลางชีวสารที่เหมาะสมมาเป็นตัวอย่างชีวสารเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ ตัวยาหนึ่ง ๆ เมื่อเข้าสู่ร่างกายสิ่งมีชีวิตมีตัวกลางชีวสารสำหรับตัวยานั้นได้หลายชนิด เช่น ยาที่ใช้รับประทาน อย่างน้อยมีทางเดินอาหาร เยื่อบุกระเพาะอาหาร เยื่อบุลำไส้ เลือด ปัสสาวะ เป็นตัวกลางชีวสาร ตัวกลางชีวสารใดถูกนำมาเป็นตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ตัวยา เรียกตัวกลางชีวสารนั้นว่า “ตัวอย่างชีวสาร” การนำตัวกลางชีวสารใดมาใช้เป็นตัวอย่างชีวสารในการวิเคราะห์ ควรพิจารณาถึงวัตถุประสงค์หรือเป้าหมายของการที่ต้องวิเคราะห์ตัวยานั้น ดังประมวลไว้ในตารางที่ 2-2

นอกเหนือจากวัตถุประสงค์ข้างต้น ปัจจัยที่ควรคำนึงในการเลือกตัวอย่างชีวสาร ได้แก่ ปริมาณหรือความเข้มข้นของตัวยาในตัวกลางชีวสาร และความยากง่ายของการนำตัวกลางชีวสารนั้นมาเป็นตัวอย่าง ทั้งนี้ ยังมีการแบ่งลักษณะของตัวอย่างชีวสารเป็น **ตัวอย่างชีวสารสามัญ (common biologic sample)** และ **ตัวอย่างชีวสารเฉพาะ (specific biologic sample)**

ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างชีวสารสามัญและตัวอย่างชีวสารเฉพาะ คือ ตัวอย่างชีวสารสามัญเป็นตัวกลางชีวสารที่เป็นที่คุ้นเคยและถูกนำมาใช้เป็นตัวอย่างชีวสารในการ

วิเคราะห์ตัวยา เช่น เลือด ปัสสาวะ น้ำลาย ขณะที่ตัวอย่างชีวสารเฉพาะเป็นตัวอย่างชีวสารที่จำเพาะกับตัวยานั้น ๆ หรือจำเพาะกับการตอบคำถามหรือวัตถุประสงค์ที่ต้องการ โดยไม่มีทางเลือกเป็นตัวอย่างชีวสารอื่น เช่น เยื่อบุกระเพาะอาหารเป็นตัวอย่างชีวสารเฉพาะในการตรวจสอบการสลายตัวของ amoxicillin ด้วยกรดในกระเพาะอาหาร เมื่อมี omeprazole ร่วมด้วย<sup>13</sup>

การเก็บตัวอย่างชีวสารจากคนหรือสัตว์อาจทำให้คนหรือสัตว์นั้นได้รับการเจ็บปวดได้ จึงมีการแบ่งตัวอย่างชีวสารเป็น **ประเภทที่ทำให้ผู้ให้ตัวอย่างเจ็บตัว (invasive biologic sample)** เช่น การเก็บตัวอย่างเลือด เยื่อบุกระเพาะอาหาร หรือ **ประเภทที่ผู้ให้ตัวอย่างไม่ต้องเจ็บตัว (non-invasive biologic sample)** เช่น การเก็บตัวอย่างน้ำลาย ปัสสาวะ

## ตารางที่ 2-2 ตัวอย่างชีวสารตามวัตถุประสงค์ต่าง ๆ

| วัตถุประสงค์                                                                               | สิ่งมีชีวิตที่ใช้ | ตัวอย่างชีวสาร                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>การวิจัยพัฒนาดัวยาและสูตรตำรับยา (Research &amp; Development, R&amp;D)</b>              |                   |                                                                 |
| - อัตราสารเข้าระบบชีวภาพ                                                                   | ทั้งคนและสัตว์    | เลือด/พลาสมา/ซีรัม                                              |
| - เกล็ดขจลนศาสตร์                                                                          | สัตว์ทดลอง        | เลือด/พลาสมา/ซีรัม ปัสสาวะ                                      |
| - กระบวนการเมแทบอลิซึม                                                                     | สัตว์ทดลอง        | เลือด/พลาสมา/ซีรัม ปัสสาวะ อุจจาระ                              |
| - การดูดซึมของตัวยา                                                                        | คน                | เลือด/พลาสมา/ซีรัม และอุจจาระ                                   |
| - ชีวสมมูล                                                                                 | คน                | เลือด/พลาสมา/ซีรัม                                              |
| - การกระจาย/การสะสมของตัวยา                                                                | สัตว์ทดลอง        | ทุกตัวกลางชีวสารที่ตัวยาระบายตัวไปถึง                           |
| <b>การตรวจติดตามระดับยา (Therapeutic Drug Monitoring, TDM)</b>                             |                   |                                                                 |
| - ความเข้มข้นของตัวยา                                                                      | ผู้ป่วย           | พลาสมา/น้ำลาย                                                   |
| <b>การตรวจสอบการใช้ยาในทางที่ผิด (drug abuse)</b>                                          |                   |                                                                 |
| - ความเข้มข้นของตัวยา                                                                      | คน                | เส้นผม/ปัสสาวะ                                                  |
| <b>การตรวจทางนิติวิทยาศาสตร์ (forensic sciences) โดยเฉพาะความเป็นพิษจากยา<sup>14</sup></b> |                   |                                                                 |
| - ความเข้มข้นของตัวยา                                                                      | คน                | น้ำในกระเพาะอาหาร/เลือด/ปัสสาวะ และอื่นๆ ขึ้นกับสภาพของตัวอย่าง |

อย่างไรก็ตาม ไม่ว่าจะเป็นตัวอย่างชีวสารสามัญ หรือตัวอย่างชีวสารเฉพาะ หรือผู้ให้ตัวอย่างต้องเจ็บตัวหรือไม่เจ็บตัว นักวิเคราะห์ควรทำความเข้าใจกับตัวอย่างชีวสารแต่ละชนิด เข้าใจตั้งแต่ส่วนประกอบและหน้าที่ของชีวสารนั้นในร่างกาย ตัวอย่างที่อยู่ในชีวสารนั้น วิธีการเก็บตัวอย่างชีวสารจากสิ่งมีชีวิต ตลอดจนการเก็บรักษาตัวอย่างชีวสารที่ได้มาเพื่อการวิเคราะห์ โดยมีหลักสำคัญคือ **สภาพของตัวอย่างในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ ต้องไม่ต่างจากสภาพ ณ เวลาที่เก็บตัวอย่างนั้นมาจากสิ่งมีชีวิต** ทั้งนี้จะได้กล่าวในรายละเอียดของแต่ละตัวอย่างชีวสารต่อไป

## 2.2.2 ตัวอย่างชีวสารสามัญ (Common biologic samples)

ตัวอย่างชีวสารสามัญที่เป็นที่คุ้นเคยในการนำมาวิเคราะห์ด้วยยาและ/หรือเมแทบอลิซึมของตัวยา ได้แก่ เลือด หรือพลาสมา หรือซีรัม น้ำลาย ปัสสาวะ อุจจาระ

ปัจจุบันการดำเนินการใดๆ เกี่ยวกับการใช้ตัวอย่างชีวสารจากสิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นคนหรือสัตว์ จำเป็นต้องผ่านความเห็นชอบและอนุมัติ โดยคณะกรรมการพิจารณาด้านจริยธรรมการศึกษา ทดลองในคนหรือในสัตว์ก่อนจึงจะดำเนินการได้

### 2.2.2.1 เลือด พลาสมา ซีรัม (Whole blood, blood plasma, blood serum)<sup>15-18</sup>

เลือดหรือโลหิตของคนหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีลักษณะเป็นของเหลวข้นสีแดงเข้ม อยู่ภายในหลอดเลือดแดง หลอดเลือดดำหรือหลอดเลือดฝอย เลือดในหลอดเลือดมีการเคลื่อนไหลหมุนเวียนและกระจายสู่เนื้อเยื่อต่างๆทั่วร่างกาย เลือดจึงเป็นตัวอย่างชีวสารที่ดีของตัวยาต่างๆ ที่ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิต แต่ในทางปฏิบัติในการวิเคราะห์ด้วยยาหรือเมแทบอลิซึมในตัวอย่างชีวสาร พลาสมาหรือซีรัมมักถูกใช้เป็นตัวอย่างชีวสารมากกว่าเลือด ทั้งนี้เพราะการเตรียมตัวอย่างพลาสมาหรือซีรัมเพื่อการวิเคราะห์ด้วยยาทำได้สะดวกกว่าการใช้ตัวอย่างเลือด เลือดถูกนำมาเป็นตัวอย่างชีวสารเฉพาะในกรณีที่ต้องการได้ข้อมูลของตัวยาที่เกี่ยวข้องกับส่วนของเลือดหรือเม็ดเลือดเท่านั้น

#### ส่วนประกอบและหน้าที่

เลือด (whole blood) ทั้งหมดในร่างกายของคน คิดเป็นประมาณร้อยละ 7-8 ของน้ำหนักตัว ดังนั้นผู้ใหญ่ที่มีน้ำหนักตัว 70 kg มีเลือดในร่างกายเท่ากับ 5-6 ลิตร เลือดมีความเป็นด่างเล็กน้อย มี pH ประมาณ 7.35-7.45 เลือดหนึ่งปริมาตรมีน้ำหนักมากกว่าน้ำเล็กน้อย (ค่าความถ่วงจำเพาะ 1.055-1.065) แต่มีความหนืดมากกว่าน้ำประมาณ 5-6 เท่า ความหนืดนี้