การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณพรีกาบาลินในพลาสมามนุษย์

Development and Validation of an High Performance Liquid Chromatography Method for Determination of Pregabalin in Human Plasma

นิพนธ์ต้นฉบับ

วรรณา เอี่ยมอาจ[1], สุพีชา วิทยเลิศปัญญา[1], ชญานิศ ศรชัยธวัชวงศ์[2] และวีระศักดิ์ สามี[2]*

[1] ศูนย์เภสัชจลนศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรมหาวิทยาลัย
[2] คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ อ.องครักษ์ จ.นครนายก 26120

* **ติดต่อผู้นิพนธ์:** weerasak@g.swu.ac.th

วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 2557;9(3):89-97

Original Article

Wanna Eiamart[1], Supeecha Wittayalertpanya[1], Chayanid Sornchaithawatwong[2] and Weerasak Samee[2]*

[1] Chula Pharmacokinetic Research Center, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
[2] Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University, Nakhon-nayok, Thailand 26120

* **Corresponding author:** weerasak@g.swu.ac.th

Thai Pharmaceutical and Health Science Journal 2014;9(3):89-97

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ pregabalin ในพลาสมามนุษย์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้ตัวตรวจวัดสัญญาณชนิดฟลูออเรสเซนต์ **วิธีการศึกษา:** เตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซิโตไนไตรล์ นำส่วนใสมาทำปฏิกิริยากับ 4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซน โดยสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดอนุพันธ์คือ ใช้ปริมาณของ 4-คลอโร-7-ไนโตรเบนโซฟูราแซนในความเข้มข้น 2.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาวะที่มี pH เท่ากับ 11 ภายใต้อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีและหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ วิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้คอลัมน์ชนิด C_{18} ใช้เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยอะซิโตไนไตรล์และ KH_2PO_4 (10 มิลลิโมลาร์, pH 2.5) ในอัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตร อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดปริมาณสารด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณชนิดฟลูออเรสเซนต์โดยกำหนดความยาวคลื่นที่ทำให้เกิด excitation ที่ 460 นาโนเมตรและความยาวคลื่นที่ทำให้เกิด emission ที่ 558 นาโนเมตร **ผลการศึกษา:** อนุพันธ์ที่เตรียมขึ้นมีความคงตัวมากกว่าร้อยละ 96 เป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณ pregabalin ในพลาสมาได้ในช่วงความเข้มข้น 20 – 10,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่า R^2 > 0.9999 โดยมีขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ (LLOQ) เท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ปริมาตรตัวอย่างพลาสมา 200 ไมโครลิตรและปริมาตรที่ใช้วิเคราะห์ 20 ไมโครลิตร มีร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) เฉลี่ยและร้อยละการคืนกลับเฉลี่ย (% recovery) ที่ LLOQ เท่ากับ 5.19% และ 101.86% ตามลำดับ **สรุป:** วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความไว จำเพาะเจาะจง แม่นยำ และถูกต้องตามเกณฑ์มาตรฐานการวิเคราะห์สารทางชีวภาพของ US FDA guideline 2013 และ European Medicines Agency (EMEA) guideline 2011

คำสำคัญ: พรีกาบาลิน , กาบาเพนติน, พลาสมามนุษย์, HPLC, NBD-Cl

Abstract

Objective: To develop and validate method for quantitative determination of pregabalin in human plasma by high performance liquid chromatography equipped with fluorescence detector. **Method:** Sample preparation required plasma protein precipitation using acetonitrile. The supernatant was then aliquoted and pre-column derivatized with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl). The optimum derivatization conditions established were 2.24 mg/ml of NBD-Cl, pH 11 and 80 °C. After 15 min, the reaction was terminated using 0.02 M HCl. The chromatographic separation was carried out on a Phenomenex C_{18} column. Mobile phase, a mixture of KH_2PO_4 buffer (10 mM; pH 2.5) and acetonitrile (50:50, v/v), was eluted at the flow rate of 1.2 ml/min. The fluorescent derivatives were monitored at the excitation and emission wavelengths of 460 and 558 nm, respectively. **Results:** The obtained derivatives were found to be stable (> 96%) remaining for at least 48 hours at 20 °C. The developed assay for pregabalin was linear over a range of 20 – 10,000 ng/ml in plasma (R^2 > 0.9999). The lower limit of quantification (LLOQ) was 20 ng/ml when 20 µl injection volume was applied. The average percentage coefficient of variation (% CV) and % recovery at LLOQ level were within 5.19% and 101.86%, respectively. **Conclusion:** The proposed method, proved to be sensitive, selective, precise and accurate, meets the standards of bioanalysis method validation accepted by the United States Food and Drug Administration (US FDA) guideline 2013 and the European Medicines Agency (EMEA) guideline 2011.

Keywords: Pregabalin, Gabapentin, Human plasma, HPLC, NBD-Cl

บทนำ

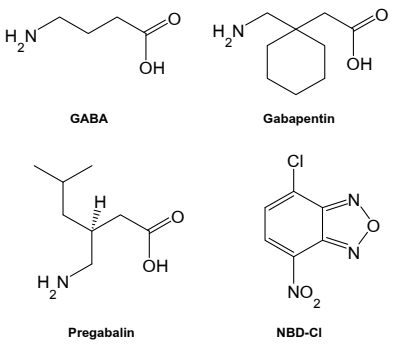
พรีกาบาลิน (pregabalin) มีชื่อทางเคมีคือ (S)-3-(amino methyl)-5-methylhexanoic acid มีค่า pKa_1 เท่ากับ 4.2 และค่า pKa_2 เท่ากับ 10.6 ละลายได้ดีในน้ำทั้งสภาวะกรดและเบส[1] pregabalin มีโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาคล้ายคลึงกับกาบาเพนติน (gabapentin) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกาบา (γ-amino-butyric acid; GABA) ออกฤทธิ์โดยการจับกับหน่วยย่อย α2δ ของ voltage-gated calcium channels ที่อยู่ในระบบประสาทส่วนกลาง ส่งผลให้ลดการหลั่งสารสื่อประสาท เช่น glutamate, noradrenaline และ substance P ทำให้มีฤทธิ์ในการลดปวด[2] pregabalin ไม่จับกับโปรตีนในกระแสเลือดจึงมีรูปแบบทางเภสัชจลนศาสตร์เป็นเส้นตรง (linear pharmacokinetic) และไม่จับกับเอนไซม์ CYP 450 จึงลดปัญหาการเกิดปฏิกิริยากับยาอื่น การรับประทานยาจึงไม่ต้องคำนึงถึงมื้ออาหาร เนื่องจากอาหารไม่มีผลต่อการดูดซึมยา[3] เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ pregabalin กับ

gabapentin พบว่า pregabalin สามารถบรรเทาความเจ็บปวดได้ดีกว่าและมีค่าชีวประสิทธิผล (oral bioavailability) ที่สูงกว่า[4] pregabalin ได้รับการรับรองให้ใช้ในการรักษาอาการปวดหลายชนิด ตัวอย่างเช่น neuropathic pain[5,6] และ fibromyalgia[7]

Pregabalin เป็นยาที่คิดค้นและจดสิทธิบัตรโดยบริษัท Pfizer[8] และสิทธิบัตรกำลังจะหมดอายุ ทำให้มีบริษัทยาหลายแห่งเริ่มการวิจัยและพัฒนาเพื่อผลิตยาเลียนแบบ ซึ่งการพิสูจน์ว่ายาที่ผลิตเลียนแบบและยาต้นแบบมีประสิทธิภาพในการรักษาเท่าเทียมกัน (therapeutic equivalence) จะต้องอาศัยการศึกษาชีวสมมูล (bioequivalence) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับว่ามีความถูกต้องและใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุด ผลการวิเคราะห์ระดับ pregabalin ในพลาสมาจะถูกนำไปใช้เปรียบเทียบความสามารถของยาที่ผลิตเลียนแบบว่ามีความสามารถดูดซึมและออกฤทธิ์ได้ไม่แตกต่างจากยาต้นแบบและใช้เป็นข้อมูลยืนยันถึงความปลอดภัยและประสิทธิภาพในการรักษา

ปัจจุบันยังไม่มีวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ pregabalin แต่มีการรายงานการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ pregabalin โดยเทคนิคต่าง ๆ ได้แก่ ESI-MS/MS[9], LC/MS/MS[10-12], GC/MS[13], UPLC-MS[14] และ CE/NMR[15] ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความแม่นยำแต่ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูง การใช้เทคนิคแกสโครมาโทกราฟี (gas chromatography; GC) ไม่ได้รับความนิยมเนื่องจาก pregabalin เป็นสารที่ไม่ระเหย ต้องทำให้เป็นอนุพันธ์ที่สามารถระเหยและทำให้ทนความร้อนได้สูงก่อนจึงจะสามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีแกสโครมาโทกราฟี การวิเคราะห์ด้วยวิธีสเปกโตรฟลูออโรเมทรี (spectro- fluorometry)[16,17] และวิธียูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโทเมทรี (UV-VIS spectrophotometry)[16-19] เป็นวิธีที่ง่าย ราคาถูก แต่วิธีสเปกโตรโฟโทเมทรีไม่สามารถวิเคราะห์สารผสมได้และไม่เป็นระบบการวิเคราะห์แบบอัตโนมัติ จึงไม่เป็นที่ยอมรับในการศึกษาชีวสมมูล สำหรับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) เป็นเทคนิคที่ให้ความไวและความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์สูงเมื่อใช้ตัวตรวจวัดสัญญาณชนิดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence detector)[2,8,20-22] สามารถวิเคราะห์สารผสมและสารปริมาณน้อยได้ เป็นระบบอัตโนมัติและสามารถวิเคราะห์ซ้ำซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำ

จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ pregabalin ดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่าไม่มีฟลูออโรฟอร์ (fluorophore) ทำให้ pregabalin ไม่สามารถตรวจวัดด้วย fluorescence detector ได้โดยตรง การทำให้เกิดอนุพันธ์ (derivatization) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวัดโดยการทำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างสารที่ต้องการวิเคราะห์ กับสารก่ออนุพันธ์ (derivatizing agent) เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของ pregabalin ให้สามารถตรวจวัดได้ โดยสาร derivatizing agent ที่เคยมีผู้ศึกษาเพื่อนำมาใช้ในการทำปฏิกิริยากับ pregabalin ได้แก่ *o*-phtaldialdehyde[2,20] ทั้งนี้ อนุพันธ์ที่เกิดขึ้นมีความคงตัวสั้น สำหรับ fluorescamine[17] สามารถเตรียมได้ง่ายแต่มีราคาสูง ส่วน 2,4-dinitrofluorobenzene[17], 2,3,5,6-tetrachloro-1,4-benzoquinine[17], 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate sodium (NQS)[21], 2,6-Dichloroquinone-4-chloroimide (gibb's)[6], 3-methyl-2-benzthiazolinone hydrazone (MBTH)[6] และ ninhydrin[19] นั้นหากใช้ UV-VIS detector ทำให้ความไวในการวิเคราะห์ต่ำ มีรายงานการศึกษาพบว่าการใช้ NBD-Cl[16,22-24] เป็น fluorogenic reagent ได้อนุพันธ์ที่สามารถตรวจวัดด้วย fluorescence detector ซึ่งพบว่ามีความไวในการวิเคราะห์สูง มีความคงตัวดีและราคาถูก



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ GABA, gabapentin, pregabalin และ NBD-Cl

เป้าหมายสำคัญในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ pregabalin เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาชีวสมมูล ได้แก่ วิธีวิเคราะห์ต้องมีความไวสูง ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นและให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องและแม่นยำ การสกัดสารตัวอย่างทำได้ง่ายและรวดเร็ว รวมถึงต้นทุนในการวิเคราะห์ต่ำ การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ pregabalin ในตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธี HPLC เชื่อมต่อกับ fluorescence detector ใช้ gabapentin เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) สกัดยาออกจากพลาสมาโดยใช้วิธีการตกตะกอนโปรตีนแล้วทำให้เกิดอนุพันธ์กับ NBD-Cl ก่อนที่จะนำอนุพันธ์ไปแยกด้วยคอลัมน์ชนิด C_{18} ซึ่งเป็นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ยังไม่เคยมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้มาก่อน จากนั้นทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) โดยประเมินค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ตามข้อกำหนดของ United States Food and Drug Administration (US FDA) guideline 2013[25] และ European Medicines Agency (EMEA) guideline 2011[26] ซึ่งเป็นข้อกำหนดมาตรฐานของการวิเคราะห์สารในตัวอย่างทางชีวภาพ เพื่อยืนยันว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ pregabalin จากตัวอย่างพลาสมาได้

วิธีการศึกษา

1. สารเคมี

สารมาตรฐาน pregabalin ซื้อมาจากบริษัท Hetero Drugs Limited ประเทศอินเดีย, สารมาตรฐาน gabapentin ซื้อมาจากบริษัท Hikal ประเทศ อินเดีย, NBD-Cl ซื้อมาจากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน, acetonitrile (ACN) เกรด HPLC, boric acid, potassium chloride (KCl), sodium hydroxide (NaOH), 37% hydrochloric acid (HCl), potassium di-hydrogen phosphate (KH_2PO_4) และ 85% o-phosphoric acid ซื้อมาจากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน และพลาสมามนุษย์ซื้อมาจากสภากาชาดไทย

2. เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

High performance liquid chromatography (system controller รุ่น SCL-10Avp, high pressure pump รุ่น LC-10ADvp, column oven รุ่น CTO-10Avp, auto sampler รุ่น SIL-20ACHT, fluorescence detector รุ่น RF-10AXL (Shimadzu®, Japan), Shimadzu LC-solution software, column (Phenomenex® C_{18}, 250 mm × 4.6 mm, 5µm, USA), guard column (Inertsil® C_{18}, 4.0 mm × 10 mm, 5 µm, USA), ตู้อบ (Memmert®, Germany), ตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส (Sunyo®, Japan), เครื่องชั่ง รุ่น AC2155 (Sartorious®, Germany), เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (SCHOTT®, Germany)

3. การเตรียมสารละลาย

เตรียมสารละลายมาตรฐาน pregabalin ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ gabapentin ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการละลายใน ultrapure water จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 - 8 องศาเซลเซียส เตรียมสารละลาย NBD-Cl ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการละลายใน ACN จากนั้นเก็บให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เตรียม borate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยชั่ง boric acid น้ำหนัก 0.62 กรัม และ KCl น้ำหนัก 0.75 กรัม นำไปละลายและปรับปริมาตรด้วย ultrapure water จนครบ 100 มิลลิลิตร

4.การเตรียมตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน pregabalin ปริมาตร 10 ไมโครลิตรและ gabapentin ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงไปในหลอดทดลองที่มีพลาสมาปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม ACN 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาทีโดยเครื่อง vortex mixer จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ปิเปตเอาส่วนใสมา 600 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองและผสมกับ borate buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย NBD-Cl ปริมาตร 50 ไมโครลิตรแล้วผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 วินาที นำส่วนผสมที่ได้ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติม HCl ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.02 โมลาร์) เพื่อหยุดปฏิกิริยา และทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแข็ง กรองสารละลายตัวอย่างด้ายเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำสารละลายที่กรองแล้วปริมาตร 20 ไมโครลิตรฉีดเข้าเครื่อง HPLC

5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสาร

เตรียมเฟสเคลื่อนชนิดต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ ACN และ MeOH และ phosphate buffer ต่างชนิดกันได้แก่ K_2HPO_4, KH_2PO_4, NaH_2PO_4, Na_2HPO_4 จากนั้นศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการแยกสาร ได้แก่ ชนิดของเฟสเคลื่อนที่ pH ของเฟสเคลื่อนที่ ความเข้มข้นของ phosphate buffer และอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ โดยเลือกสภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่จากค่าพารามิเตอร์ที่มาตรฐานกำหนดไว้ ได้แก่ resolution (Rs), tailing factor (T) และ number of theoretical plate (N)

6. ศึกษาการสกัด pregabalin จากตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีน

ทำการทดลองตามข้อ 4 แต่เปลี่ยนสารที่ใช้ในการสกัดและตกตะกอนโปรตีนจาก ACN เป็น MeOH และ 20% trichloroacetic acid (TCA) สังเกตลักษณะของสารละลายหลังจากตกตะกอนโปรตีนและโครมาโทแกรมที่เกิดจากการฉีดสารสารสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เลือกสารสกัดที่เหมาะสมแล้วทำการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการสกัด โดยอัตราส่วนระหว่างพลาสมาและสารสกัดที่ทำการศึกษาเท่ากับ 1:2, 1:2.5, 1:3 และ 1:3.5 พิจารณาความเหมาะสมของสภาวะที่ใช้ในการสกัดจากค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) และ % CV

7. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำอนุพันธ์กับ NBD-Cl และการหยุดปฏิกิริยา

7.1 ศึกษาความเข้มข้นของ HCl ที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา โดยการเตรียมตัวอย่างตามข้อ 4 และหยุดปฏิกิริยาด้วย HCl ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.01, 0.02 และ 0.03 โมลาร์ เปรียบเทียบ peak area ของอนุพันธ์ pregabalin หลังหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดทันทีและ peak area เมื่อตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงหลังจากหยุดปฏิกิริยา เลือกความเข้มข้นของ HCl ที่ให้ร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ peak area น้อยที่สุด

7.2 ศึกษาปริมาตรของสารละลาย NBD-Cl ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทำปฏิกิริยากับ pregabalin โดยการเตรียมตัวอย่างตามข้อ 4 แต่เปลี่ยนแปลงปริมาตรของสารละลาย NBD-Cl เป็น 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 ไมโครลิตร เลือกปริมาตรของสารละลาย NBD-Cl ที่ให้ peak area ของอนุพันธ์ pregabalin มากที่สุดแต่ใช้ปริมาณ NBD-Cl น้อยที่สุด

7.3 ศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยการเตรียมตัวอย่างตามข้อ 4 แต่เปลี่ยนแปลง pH เป็น 8, 9, 10, 11, 12 และ 13 เลือก pH ที่ให้ค่า peak area มากที่สุด

7.4 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาโดยการเตรียมตัวอย่างเหมือนข้อ 4 แต่เปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการให้อุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียสเป็น 5, 10, 15, 20 และ 25 นาที เลือกเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจากเวลาที่ให้ peak area ของอนุพันธ์ pregabalin มากที่สุด โดยใช้เวลาน้อยที่สุดโดยตัวอย่างไม่เสียสภาพ

8. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

นำวิธีที่พัฒนาขึ้นมาตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามข้อกำหนดและเกณฑ์การยอมรับของ US FDA และ EMEA ดังนี้

8.1 Specificity/Selectivity: สกัดและวิเคราะห์ blank plasma จำนวน 6 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ blank plasma ทั้ง 6 ตัวอย่างต้องไม่ตรวจพบสัญญาณที่เวลาเดียวกับ peak ของ pregabalin และ gabapentin จึงจะสามารถนำ blank plasma นั้นมาใช้ในการวิเคราะห์ได้

8.2 Lower limit of quantification (LLOQ): สกัดและวิเคราะห์ pregabalin ใน blank plasma ที่ระดับความเข้มข้น LLOQ จำนวน 5 ตัวอย่าง แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณค่า signal to noise (S/N) ด้วยโปรแกรม LC solution โดยนำค่า peak height ของ pregabalin มาเทียบกับสัญญาณรบกวน (noise) ซึ่งต้องมีค่า S/N ratio มากกว่า 5

8.3 Linearity: สกัดและวิเคราะห์ pregabalin ใน blank plasma ที่ความเข้มข้น 8 ระดับ โดยความเข้มข้นต่ำสุดของกราฟมาตรฐานเป็นความเข้มข้นที่ระดับ LLOQ แล้วหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) ระหว่าง peak area กับความเข้มข้นของยาที่ระดับต่างๆ และคำนวณหาสมการเส้นตรง ($y = mx+c$) และค่า coefficient of determination (R^2) ด้วยโปรแกรม LC solution ทำการวิเคราะห์ซ้ำระหว่างวันเป็นจำนวน 5 วัน นำจุดความเข้มข้นแต่ละจุดของกราฟมาตรฐานมาคำนวณค่า % recovery และ % CV ทำการกำหนดความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ ความเข้มข้นต่ำ (low quality control; LQC) ความเข้มข้นกลาง (medium quality control; MQC) และความเข้มข้นสูง (high quality control; HQC) ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการตรวจสอบหัวข้อการทดสอบพารามิเตอร์ต่าง ๆ ตามข้อกำหนด โดยกำหนดความเข้มข้นที่จุดต่ำ (low) คือ ความเข้มข้นที่เท่ากับ 3 เท่าของ LLOQ ความเข้มข้นที่จุดกลาง (medium) คือ ความเข้มข้นที่เท่ากับ 50% ของกราฟมาตรฐาน และความเข้มข้นที่จุดสูง (high) คือ ความเข้มข้นที่เท่ากับ 75% ของกราฟมาตรฐาน

8.4 Accuracy และ precision: สกัดและวิเคราะห์ pregabalin ใน blank plasma โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ LLOQ, LQC, MQC และ HQC ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน ความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่าง ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันเป็นเวลา 3 วัน นำผลที่ได้มาคำนวณค่า % recovery และ % CV

8.5 Stability ทำการศึกษาความคงสภาพ 4 ประเภท ดังนี้

8.5.1 Post-preparative stability: สกัดและวิเคราะห์ pregabalin ใน blank plasma ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ LQC และ HQC ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง เปรียบเทียบการวิเคราะห์ความเข้มข้นของตัวอย่างในพลาสมาที่ผ่านกระบวนการสกัดที่เวลาเริ่มต้นกับตัวอย่างที่ตั้งไว้ใน autosampler ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำผลที่ได้มาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง (% change)

8.5.2 Stock-solution stability: วิเคราะห์หา peak area ของ pregabalin ในสารละลายที่ความเข้มข้น MQC โดยวิเคราะห์แยกกันจำนวน 3 ตัวอย่างแล้วเปรียบเทียบ peak area ของ stock solution ที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายที่เตรียมขึ้นใหม่กับ stock solution ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ 2 สัปดาห์ 3 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ นำผลที่ได้มาคำนวณค่า % change

8.5.3 Freeze & thaw stability: เตรียมตัวอย่าง pregabalin ในพลาสมาที่ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ LQC และ HQC แล้วสกัดและวิเคราะห์ยาใน blank plasma ทันทีหลังจากการเตรียม ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสให้เกิดการแข็งตัวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เกิดการละลาย (เท่ากับ 1 รอบ) เป็นจำนวน 3 รอบ นำผลที่ได้มาคำนวณค่า % change

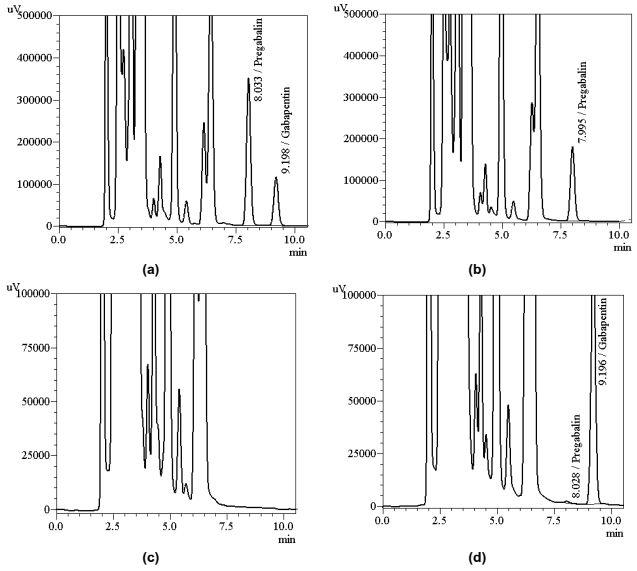
8.5.4 Short-term stability: เตรียมตัวอย่าง pregabalin ในพลาสมาที่ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ ต่ำ (LQC) และสูง (HQC) แล้วสกัดและวิเคราะห์ยาใน blank plasma ทันทีหลังจากเตรียมความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสให้เกิดการแข็งตัวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เกิดการละลาย (เริ่มจับเวลาเมื่อสารละลายหมด) เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง นำผลที่ได้มาคำนวณค่า % change

ผลการศึกษา

สภาวะที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ปริมาณ pregabalin ในพลาสมา

แนวทางในการเลือกความเหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ในการแยกสาร พิจารณาจากค่าพารามิเตอร์ตามเกณฑ์การยอมรับของมาตรฐาน US FDA guideline คือ theoretical plates (N) > 2000, tailing factor (T) $\leq$ 2, resolution (R_s) > 2 และเวลาในการวิเคราะห์สั้น จากผลการทดลองพบว่าเฟสเคลื่อนที่เหมาะสม

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วย ACN และ KH_2PO_4 (10 mM, pH 2.5) อัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตร ลักษณะ peak ของ pregabalin และ gabapentin มีความสมมาตรและแคบ สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจนและผ่านเกณฑ์มาตรฐานของ US FDA guideline (pregabalin มีค่า Rs = 2.66, T = 1.22, N = 6050; gabapentin มีค่า Rs = 2.66, T = 1.24, N = 6454) และไม่ถูกรบกวนโดยองค์ประกอบอื่นในพลาสมา ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ 11 นาที โดย pregabalin ออกมาที่เวลาประมาณ 8.0 นาที และ gabapentin ออกมาที่เวลาประมาณ 9.2 นาที ดังแสดงในรูปที่ 2a



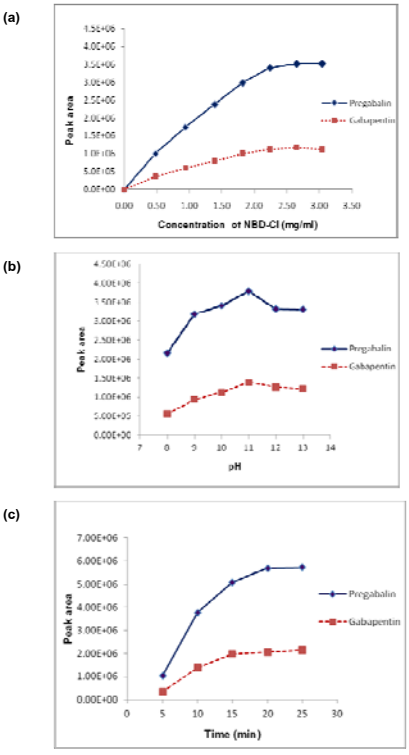
รูปที่ 2 โครมาโทแกรมของ (a) blank plasma ที่ใส่ pregabalin ความเข้มข้น 10000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ gabapentin (b) blank plasma ที่ใส่ pregabalin ความเข้มข้น 5000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (c) blank plasma (d) blank plasma ที่ใส่ pregabalin ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ gabapentin

การสกัด pregabalin ออกจากตัวอย่างพลาสมาด้วยการตกตะกอนโปรตีน

ผลการศึกษาพบว่าการใช้ MeOH ในการสกัดและตกตะกอนโปรตีนให้สารละลายที่ขุ่นและพบสัญญาณรบกวนการวิเคราะห์ของ pregabalin ส่วนการใช้ 20% TCA พบว่าไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการตกตะกอนโปรตีนเนื่องจากมีสมบัติเป็นกรดจึงมีผลต่อปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ระหว่าง pregabalin กับ NBD-Cl ในการสกัดและตกตะกอนโปรตีนโดยใช้ ACN พบว่าได้สารละลายที่ใสและไม่พบสัญญาณรบกวนการวิเคราะห์ที่เวลาเดียวกันกับ pregabalin และ gabapentin เมื่อศึกษาอัตราส่วนระหว่างพลาสมาและ ACN พบว่าที่อัตราส่วน 1:2.5 ให้ผลการสกัดที่ดีที่สุดทั้ง 3 ความเข้มข้นได้แก่ 60, 5000 และ 7000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดย pregabalin มี % recovery อยู่ในช่วง 94.76 - 103.57% และมี % CV อยู่ในช่วง 0.90 - 4.32% ส่วน gabapentin มี % recovery = 101.65% และมี % CV = 3.28%

สภาวะที่เหมาะสมในการทำอนุพันธ์กับ NBD-Cl และการหยุดปฏิกิริยา

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ HCl ในการหยุดปฏิกิริยาคือ 0.02 โมลาร์ ในการเกิดปฏิกิริยาจะต้องใช้ความเข้มข้นของ NBD-Cl อย่างน้อย 2.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อให้เกิดอนุพันธ์ได้สมบูรณ์ดังแสดงในรูปที่ 3a ผลการศึกษา pH ในช่วง pH 8-13 พบว่า pH จะต้องมีค่าสูงกว่าค่า pKa ของหมู่เอมีนปฐมภูมิในในโครงสร้างโมเลกุลของ pregabalin ซึ่งพบว่าที่ pH 11 ให้ peak area ของอนุพันธ์ pegabalin สูงที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 3b ผลการศึกษาระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาพบว่า peak area มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และเริ่มมีแนวโน้มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที และปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ที่เวลา 20 นาที ดังแสดงในรูปที่ 3c แต่ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาคือ 15 นาที เนื่องจากปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้เกือบสมบูรณ์โดยที่สารละลายตัวอย่างไม่เสียสภาพ ถึงแม้ว่าที่เวลา 20 นาทีปฏิกิริยาเกิดได้อย่างสมบูรณ์ แต่สารละลายตัวอย่างเกิดการเสียสภาพ โดยลักษณะทางกายภาพที่พบคือสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลเข้ม และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบสัญญาณรบกวนการวิเคราะห์เพิ่มมากขึ้น



รูปที่ 3 แสดงผลของ (a) ความเข้มข้นของ NBD-Cl (b) pH และ (c) เวลา ต่อ peak area ของอนุพันธ์ pregabalin และ gabapentin

Method validation

ผลการตรวจสอบความถูกต้องตามข้อกำหนดของ US FDA guideline 2013 และ EMAE guideline 2011 ได้ผลการตรวจสอบดังนี้

Specificity: ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์แสดงได้จากโครมาโทแกรมในรูปที่ 2 พบว่าค่า retention time ของ pregabalin ในพลาสมามีค่าประมาณ 8.0 นาที โดยแยกจาก peak ของ gabapentin ที่ใช้เป็น internal standard ซึ่งมีค่า retention time ประมาณ 9.2 นาที และจากการวิเคราะห์ blank plasma จำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่าสารทั้งสองไม่ถูกรบกวนการวิเคราะห์ด้วยสารอื่น ๆ ดังแสดงในรูปที่ 2C

LLOQ: เนื่องจากไม่สามารถตรวจพบสัญญาณรบกวนของ blank plasma ได้ จึงใช้วิธีการหา LLOQ โดยทำการเพิ่มความเข้มข้นของ pregabalin ขึ้นไปเรื่อย ๆ จากความเข้มข้นต่ำตั้งแต่ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มาตรวจวัดขนาดของสัญญาณแล้วนำมาคำนวณหาค่า S/N จากผลการศึกษาพบว่าสัญญาณที่ให้ค่า signal to noise เท่ากับหรือมากกว่า 5 คือ ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 2d) ให้ค่าเฉลี่ย signal to noise เท่ากับ 7.747 และ % CV เท่ากับ 6.40 ดังนั้นจึงเลือกจุดความเข้มข้นนี้มาใช้เป็นความเข้มข้นต่ำสุดในการสร้างกราฟมาตรฐาน

Linearity: ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าในช่วงความเข้มข้น 20 - 10,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรมีสมการเส้นตรงเฉลี่ย คือ y = 0.00026529x + 0.000121948 และมีค่า R^2 เท่ากับ 1 ซึ่งเมื่อคำนวณ % recovery ของแต่ละจุดความเข้มข้นอยู่ในช่วง 96.82 - 103.89% ซึ่งผ่านตามเกณฑ์การยอมรับ (เกณฑ์กำหนดว่าค่า R^2 ต้องมีค่ามากกว่า 0.990 และความเข้มข้นแต่ละจุดของกราฟมาตรฐานต้องให้ค่า % recovery อยู่ในช่วง 85 - 115% ยกเว้นที่ความเข้มข้น LLOQ ที่ต้องอยู่ในช่วง 80 - 120%)

ตารางที่ 1 แสดงการคำนวณค่าความเข้มข้นของ pregabalin จากกราฟมาตรฐาน (*N* = 5)

Theoretical concentration (ng/ml) (N = 5)								
Linearity range (ng/ml)	20 - 10000							
Regression equation (mean)	y = 0.00026529x+0.000121948							
Coefficient of determination (R^2)	1							
S.D. of slope	0.00000243							
S.D. of intercept	0.000351091							
Conc. of calibration curve (ng/ml)	20.00	50.00	200.00	750.00	1500.00	3000.00	6000.00	10000.00
Area ratio	0.00526	0.01390	0.05319	0.19792	0.39808	0.79738	1.57981	2.66445
SD of area ratio	0.00037	0.00042	0.00180	0.00113	0.00743	0.01082	0.01723	0.03222
CV (%)	6.92	3.00	3.39	0.57	1.87	1.36	1.09	1.21
Back calculation (ng/ml)	19.36	51.95	200.05	745.61	1500.10	3005.25	5954.59	10043.08
Recovery (%)	96.82	103.89	100.03	99.41	100.01	100.17	99.29	100.43

Accuracy: ความถูกต้องของการวิเคราะห์ pregabalin ในพลาสมาแสดงด้วย % recovery พบว่า % recovery ของการวิเคราะห์ในแต่ละวันทั้ง 3 วัน ที่ความเข้มข้นของ pregabalin เท่ากับ 20, 60, 5000 และ 7,500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า % recovery ของแต่ละความเข้มข้นในช่วง 99.33 - 106.89%, 97.19- 104.47%, 96.27 - 100.23% และ 95.87 - 102.26% ตามลำดับ และผลการวิเคราะห์ระหว่างวัน พบค่า % recovery เฉลี่ยเท่ากับ 101.86, 99.62, 98.25 และ 99.56% ตามลำดับ ซึ่งผ่านตามเกณฑ์การยอมรับ คืออยู่ในช่วง 85 - 115% ยกเว้นที่ความเข้มข้น LLOQ ต้องอยู่ในช่วง 80 - 120%

Precision: ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ pregabalin ในพลาสมาแสดงด้วย % CV พบว่า %CV ของการวิเคราะห์ในแต่ละวันทั้ง 3 วัน ที่ความเข้มข้นของ pregabalin เท่ากับ 20, 60, 5000 และ 7500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า % CV ของแต่ละความเข้มข้นอยู่ในช่วง 2.48 - 5.41%, 2.57 - 3.57%, 0.22 - 1.17% และ 0.73 - 1.28% ตามลำดับ และผลการวิเคราะห์ระหว่างวัน พบว่า มีค่า % CV เฉลี่ยเท่ากับ 5.19%, 4.57%, 1.84% และ 2.97% ตามลำดับ ซึ่งผ่านตามเกณฑ์การยอมรับ คือต้องมี % CV ต้องอยู่ในช่วง ± 15% ยกเว้นความเข้มข้น LLOQ ที่ต้องอยู่ในช่วง ± 20%

ตารางที่ 2 แสดงค่า precision และ accuracy ของวิธีวิเคราะห์ pregabalin ในพลาสมา (n = 18; 5 sets for 3 days)

Concentration added (ng/ml)	Concentration found (ng/ml)	% CV (mean)	% Recovery (mean)
Intra-day (n = 6)			
LLOQ	19.87 - 21.38	2.48 - 5.41	99.33 - 106.89
60	58.31 - 62.68	2.57 - 3.57	97.19 - 104.47
5000	4813.74 - 5011.53	0.22 - 1.17	96.27 - 100.23
7500	7189.92 - 7666.18	0.97 - 1.28	95.87 - 102.26
Inter-day (n = 18)	(mean ± SD)		
LLOQ	20.37 ± 0.87	5.19	101.86
60	59.77 ± 2.52	4.57	100.47
5000	4912.32 ± 98.93	1.84	100.23
7500	7466.88 ± 248.20	2.97	99.56

การศึกษาความคงตัว (Stability)

Post-preparative stability: พบว่าความเข้มข้นของ pregabalin ที่ 60 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 7,500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงเท่ากับ -3.49 และ 0.70% ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับคือมี % change ไม่เกิน ± 15%

Stock standard solution stability: พบว่า peak area ของ pregabalin ในสัปดาห์ที่ 2 - 4 มีค่าการเปลี่ยนแปลง เท่ากับ -2.78, -1.25 และ -1.52% ตามลำดับ และ peak area ของ gabapentin ในสัปดาห์ที่ 2 - 4 มีค่าการเปลี่ยนแปลง เท่ากับ -0.37, 2.26 และ -0.56% ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับคือมี % change ไม่เกิน ± 5%

Freeze & Thaw stability ของ pregabalin ในพลาสมา: พบว่าค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ pregabalin ที่ 60 และ 7,500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 0.45% และ 3.55%

ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับคือมี % change ไม่เกิน ± 15%

Short term stability ของ pregabalin ในพลาสมา: พบว่า % change ของ pregabalin ความเข้มข้น 60 นาโนกรัมต่อมิลลิตร ที่เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ -7.02, -5.14 แล -3.28% ตามลำดับ และ % change ของ pregabalin ที่ความเข้มข้น 7,500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 2.19, 3.92 และ 2.11% ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับคือมี % change ไม่เกิน ± 15%

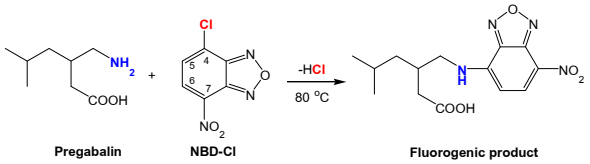
อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ pregabalin ในพลาสมา ใช้ gabapentiin เป็นสารมาตรฐานภายใน อาศัยการเกิดปฏิกิริยากับ NBD-Cl ภายใต้สภาวะที่เป็นเบสเพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่สามารถเกิดฟลูออเรสเซนต์ได้ จากนั้นทำการแยกสารผสมและตัวรบกวนออกจากกันโดยใช้เทคนิค HPLC และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามข้อกำหนดของ US FDA guideline 2013 และ EMEA guideline 2011

ผลการพัฒนาการสกัด pregabalin ออกจากตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วย ACN มีประสิทธิภาพในการสกัดสูงมากมีค่า % recovery ของการสกัดอยู่ในช่วง 94.76 - 103.57% และผลการวิเคราะห์ซ้ำให้ค่า % CV น้อยกว่า 5% ซึ่งให้ผลดีกว่าการศึกษาของ Mandal และคณะ[11] ที่ได้ค่า % recovery อยู่ในช่วง 80.45 – 89.12% และ % CV มากกว่า 6% และการศึกษาของ Vaidya และคณะ[10] ที่ได้ค่า % recovery เฉลี่ยเท่ากับ 69.99% และ % CV มากกว่า 5%

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดอนุพันธ์ระหว่าง pregabalin กับ NBD-Cl จากการศึกษาข้อมูลย้อนหลังพบว่าเคยมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ pregabalin โดยใช้ NBD-Cl เป็น derivatizing agent เพียง 1 รายงาน คือการศึกษาของ Onal และ Sagirli[16] ที่วิเคราะห์ pregabalin ในผลิตภัณฑ์ยาสำเร็จรูปด้วยวิธี spectrofluorometry และ spectrophotometry ซึ่งวิธีนี้ไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาเพื่อศึกษาชีวสมมูลหรือเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) ผู้วิจัยจึงได้ดัดแปลงวิธีการเกิดอนุพันธ์ของการศึกษาดังกล่าวมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ pregabalin ในตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธี HPLC โดยศึกษาผลของ pH ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาและความเข้มข้นของ HCl ที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถให้ความไวในการวิเคราะห์สูง (20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับวิธีเดิมคือ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และอนุพันธ์ที่ได้มีความคงตัวนานกว่าวิธีเดิม (มีความคงตัวอย่างน้อย 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับวิธีเดิมคือ 12 ชั่วโมง) และในการเตรียมตัวอย่างของวิธีที่พัฒนาขึ้นไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดสารอนุพันธ์ด้วยคลอโรฟอร์มเหมือนวิธีเดิม จึงทำให้ลดขั้นตอนการสกัดและลดความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมจากการใช้คลอโรฟอร์ม

กลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง pregabalin กับ NBD-Cl ใช้ปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์ (nucleophilic substitution) ในสภาวะเบส อนุพันธ์ที่ได้มีสีเขียวอมเหลือง ได้โครงสร้างทางเคมีที่สามารถเกิดฟลูออเรสเซนต์ได้เนื่องจากโครงสร้างของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น conjugate double-bonds, aromatic rings, rigid planar structures และในโครงสร้างไม่มีหมู่ halogen (Cl) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ลดลง ซึ่งในการเกิดปฏิกิริยามีขั้นตอนย่อยอยู่ 2 ขั้นตอน ดังแสดงในรูปที่ 4 โดยในขั้นตอนที่ 1 อะตอมของไนโตรเจนในหมู่เอมีนปฐมภูมิ (primary amine) ของ pregabalin มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว มีสภาพขั้วเป็นลบและมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา ทำหน้าที่เป็น nucleophile สามารถเกิดปฏิกิริยากับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ในโครงสร้างของ NBD-Cl ซึ่งมีความชอบลบ (electrophile) ขั้นตอนที่ 2 อะตอมคลอรีนที่ต่ออยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 หลุดออกไป เรียกหมู่นี้ว่า leaving group ซึ่งอนุพันธ์ที่ได้สามารถดูดกลืนแสง UV และสามารถเกิดฟลูออเรสเซนต์ได้



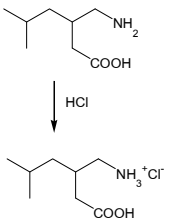
รูปที่ 4 แสดงปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ระหว่าง pregabalin กับ NBD-Cl

การศึกษา pH ที่ใช้ในการควบคุมสภาวะความเป็นเบสของระบบการเตรียมตัวอย่าง พบว่า peak area เพิ่มขึ้นตาม pH ที่สูงขึ้นตั้งแต่ในช่วง pH 8 - 11 แต่หลังจาก pH ในช่วงนี้เป็นต้นไป พบว่า paek area เริ่มลดลง เนื่องจากสภาวะที่เป็นเบสมากเกินไป NBD-Cl บางโมเลกุลสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสไปเป็น NBD-OH ซึ่ง NBD-OH ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ pregabalin ทำให้ peak area ลดลง ดังนั้นจึงเลือก pH 11 เป็น pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง pregabalin กับ NBD-Cl เนื่องจากให้ peak area จากการวิเคราะห์สูงที่สุด

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาโดยการตรวจวัดสัญญาณของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 25 นาทีพบว่าสารอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นในช่วงเวลา 5 - 20 นาที มี peak area เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาแต่หลังจากระยะเวลา 20 นาที peak area ที่ได้เริ่มคงที่ ในการทดลองเลือกใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา 15 นาทีเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมเนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่สารอนุพันธ์เกิดขึ้นได้สัญญาณที่สูงโดยที่ใช้ระยะเวลาสั้นในการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งจากผลการทดลองที่เวลา 20 นาที ให้สัญญาณในการวิเคราะห์สูงสุด แต่พบว่าการให้ความร้อนที่นานเกินไปส่งผลต่อความสะอาดของตัวอย่าง เนื่องจาก

โปรตีนที่เหลือในระบบเสียสภาพเมื่อได้รับความร้อนที่นานเกินไป ทำให้เกิดสัญญาณรบกวนการวิเคราะห์เพิ่มมากขึ้น

การศึกษาความเข้มข้นของ HCl ที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา พบว่าที่ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เพียงพอสำหรับใช้หยุดปฏิกิริยาของ pregabalin และ gabapentin เนื่องจากในสภาวะกรด NBD-Cl ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ pregabalinได้เพราะหมู่ primary amine ($-NH_2$) ในโมเลกุลของ pregabalin มีสมบัติเป็นเบสอ่อนสามารถทำปฏิกิริยากับ HCl ได้ผลิตภัณฑ์เป็น NH_3^+ ซึ่งเป็นเกลือที่ละลายน้ำได้ ดังแสดงในรูปที่ 5 และเกลือเอมีนที่เกิดขึ้นมีสมบัติเป็น electrophile จึงไม่สามารถทำปฏิกิริยากับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ในโครงสร้างของ NBD-Cl



รูปที่ 5 แสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง pregabalin กับ HCl

การศึกษาการสกัด pregabalin ออกจากตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนพบว่าชนิดของสารที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่เหมาะสม คือ ACN โดยใช้อัตราส่วนของพลาสมาต่อ ACN เท่ากับ 1 : 2.5 โดยปริมาตร เพราะปริมาณดังกล่าวเพียงพอที่จะกำจัดโปรตีนไม่ให้เกิดการอุดตันในคอลัมน์ได้ ให้ผลการสกัดซ้ำที่แม่นยำที่สุดและสัญญาณในการวิเคราะห์ไม่ต่ำเกินไป ACN สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ดีที่สุดซึ่งพิจารณาจากสารละลายที่ได้หลังจากการตกตะกอนโปรตีนมีความใสกว่าการใช้ MeOH และ TCA เมื่อเปรียบเทียบในปริมาณที่เท่ากัน และเมื่อฉีดสารเข้าเครื่อง HPLC ไม่พบสารรบกวนการวิเคราะห์ แต่การใช้ MeOH สกัดพบสัญญาณรบกวนที่เวลาใกล้เคียงกับ retention time ของ pregabalin จึงส่งผลให้การวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง ซึ่งการที่ ACN สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ดีกว่า MeOH สามารถอธิบายได้โดย ACN มีค่าคงที่ไดอิเลคตริค (dielectric constant) ต่ำกว่า MeOH จึงสามารถลดค่าการละลายระหว่างน้ำกับโปรตีนได้ดีกว่า โดยเมื่อเพิ่มปริมาณของ ACN มากขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงจุดที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนมีค่าสูงกว่าแรงกระทำระหว่างโปรตีนกับน้ำ จะทำให้เกิดการรวมตัวกันของโมเลกุลโปรตีนตกตะกอนลงมาได้ ส่วนการใช้ TCA สามารถตกตะกอนโปรตีนได้โดยใช้หลักการที่ว่าในสภาวะที่เป็นกรด โปรตีนจะมีประจุเป็นบวกจึงสามารถจับกับประจุลบของโมเลกุลที่เป็นลบของสารละลาย TCA และตกตะกอนลงมาได้ แต่สารละลายหลังจากการตกตะกอนโปรตีนมี pH อยู่ในช่วงที่เป็นกรดจึงไม่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ทำปฏิกิริยากับ NBD-Cl

วิธีวิเคราะห์ pregabalin ที่พัฒนาขึ้นเป็นวิธีที่มีความจำเพาะเนื่องจากไม่พบสัญญาณรบกวนที่ retention time ของ pregabalin และ gabapentin และ NBD-Cl มีความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยากับหมู่เอมีนจึงทำให้เกิดสัญญาณรบกวนการวิเคราะห์น้อย อนุพันธ์ที่เกิดขึ้นสามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ได้จึงทำให้มีความไวในการวิเคราะห์สูง สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ pregabalin ที่ความเข้มข้นต่ำถึงระดับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ อนุพันธ์ที่เกิดขึ้นมีความคงตัวเป็นเวลานานจึงเหมาะสำหรับการวิเคราะห์แบบต่อเนื่อง การสกัดสารตัวอย่างทำได้ง่ายเพียงขั้นตอนเดียวและมีประสิทธิภาพในการสกัดสูง การวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ใช้เวลาเพียง 11 นาทีในการวิเคราะห์สาร 1 ตัวอย่าง ซึ่งใช้เวลาสั้นกว่าวิธีของ Bockbrader และคณะซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์ 20 นาที[27] จึงเหมาะกับการนำไปศึกษาชีวสมมูลที่ต้องใช้ตัวอย่างในการวิเคราะห์เป็นจำนวนมาก กราฟมาตรฐานมีช่วงความเข้มข้นที่กว้าง (20 – 1,000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ pregabalin ในผู้ป่วยที่ได้รับยาในขนาดตั้งแต่ 25 - 400 มิลลิกรัม (ค่า C_{max} อยู่ในช่วง 864 – 8990 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)[28,29] ในการนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง สามารถเลือกบางช่วงของกราฟมาตรฐานไปใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานใหม่ให้เหมาะสมกับระดับความเข้มข้นของ pregabalin ในตัวอย่าง วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องมากกว่าวิธีของ Ahmadkhaniha และคณะ[28] และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นกว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นได้รับการตรวจสอบความถูกต้องตามเกณฑ์การยอมรับของ US FDA guideline 2013 และ EMEA guideline 2011 และสามารถผ่านเกณฑ์การยอมรับทุกหัวข้อจึงมีความน่าเชื่อถือถ้านำวิธีการวิเคราะห์นี้ไปทำการวิเคราะห์ระดับยา pregabalin ในพลาสมามนุษย์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยเภสัชจลนศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนวัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่สำหรับการทำวิจัย และงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

References

1. Uma G, Manimala M, Vasudevan M, Karpagam S, Deecarman M. LC-MS-MS method for the determination of pregabalin in human plasma. *Int J Pharm PharmSci* 2011;4:108-112.
2. Vermeij TAC, Edelbroek PM. Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of pregabalin, gabapentin and vigabatrin in human serum by precolumn derivatization with *o*-phtaldialdehyde and fluorescence detection. *J Chromatogr B* 2004;810:297–303.
3. Arain AM. Pregabalin in the management of partial epilepsy. *Neuropsychiatr Des Treat* 2009;5:407-413.

4. Bockbrader HN, Wesche D, Miller R, Chapel S, Janiczek N, Burger P. A comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pregabalin and gabapentin. *Clin Pharmacokinet* 2010;49(10):661-669.
5. Thejaswini JC, Gurupadayya BM, Raja P. Gas chromatographic determination of pregabalin in human plasma using ethyl chloroformate derivatizing reagent. *J Pharm Res* 2012;5(6):3112-3115.
6. Sowjanya K, Thejaswini JC, Gurupadayya BM, Indupriya M. Spectrophotometric determination of pregabalin using Gibb's and MBTH reagent in pharmaceutical dosage form. *Der Pharma Chemica* 2011;3(1):112-122.
7. Nirogi R, Kandikere V, Mudigonda K, Komarneni P, Aleti R. Liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry method for the quantification of pregabalin in human plasma. *J Chromatogr B* 2009;877:3899–3906.
8. Pfizer Canada Inc. Product monograph. (Accessed on July 2, 2013, at http://www.pfizer.ca/en/our_products/ products/monograph/141)
9. Shah GR, Ghosh C, Thaker BT. Determination of pregabalin in human plasma by electrospray ionisation tandem mass spectroscopy. *J Adv Pharm Tech Res* 2010;1:354-357.
10. Vaidya VV, Yetal SM, Roy SMN, Gomes NA, Joshi SS. LC-MS–MS Determination of pregabalin in human plasma. *Chromatographia* 2007; 66:925–928.
11. Mandal U, Sarkar AK, Gowda KV, et al. Determination of pregabalin in human plasma using LC-MS-MS. *Chromatographia* 2008;67:237–243.
12. Heltsley R, DePriest A, Black DL, Robert T, Caplan YH, Cone EJ. Urine drug testing of chronic pain patients. IV. Prevalence of gabapentin and pregabalin. *J Anal Toxicol* 2011;35:357-359.
13. Mudiam MKR, Chauhan A, Jain R, Fatima G, Malhotra E, Murthy RC. Development, validation and comparison of two microextraction techniques for the rapid and sensitive determination of pregabalin in urine and pharmaceutical formulations after ethyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography–mass spectrometric analysis. *J Pharm Biomed Anal* 2012;70:310-319.
14. Dahl SR, Olsen KM, Strand DH. Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB), beta-hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butanediol (1,4BD) and gamma-butyrolactone (GBL) in whole blood and urine samples by UPLC–MSMS. *J Chromatograph B* 2012;885-886:37–42.
15. Beni S, SohajdaT, Neumajera G, Ivanyi R, Szente L, Noszal B. Separation and characterization of modified pregabalins in terms of cyclodextrincomplexation, using capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance. *J Pharm and Biomed Anal* 2010;51:842–852.
16. Onal A, Sagirli O. Spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for the determination of pregabalin in bulk and pharmaceutical preparation. *Spectrochimica Acta Part A* 2009;72:68–71.
17. Abdel R, Shaalan A. Spectrofluorimetric and spectrophotometric determination of pregabalin in capsules and urine samples. *Int J Biomed Sci* 2010;6(3):250-267.
18. Gujral RS, Haque SM, Shanker P. A Sensitive spectrophotometric method for the determination of pregabalin in bulk, pharmaceutical formulations and in human urine samples. *Int J Biomed Sci* 2009;5: 421-427.
19. Bali A, Gaur P. A novel method for spectrophotometric determination of pregabalin in pure form and in capsules. *Chemistry Central J* 2011; 59:1-7.
20. Dousa M, Gibala P, Lemr K. Liquid chromatographic separation of pregabalin and its possible impurities with fluorescence detection after postcolumn derivatization with o-phtaldialdehyde. *J Pharm Biomed Anal* 2010;53:717–722.
21. Mercolinia L, Mandriolia R, Amoreb M, Raggia MA. Simultaneous HPLC-F analysis of three recent antiepileptic drugs in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2010;53:62–67.
22. Mishra SK, gurupadhyya BM, Verma S. Stability RP-HPLC method for determination of pregabalin using ICH guidelines. *Int J Nat Pro Sci* 2012;1:115.
23. Hao F, Lwin T, Bruckard WJ and Woodcock JT. Determination of aliphatic amines in mineral flotation liquors and reagents by high-performance liquid chromatography after derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan. *J Chromatograph A* 2004;1055(1-2):77-85.
24. Elbashir AA, Suliman FEO and Aboul-Enein HY. The application of 7-chloro-4-nitrobenzoxadiazole (NBD-Cl) for the analysis of pharmaceutical-bearing amine group using spectrophotometry and spectrofluorometry techniques. *Appl Spectro Rev* 2011;46:222–241.
25. US FDA Guidance for Industry: Bioanalytical method validation 2013. (Accessed on Jan, 22, 2014, at www.fda.gov/downloads/drugs/ guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf.)
26. EMEA Guideline on bioanalytical method validation 2011. (Accessed on Jan. 20, 2014 at www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_ library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.
27. Martinc B, Roškar R, Grabnar I, Vovk TJ. Simultaneous determination of gabapentin, pregabalin, vigabatrin, and topiramate in plasma by HPLC with fluorescence detection. *Chromatogr B* 2014;962:82-88.
28. Bockbrader HN, Strand JC, Randinitis EJ, Boyd RA. Clinical pharmacokinetics of pregabalin in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2010;50:941-950.
29. Ahmadkhaniha R., Mottaghi S., Zargarpoor M., Souri E. Validated HPLC method for quantification of pregabalin in human plasma using 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene as derivatization agent. *Chromatogr Res Inter* 2014, Article ID 450461, 6 pages. http://dx.doi.org/10.1155/ 2014/450461.

Editorial note
Manuscript received in original form on February 12, 2014; accepted in final form on December 18, 2014