วิธีการสกัดยาจากตัวอย่างชีวภาพเพื่อการศึกษาชีวสมมูล

ภญ.เอกวรรณ อยู่สกุล
กลุ่มศึกษาชีวสมมูล

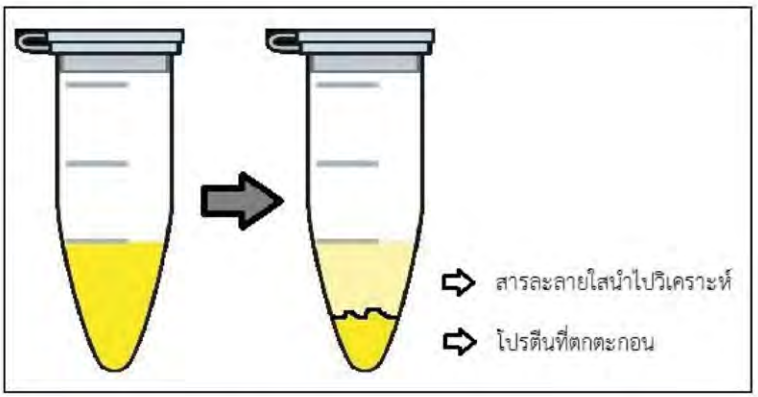
ปัจจุบันเราจะเห็นได้ว่ามีผลิตภัณฑ์ยาหลากหลายยี่ห้อที่มีตัวยาสำคัญตัวเดียวกันวางจำหน่าย ทั้งยาต้นแบบซึ่งมีราคาสูง เนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และยาสามัญที่มีตัวยาสำคัญเดียวกัน มีความแรงเท่ากัน และมีวิธีการให้ยาที่เหมือนกัน แต่มีราคาที่ถูกกว่า แล้วยาทั้ง 2 ตำรับมีความแตกต่างกันหรือไม่ จะให้ผลการรักษาที่เหมือนกันหรือไม่ สิ่งหนึ่งที่สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการยืนยันถึงความเท่าเทียมกันทางผลการรักษาของยาเหล่านั้นได้ คือ การศึกษาชีวสมมูล หรือ bioequivalence study ซึ่งเป็นการศึกษา bioavailability หรือชีวประสิทธิผลของยา ในรูปแบบอัตราเร็ว และปริมาณของยาที่เข้าสู่ร่างกาย โดยการวัดจากความเข้มข้นของยาในเลือดหลังจากได้รับยานั้นเข้าไปโดยใช้หลักการที่ว่า ณ เวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับยา ผลิตภัณฑ์ยาที่มีระดับยาในเลือดอยู่ในระดับเดียวกัน ความเข้มข้นของยาในตำแหน่งของการออกฤทธิ์มีค่าใกล้เคียงกัน ผลการรักษาของผลิตภัณฑ์ยาเหล่านั้นน่าจะเหมือนกัน

การศึกษาชีวสมมูลคือการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยา 2 ตำรับ ได้แก่ ยาต้นแบบ และยาสามัญ ทำได้โดยเริ่มจากการให้ยาต้นแบบหรือยาสามัญตำรับใดตำรับหนึ่งกับอาสาสมัครสุขภาพดี และทำการเจาะเลือดหรือตัวอย่างชีวภาพที่เหมาะสม (เช่น พลาสมา ซีรั่ม น้ำลาย ปัสสาวะ เป็นต้น) จากอาสาสมัคร ณ เวลาต่าง ๆ ทั้งก่อนและหลังได้รับยา หลังจากนั้นอาสาสมัครจะได้รับยาอีกตำรับหนึ่ง และได้รับการเก็บตัวอย่างชีวภาพ ณ เวลาต่าง ๆ เช่นเดียวกัน โดยจะเว้นช่วงเวลาระหว่างการได้รับยาทั้ง 2 ตำรับนั้นเพื่อให้แน่ใจว่ายาที่ได้รับไปในคราวแรกได้ถูกกำจัดออกจากร่างกายหมดไปแล้ว จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ได้จากอาสาสมัคร ณ เวลาต่าง ๆ จากการได้รับยาทั้ง 2 ตำรับมาวัดระดับยา ซึ่งจะต้องทำการสกัดยาออกจากตัวอย่างนั้น แล้วนำมาตรวจวัดหาระดับยาด้วยเครื่องมือและวิธีที่เหมาะสม มีความถูกต้อง แม่นยำ และจำเพาะ โดยที่นิยมใช้กันคือ Liquid Chromatography Mass Spectrometry

ขั้นตอนการสกัดยาออกจากตัวอย่างชีวภาพเป็นอีกขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญ เนื่องจากจะต้องทำการเตรียมตัวอย่างให้มีความสะอาดมากพอที่จะทำการวิเคราะห์ เพื่อไม่ให้มีสิ่งรบกวนอื่น ๆ ที่จะไปมีผลต่อการตรวจวัดปริมาณยาที่ต้องการ วิธีการสกัดที่ดีจะต้องสามารถแยกยาที่ต้องการออกจากสิ่งรบกวนต่าง ๆ ได้ดี ทำให้การวิเคราะห์หาปริมาณยาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ มีความรวดเร็ว และถูกต้องแม่นยำ ซึ่งวิธีการสกัดยามีด้วยกันหลายวิธี ในที่นี้จะขอกล่าวถึงวิธีการสกัด 3 วิธีที่นิยมใช้ในการศึกษาชีวสมมูล ดังนี้

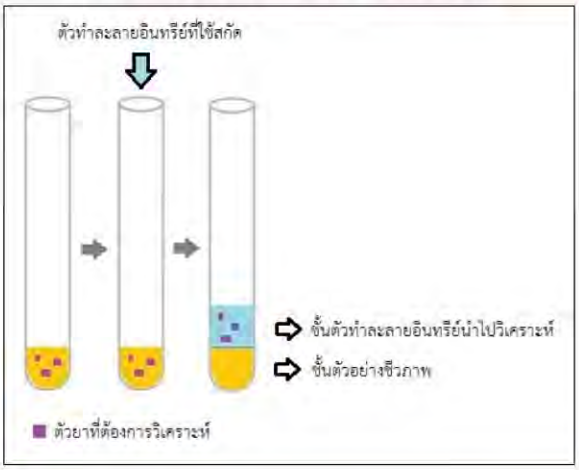
1. การตกตะกอนโปรตีน (Protein precipitation)

เนื่องจากในตัวอย่างชีวภาพมีส่วนประกอบของโปรตีน ซึ่งเป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่อยู่มาก หากสามารถแยกโปรตีนออกจากตัวอย่างชีวภาพได้ จะเป็นการกำจัดสิ่งรบกวนต่อการวิเคราะห์ออกไป วิธีนี้ทำได้โดยการเติมสารที่มีคุณสมบัติในการตกตะกอนโปรตีนออกจากตัวอย่างลงไป ทำให้แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน และสามารถนำส่วนที่เป็นสารละลายใสไปทำการวิเคราะห์ต่อได้ ซึ่งสารจำพวกนี้ได้แก่ สารละลายอินทรีย์ (Organic solvent) เช่น methanol acetonitrile หรือจำพวกสารละลายกรด เบส หรือเกลือที่มีความเข้มข้นสูง เป็นต้น



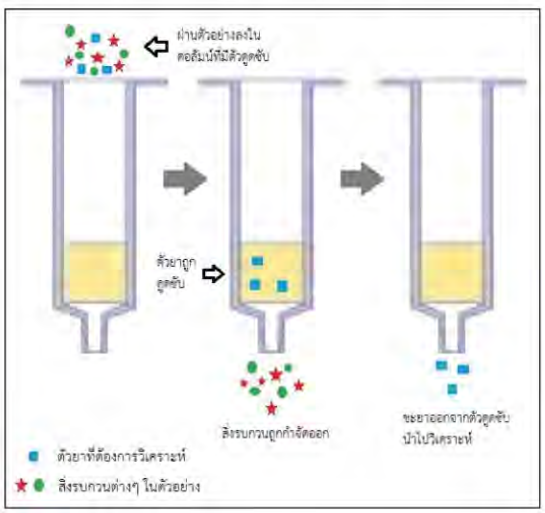
รูปที่ 1 การตกตะกอนโปรตีน (Protein precipitation)

2. **การสกัดด้วยตัวทำละลาย** (Liquid-liquid extraction; LLE) คือการสกัดแยกตัวยาที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากตัวอย่างซึ่งอยู่ในสถานะของเหลวด้วยตัวทำละลายที่เป็นของเหลวซึ่งไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกันกับตัวอย่าง และตัวยาที่ต้องการวิเคราะห์มีความชอบที่จะละลายในตัวทำละลายมากกว่าในตัวอย่างชีวภาพ โดยใช้หลักการ like dissolves like กล่าวคือสารที่มีขั้วจะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว ในที่นี้ก็คือน้ำหรือชั้นของตัวอย่าง ส่วนสารที่ไม่มีขั้วจะละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ซึ่งก็คือตัวทำละลายที่ใส่เข้าไปนั่นเอง ตัวทำละลายที่นิยมใช้มักเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ diethyl ether, ethyl acetate, hexane เป็นต้น ซึ่งไม่รวมตัวกับน้ำ และมีจุดเดือดไม่สูงมาก เพื่อให้สามารถระเหยเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์ได้



รูปที่ 2 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Liquid-liquid extraction)

3. **การสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง** (Solid-phase extraction; SPE) เป็นวิธีสกัดยาออกจากตัวอย่างโดยการผ่านตัวอย่างลงในคอลัมน์เล็ก ๆ ที่มีตัวดูดซับบรรจุอยู่ ตัวยาจะถูกดูดซับไว้กับตัวดูดซับในขณะที่สารอื่น ๆ จะผ่านออกมา จากนั้นจึงใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมชะยาออกจากตัวดูดซับและนำไปวิเคราะห์ต่อไป



รูปที่ 3 การสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid-phase extraction)

จากวิธีการสกัดยาที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากตัวอย่างชีวภาพทั้ง 3 วิธี ที่ได้กล่าวข้างต้นนั้น แต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกัน กล่าวคือ วิธีการตกตะกอนโปรตีนเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว สะดวก ใช้เวลาและสารเคมีไม่มาก แต่ยังคงพบสิ่งรบกวนอื่น ๆ อยู่ในตัวอย่างอยู่มาก รวมถึงไม่เหมาะกับยาที่มีความสามารถจับกับโปรตีนได้ดีเพราะอาจสูญเสียไปกับโปรตีนที่ตกตะกอนออกมาได้ ส่วนวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย เนื่องด้วยตัวทำละลายที่นิยมใช้มักเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถระเหยได้ ซึ่งส่วนใหญ่มีพิษและเป็นอันตรายต่อสุขภาพ รวมถึงบางชนิดมีความสามารถในการติดไฟ และระเบิดได้ จึงต้องมีความระมัดระวังในการใช้ แต่ตัวอย่างที่ได้จากวิธีการสกัดนี้จะสามารถกำจัดสิ่งรบกวนออกไปได้มากกว่าวิธีการตกตะกอนโปรตีน และจากการที่ใช้สารที่สามารถระเหยได้จึงทำให้ตัวอย่างมีความเข้มข้นมากขึ้น ทำให้วิเคราะห์ได้ง่ายขึ้น ส่วนวิธีการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง เป็นวิธีที่มีหลายขั้นตอน ใช้เวลาในการสกัดนาน และมีต้นทุนสูง เนื่องจากคอลัมน์ที่บรรจุตัวดูดซับมีราคาแพง แต่ก็เป็นวิธีที่ทำให้ได้ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่มีความสะอาดที่สุด สามารถกำจัดสิ่งรบกวนออกไปได้มากที่สุด จึงเหมาะสมที่จะใช้ในการสกัดยาที่ความเข้มข้นต่ำ หรือเป็นยาที่จะถูกสารอื่น ๆ ในตัวอย่างรบกวนในการวิเคราะห์มาก

แต่อย่างไรก็ตาม การเลือกวิธีสกัดยาออกจากตัวอย่างชีวภาพที่เหมาะสมต้องพิจารณาจากคุณสมบัติต่าง ๆ ทั้งทางกายภาพและเคมีของตัวยาที่ต้องการวิเคราะห์และนำมาปรับใช้กับวิธีการสกัดต่าง ๆ เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่ดี สะอาด ปราศจากสิ่งรบกวน และมีความเข้มข้นเพียงพอที่จะนำไปวิเคราะห์ต่อได้ ประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสามารถพิจารณาได้จากค่า % recovery ซึ่งคำนวณได้จากการนำสิ่งที่วัดได้ จากตัวอย่างที่ผ่านการสกัด เทียบกับสิ่งที่วัดได้จากตัวอย่างที่ไม่ผ่านการสกัดในความเข้มข้นของตัวยาที่ใส่ลงไปในตัวอย่างแต่ละชนิดเท่ากัน เพื่อดูว่าสามารถสกัดตัวยาออกมาได้เท่าไร วิธีการสกัดยาที่ดีคือวิธีที่สามารถสกัดยาออกมาได้มาก คือมี % recovery สูงใกล้ 100 % และสม่ำเสมอในทุก ๆ ความเข้มข้น (% recovery ในตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันควรมีความใกล้เคียงกัน) รวมถึงสามารถทำซ้ำแล้วได้ผลใกล้เคียงกัน ซึ่งวิธีการสกัดและวิเคราะห์ตัวยาในตัวอย่างชีวภาพจะได้รับการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยกระบวนการ method validation โดยทำตามข้อกำหนดและแนวทางจากองค์กรที่เป็นสากล เช่น European Medicines Agency Guideline, US FDA เป็นต้น ก่อนจะนำวิธีวิเคราะห์นั้นมาวิเคราะห์ตัวอย่างจากอาสาสมัครในการทำชีวสมมูล เพื่อให้ได้วิธีที่มั่นใจแล้วว่า มีความถูกต้อง แม่นยำ มีประสิทธิภาพ และสามารถทำให้ได้ผลการศึกษาชีวสมมูลที่ถูกต้อง

จากที่กล่าวมา จึงเห็นได้ว่าการหาวิธีการสกัดยาที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากตัวอย่างชีวภาพถือว่าเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญในการศึกษาชีวสมมูล เนื่องจากคุณสมบัติที่แตกต่างกันของยาแต่ละตัวทำให้ต้องมีวิธีการสกัดที่เหมาะสมกับยานั้น ๆ เพื่อให้ได้วิธีการวิเคราะห์ที่ดี นำไปสู่ผลการศึกษาชีวสมมูลที่ถูกต้อง เพื่อประโยชน์ในการเข้าถึงยาที่มีประสิทธิภาพเท่าเทียมกับยาต้นแบบที่มากขึ้น