การวิเคราะห์ปริมาณไดอะซีแพมในเลือดและปัสสาวะโดยเทคนิค HPLC

Analysis of Diazepam in Blood and Urine by HPLC Technique

ทิพยาภรณ์ วินิจสร และ ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง

สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร เมือง นครปฐม 73000

บทคัดย่อ

ไดอะซีแพมเป็นยาที่ใช้รักษาความวิตกกังวลและคลายเครียด งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณไดอะซีแพมในเลือดและปัสสาวะ ที่เวลาต่างๆ หลังได้รับยา ในงานวิจัยนี้ตัวอย่างเลือดและปัสสาวะสกัดโดยใช้ SPE (C18) แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC) คอลัมน์ที่ใช้ คือ reverse phase (RP-18) โดยใช้ UV-Vis เป็นเครื่องตรวจวัด ได้กราฟมาตรฐานในการหาไดอะซีแพมในเลือดและปัสสาวะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 50-500 ng/ml ค่า r^2 มากกว่า 0.9620 มีค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) ของการวิเคราะห์ไดอะซีแพมในตัวอย่างปัสสาวะและเลือด 98.40 ng/ml และ 3 ng/ml ตามลำดับ ในขณะที่ค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) สำหรับการวิเคราะห์ไดอะซีแพมในปัสสาวะ 138.82 ng/ml และสำหรับการวิเคราะห์ในเลือด 10 ng/ml ผลการวิเคราะห์ปริมาณไดอะซีแพมในตัวอย่างปัสสาวะของอาสาสมัครที่ได้รับยา 4 mg เก็บตัวอย่างที่เวลา 6 12 และ 24 ชั่วโมง ตรวจไม่พบไดอะซีแพมในตัวอย่างปัสสาวะ อย่างไรก็ตามในตัวอย่างเลือดอาสาสมัครที่ได้รับไดอะซีแพม 5 mg เก็บตัวอย่างเลือดที่เวลา 4 6 12 24 และ 36 ชั่วโมง พบไดอะซีแพมในตัวอย่างเลือดในช่วงความเข้มข้น 28-91 ng/ml งานวิจัยนี้นำมาประยุกต์ใช้ในการสืบสวนทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้

คำสำคัญ: ไดอะซีแพม ปัสสาวะ เลือด โครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง

Abstract

Diazepam is widely used for the therapy of anxiety and for a hypnotic. The purpose of this study was to determine the amount of diazepam in blood and urine samples at various times after drug administering. In this research, urine and blood samples were extracted using SPE (C18) and then were analyzed by High-performance liquid chromatography (HPLC) using reverse phase (RP-18) column with UV-Vis Spectrophotometer as the detector. The calibration curves for both diazepam in urine and in blood samples showed a good linearity (r^2>0.9620) over the 50-500 ng/ml concentration range. The limits of detection (LOD) were 98.40 ng/ml and 3 ng/ml while the limits of quantification (LOQ) were 138.82 ng/ml in urine and 10 ng/ml for diazepam in blood. Diazepam was not detected in the urine samples of those who received 4.0 mg of diazepam collecting at 6, 12 and 24 hours after drug administering. However, in blood samples of those who received 5.0 mg of diazepam collecting at 4, 6, 12, 24 and 36 hours after drug administering. The amount of diazepam in the range of 28-91 ng/ml can be found. The method used in this work can be applied to forensic investigation of cases involving diazepam usage.

Keywords: Diazepam, urine, blood HPLC

บทนำ

ปัญหาทางเศรษฐกิจและสังคมในปัจจุบันทำให้คดีอาชญากรรมเพิ่มขึ้น คดีอาชญากรรมหลายคดีมียากลุ่มเบนโซไดอะซีปีนเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น การผสมในอาหารหรือเครื่องดื่ม ทำให้ผู้รับยาขาดสติ หรือความมีสติลดลง ไม่รู้สึกตัว จำเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นไม่ได้ เมื่อเกิดกรณีเช่นนี้ จะยากในการหาตัวผู้ทำผิดมาลงโทษ

ไดอะซีแพมเป็นยาในกลุ่มเบนโซไดอะซีปีนที่มีประโยชน์ทางการแพทย์ นิยมใช้และหาซื้อง่าย ออกฤทธิ์กดการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง ใช้รักษาการนอนไม่หลับ คลายความกังวล แก้ชัก รักษาโรคลมบ้าหมู ยาดูดซึมในทางเดินอาหารเร็ว การขับออกของตัวยาและเมตาบอไลท์ที่ไต ขับออกทางปัสสาวะ อาการข้างเคียงที่พบ เช่น อ่อนเพลีย ปวดศีรษะ ตาพร่า วิงเวียน ปากแห้ง ลิ้นขม คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย [1]

การศึกษานี้จะตรวจหาและวิเคราะห์ยากลุ่มเบนโซไดอะซีปีน ในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของผู้ได้รับยา โดยศึกษาผลของปริมาณยาและระยะเวลาหลังรับยา ต่อปริมาณที่ตรวจพบในเลือดและปัสสาวะ เพื่อประโยชน์ต่อการสืบสวนสอบสวนคดีทางนิติวิทยาศาสตร์

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. ทดสอบความจำเพาะของวิธี (specificity) เตรียมสารละลายมาตรฐานไดอะซีแพมในปัสสาวะที่ปราศจากไดอะซีแพม 2,000 ng/ml ตัวอย่างปัสสาวะ 2 ml มาปรับให้มีค่า pH 5.0 ด้วย 1 M กรด acetic นำไป vortex 30 วินาที centrifuge 1,000 rpm 5 นาที กรองส่วนใสผ่านคอลัมน์ SPE (C18) ยี่ห้อ AccuBond เริ่มต้นล้างคอลัมน์ด้วย acetonitril 3 ml ตามด้วยน้ำ 3 ml นำส่วนใสจากการ centrifuge มากรองผ่านคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ชะคอลัมน์ด้วยน้ำ 3 ml methanol 4 ml และ acetonitril 2 ml ตามลำดับ นำส่วนที่ได้มาทำให้เข้มข้นโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน ให้มีปริมาตร 500 µl นำ vial ที่ได้ไปทดสอบโดยใช้เทคนิค HPLC หา retention time

เตรียมสารละลายมาตรฐานไดอะซีแพมในซีรัมที่ปราศจากไดอะซีแพม 1,000 ng/ml กรองผ่าน คอลัมน์ SPE (C18) ยี่ห้อ Drug Prep เริ่มต้นล้างคอลัมน์ด้วย methanol 1 ml ตามด้วยน้ำ 1 ml นำตัวอย่างซีรัม 1 ml กรองผ่านคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ชะคอลัมน์ด้วย 5% methanol 1 ml และ methanol 1 ml นำ vial ที่ได้ไปทดสอบ HPLC หา retention time

2. สร้างกราฟสารละลายมาตรฐา (calibration curve) นำสารละลายมาตรฐานไดอะซีแพม ที่เตรียมในปัสสาวะ และซีรัม ที่ความเข้มข้น 50-500 ng/ml ไปวิเคราะห์ นำผลการทดลองไปสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐานกับพื้นที่ใต้พีคของไดอะซีแพม

3. หาร้อยละการกลับคืน (% recovery) นำสารละลายมาตรฐานไดอะซีแพม ที่เตรียมในซีรัมที่มีความเข้มข้น 100 150 200 และ 300 ng/ml ตามลำดับไปวิเคราะห์ ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ นำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากการวิเคราะห์แต่ละครั้งไปคำนวณหาร้อยละการกลับคืน

4. หาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection: LOD) **และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ** (Limit of Quantitation:LOQ) นำสารสารละลายมาตรฐานไดอะซีแพม ที่ความเข้มข้น 100 150 200 และ 300 ng/ml ตามลำดับ ไปวิเคราะห์ ความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (แกน X) กับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (แกน Y) ได้สมการเส้นตรง ($y = mx + c$) ต่อกราฟให้ตัดแกน y ได้ค่า SD0 ไปคำนวณค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD = 3 x SD0) และ ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ = 10 x SD0) [2]

5. วิเคราะห์ตัวอย่าง วิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ได้รับไดอะซีแพม 4.0 mg เก็บปัสสาวะหลังได้รับยา 6 12 และ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่าง 2 ml มาปรับให้มีค่า pH 5.0 ด้วย 1 M กรด acetic นำไป vortex 30 วินาที centrifuge 1,000 rpm 5 นาที กรองส่วนใสผ่านคอลัมน์ SPE (C18) ยี่ห้อ AccuBond เริ่มต้นล้างคอลัมน์ด้วย acetonitril 3 ml ตามด้วยน้ำ 3 ml นำ

ส่วนใสที่ได้หลังจาก centrifuge กรองผ่านคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ชะคอลัมน์ด้วย น้ำ 3 ml methanol 4 ml และ acetonitril 2 ml ตามลำดับ นำส่วนที่ได้มาทำให้เข้มข้นโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน ให้ได้ปริมาตร 500 µl ทดสอบด้วยเทคนิค HPLC

การวิเคราะห์ตัวอย่างซีรัมจากผู้ได้รับไดอะซีแพม 5.0 mg เก็บหลังได้รับยา 4 6 12 24 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ ได้สารตัวอย่างทั้งหมด 5 ตัวอย่าง นำทุกตัวอย่างมากรองผ่านคอลัมน์ SPE (C18) ยี่ห้อ Silia prep การเตรียมการวิเคราะห์ เริ่มต้นล้างคอลัมน์ด้วย methanol 1 ml ตามด้วยน้ำ 1 ml นำตัวอย่าง 1 ml กรองผ่านคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ชะด้วย 5% methanol 1 ml และ methanol 1 ml ตามลำดับ นำไปทดสอบด้วยเทคนิค HPLC

สภาวะที่ใช้ในการทดลองเครื่อง HPLC

สภาวะสำหรับเทคนิค HPLC ของการวิเคราะห์ในตัวอย่างปัสสาวะ

Column	:	RP-18 GP 4.6 x 150 mm, 5 µm ยี่ห้อ Mightysil
Mobile phase	:	Acetonitril: DI water (45:55)
Flow rate	:	1.0 ml/min
Detector wavelength	:	240 nm
Injection volume	:	20 µl

สภาวะสำหรับเทคนิค HPLC ของการวิเคราะห์ในตัวอย่างซีรัม

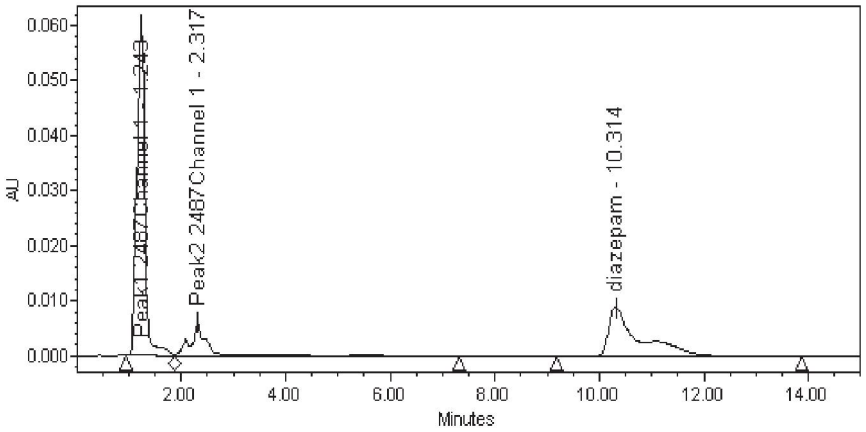
Column	:	RP-18 3.9 × 150 mm ยี่ห้อ Symmetry
Mobile phase	:	Methanol: DI water (60:40)
Flow rate	:	1.0 ml/min
Detector wavelength	:	254 nm
Injection volume	:	20 µl

ผลการศึกษา

การหาปริมาณไดอะซีแพมในเลือดและปัสสาวะ โดยเทคนิค HPLC มีผลการทดลอง ดังนี้

1. การวิเคราะห์หาปริมาณ ไดอะซีแพมในตัวอย่างปัสสาวะ

การตรวจวิเคราะห์ไดอะซีแพมในปัสสาวะที่ความเข้มข้น 2,000 ng/ml โดยเทคนิค HPLC ได้โครมาโทแกรม ไดอะซีแพม มี retention time 10.31 นาที (ภาพที่ 1)

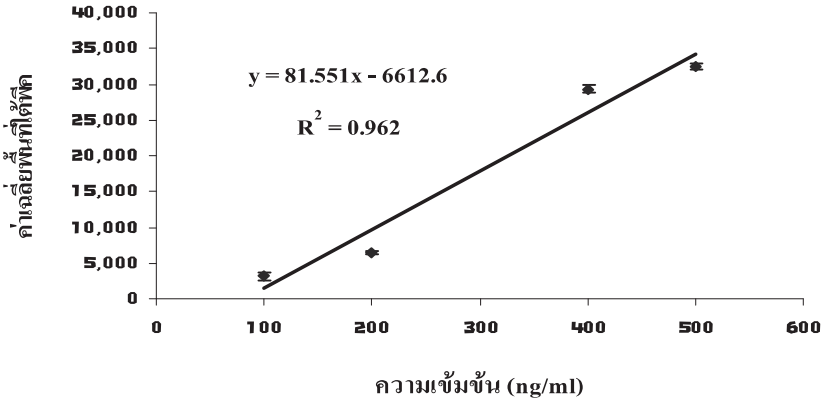


ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของไดอะซีแพม ความเข้มข้น 2,000 ng/ml

การศึกษาช่วงการวิเคราะห์ที่เป็นเส้นตรง (Linearity) ของไดอะซีแพม ศึกษาที่ความเข้มข้น 100 200 400 และ 500 ng/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยนำค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค กับความเข้มข้นสารมาตรฐานมาสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ได้สมการเส้นตรง คือ y = 81.551x - 6612.6 มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 0.962 (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของไดอะซีแพมในปัสสาวะ

ความเข้มข้น (ng/ml)	ค่าเฉลี่ย พื้นที่ใต้พีค	SD
100	3,123	612.892
200	6,497	248.359
400	29,288	570.285
500	32,503	385.53



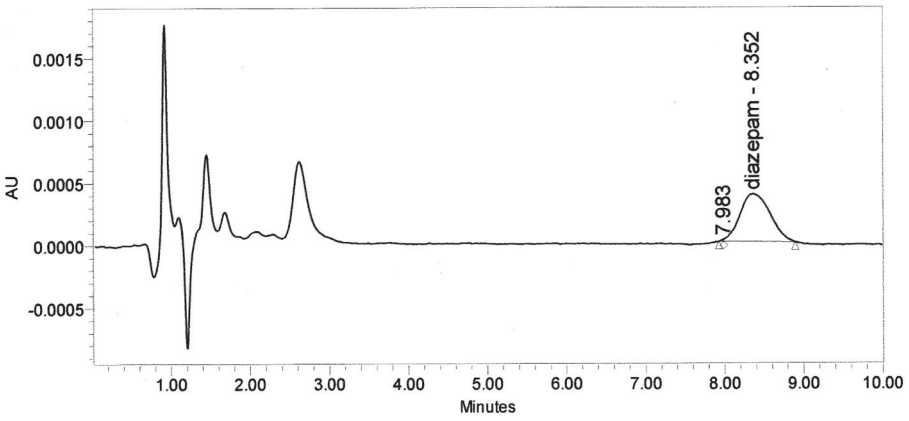
ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ของพื้นที่ใต้พีคไดอะซีแพมกับความเข้มข้น 100 ถึง 500 ng/ml ในปัสสาวะ

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ค่าขีดจำกัดของการตรวจในการวิเคราะห์ไดอะซีแพมด้วยเทคนิค HPLC หาได้จากค่า $3SD_{blank}$ ของความเข้มข้นต่ำสุดของการวิเคราะห์ ไดอะซีแพม แล้วแทนค่าในสมการเส้นตรงจากสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) หาค่า x ได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่เทคนิค HPLC วิเคราะห์ได้ โดยค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดไดอะซีแพมในปัสสาวะ 98.40 ng/ml และค่าขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ หาได้จากค่า $10SD_{blank}$ ของความเข้มข้นต่ำสุดในการวิเคราะห์ไดอะซีแพม แล้วแทนค่าลงในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน (calibration curve) เพื่อหาค่า x ได้ 138.82 ng/ml

จากการวิเคราะห์ปริมาณไดอะซีแพมในปัสสาวะของผู้ได้รับไดอะซีแพม 4 mg ผู้ทดลองหนัก 43 กิโลกรัม ตามระยะเวลา 6 12 และ 24 ชั่วโมง ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ไดอะซีแพมได้ เนื่องจากค่าครึ่งชีวิตของไดอะซีแพมอยู่ในช่วง 20-40 ชั่วโมง [3] คาดว่าไดอะซีแพมยังตกค้างอยู่ในร่างกายจึงไม่สามารถตรวจพบได้ในปัสสาวะ

2. การวิเคราะห์หาปริมาณไดอะซีแพมในตัวอย่างซีรัม

การตรวจวิเคราะห์ไดอะซีแพมในปัสสาวะที่ความเข้มข้น 400 ng/ml โดยเทคนิค HPLC ให้โครมาโทแกรม ที่ไดอะซีแพม มีค่าretention time 8.35 นาที (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของไดอะซีแพม ความเข้มข้น 400 ng/ml

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ จากการเติมไดอะซีแพมลงในซีรัม ระดับความเข้มข้น 100 150 200 และ 300 ng/ml ทดลอง 7 ซ้ำ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบของไดอะซีแพมในซีรัม

ผลการทดสอบ	Std 100 ng/ml	Std 150 ng/ml	Std 200 ng/ml	Std 300 ng/ml
AVERAGE	103.64	150.64	200.59	299.58
SD	1.39	1.74	2.82	3.64
% Recovery	103.64	100.43	100.30	99.86

จากการทดลองพบว่าค่าร้อยละการกลับคืนของไดอะซีแพม และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานคือ 103.64 ± 1.39 100.43 ± 1.74 100.30 ± 2.82 และ 99.86 ± 3.64 ตามลำดับ

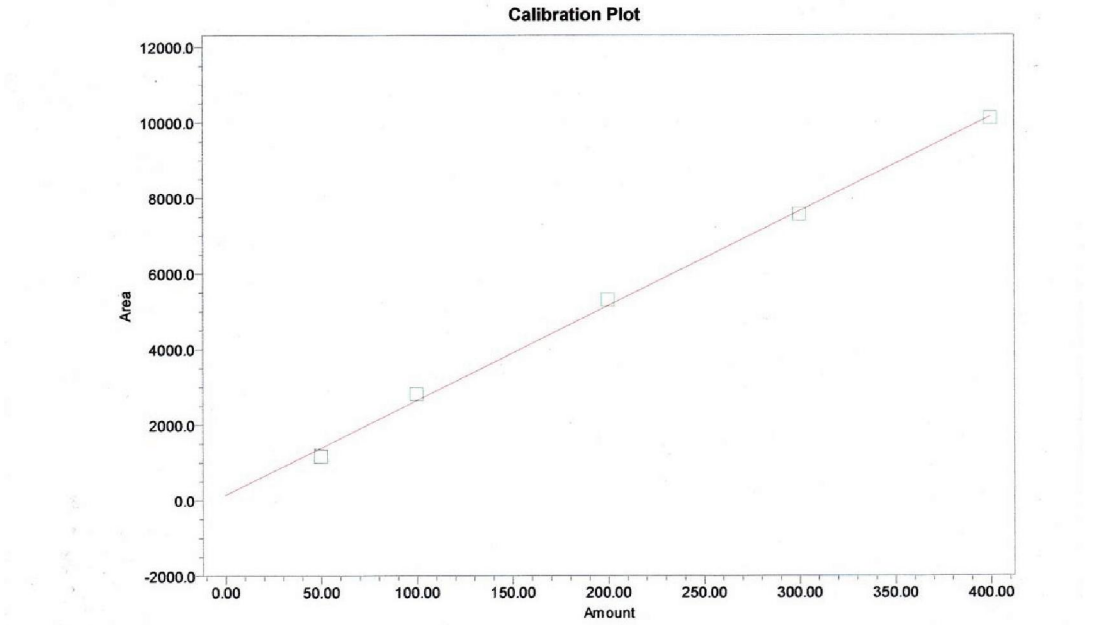
การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณจากการเติมไดอะซีแพมลงในซีรัมความเข้มข้น 150 ng/ml ตามวิธีมาตรฐาน วิเคราะห์ใน 1 วัน ทดสอบด้วยเทคนิค HPLC ได้ค่าร้อยละการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของไดอะซีแพมในซีรัม 0.73 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณของไดอะซีแพมในซีรัม

Concentration (ng/ml)	Within-day Mean ± SD (ng/ml)	%RSD
150	149.94 ± 1.09	0.73

การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไดอะซีแพมในซีรัมกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานได้สมการ พบว่าขีดจำกัดของการตรวจพบได้ของไดอะซีแพมคือ 3 ng/ml และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณไดอะซีแพมคือ 10 ng/ml ทดสอบซ้ำ พบว่าให้ค่าเท่าเดิม

การทดสอบช่วงการวิเคราะห์ที่มีความเป็นเส้นตรง (Linearity) ของไดอะซีแพม ศึกษาที่ความเข้มข้น 100 200 400 และ 500 ng/ml ได้ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 1 เมื่อนำค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานมาสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ได้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) เท่ากับ 0.997 (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานสารมาตรฐานไดอะซีแพม

นำตัวอย่างซีรัมจากผู้ได้รับไดอะซีแพม 5 mg ผู้ทดลองหนัก 45 กิโลกรัม ตามระยะเวลา 4 6 12 24 และ 36 ชั่วโมง 5 ตัวอย่าง มาเตรียมตามวิธีเตรียมตัวอย่าง พบตัวอย่างที่ตรวจพบไดอะซีแพมในซีรัมมีค่า 28-91 ng/ml (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ปริมาณไดอะซีแพมในซีรัมจากการเก็บในซีรัมผู้ที่ได้รับไดอะซีแพม 5 mg

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณไดอะซีแพม (ng/ml)
4	28.57
6	90.28
12	54.33
24	53.91
36	36.86

อภิปรายผล

การวิเคราะห์ปริมาณไดอะซีแพมในเลือดและปัสสาวะให้ผลการทดลองที่ตรวจวัดได้ ซึ่งนำไปประยุกต์ใช้เพื่อหาปริมาณยา เกี่ยวกับคดีที่มีการใช้ไดอะซีแพมในการสืบสวนทางด้านนิติวิทยาศาสตร์ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณนายราเมศ กรณีย์ ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ และตรวจสอบข้อบกพร่อง ทำให้งานวิจัยนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอบพระคุณศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 8 นครสวรรค์ กลุ่มงานพิษวิทยา ที่สนับสนุนเครื่องมือวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. ณัฐ ตันศรีสวัสดิ์ และ ศิรินันท์ เอี่ยมภักดิ์. 2550. *นิติพิษวิทยา. กรุงเทพมหานคร:* วีพริ้นท์.
2. Azzam, R.M. et al. 1998. Rapid and simple chromatographic method for the determination of diazepam and its major metabolite in human plasma and urine. *Journal of Chromatography.* 708: 304-309.
3. Mullet, W.M. and Pawliszyn, J. 2001. Direct LC analysis of five benzodiazepines in human urine and plasma using an ADS restricted access extraction column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 26: 899-908.