

**DETERMINATION OF PLASMA IOHEXOL BY HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY:
EFFECTS OF AN IMPROVED METHOD IN
RENAL AND LIVER DISEASES PATIENTS**



PORNCHAI MEEMA EW

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE (CLINICAL PATHOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2011**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

DETERMINATION OF PLASMA IOHEXOL BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY: EFFECTS OF AN IMPROVED METHOD IN RENAL AND LIVER DISEASES PATIENTS

PORNCHAI MEEMAEW 5137426 RACP/M

M.Sc. (CLINICAL PATHOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE : ANCHALEE CHITTAMMA, Ph.D., CHAGRIYA KITTIYAKARA, M.D., M.B.B.S. (Lond), M.R.C.P. (UK)

ABSTRACT

Plasma iohexol clearance is a reference method for finding the glomerular filtration rate, which is important in nephrology practice and research. Several researchers had developed HPLC methods with UV detectors to determine plasma iohexol, but the chromatograms of iohexol using prior techniques showed two peaks of overlapping in iohexol isoforms. The improvement in the resolution of iohexol isoforms may give better data integration and minimize interference effects. Therefore, the aims of this study were to evaluate and compare a new reverse phase column, Alltech Alltima C18, with a previously described column for plasma iohexol determination. The plasma samples spiked with iohexol ex-vivo were extracted and separated by HPLC using 3 different columns. The performance of the standard separation method using Nucleosil C18 column was compared to Alltech Alltima C18 and Zorbax ODS columns. Retention times of exo-isoform peak from Alltech Alltima C18, Nucleosil C18 and Zorbax ODS were 9.41, 9.32, and 5.70 seconds, respectively. Alltech Alltima C18 produced the best characteristic chromatogram and symmetry peak and gave a linear calibration curve of standard iohexol concentration between 20-640 $\mu\text{g/ml}$ ($r^2 = 0.9997$). Resolution of endo- and exo-isoforms, when analyzed by Alltech Alltima C18, Nucleosil C18, and Zorbax ODS were 1.5, 0.9, and 0.7, respectively. The percent recovery at 20, 300, and 600 $\mu\text{g/ml}$ iohexol levels of Alltech Alltima C18, Nucleosil C18, and Zorbax ODS ranged from 99.9 - 100.3%, 93.3 - 100.2%, and 97.1 - 100.7%, respectively. Intra- and inter-assay precision (%RSD) of Alltech Alltima C18 were <2%. Only Alltech Alltima C18, the renal disease samples with creatinine >7.0 mg/dl, and the liver disease samples with bilirubin >27.3 mg/dl did not influence exo-isomer peak and percent recoveries of this method. Since Alltech Alltima C18 is a polymerically bonded and double end-capped column, it can improve the resolution of the iohexol isoforms by reducing the capacity factor of endo-isoform and increasing the capacity factor of exo-isoform. In conclusion, Alltech Alltima C18 is more suitable for iohexol determination than the other conventional RP columns, especially in the patient samples with renal and liver disease. This column produced simple, reliable, precise and accurate method and resulted in a clear resolution chromatogram.

KEY WORDS: GLOMERULAR FILTRATION RATE / IOHEXOL / PLASMA / CLEARANCE / HPLC-UV / END-CAPPED COLUMN

99 pages

การตรวจวิเคราะห์ไอโ hekซอลในพลาสมาด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง: ผลของการปรับปรุงวิธีใหม่
ต่อการตรวจวิเคราะห์ในผู้ป่วยโรคไตและโรคตับ

DETERMINATION OF PLASMA IOHEXOL BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY :
EFFECTS OF AN IMPROVED METHOD IN RENAL AND LIVER DISEASES PATIENTS

พรชัย หมีแห้ว 5137426 RACP/M

วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อัญชลี จิตธรรมมา, พร.ค., ม.ล. ชาศรีชัย กิตติยากร, พ.บ., M.B.B.S. (Lond), M.R.C.P.
(UK)

บทคัดย่อ

อัตราการทำไอโ hekซอลออกจากร่างกายเป็นวิธีอ้างอิงสำหรับการหาค่าอัตรากรองของไต ซึ่งมี
ความสำคัญต่อการบริหารจัดการผู้ป่วยโรคไตและการวิจัย นักวิจัยหลายท่านได้พัฒนาเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลว
สมรรถภาพสูงที่ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดคูลตราไวโอเล็ตสำหรับการตรวจหาปริมาณไอโ hekซอล แต่ลักษณะโครมาโต
แกรมที่ได้ยังไม่สามารถแยกไอโซฟอร์มของไอโ hekซอลได้อย่างชัดเจน หากสามารถแยกไอโซฟอร์มได้ชัดเจนขึ้นอาจทำ
ให้สามารถวิเคราะห์ข้อมูลได้ดีขึ้นและลดปัญหาการรบกวนจากสารอื่นได้ด้วย ดังนั้นจุดมุ่งหมายของการศึกษานี้คือ เพื่อ
ประเมินและเปรียบเทียบการแยกไอโ hekซอลของคอลัมน์ Alltech Alltima C18 กับคอลัมน์มาตรฐานอื่น โดยไอโ hekซอล
จะถูกเติมลงในพลาสมา จากนั้นตัวอย่างจะผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์หาปริมาณไอโ hekซอลด้วย
คอลัมน์ที่ต่างกัน 3 คอลัมน์ คุณลักษณะของคอลัมน์มาตรฐาน Nucleosil C18 จะถูกเปรียบเทียบกับ Alltech Alltima C18
และ Zorbax ODS จากผลการศึกษาพบว่าคอลัมน์ Alltech Alltima C18, Nucleosil C18 และ Zorbax ODS แยกไอโ hekซอล
ไอโซฟอร์มของไอโ hekซอลออกมาที่เวลา 9.41, 9.32 และ 5.70 นาที ตามลำดับ โดยคอลัมน์ Alltech Alltima C18 ให้ลักษณะโคร
มาโตแกรมที่ดีที่สุดและมีความสมมาตรรวมทั้งให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 20 ถึง 640 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร ค่าการแยกกันระหว่างไอโซฟอร์มเมื่อวิเคราะห์ด้วย Alltech Alltima C18, Nucleosil C18 และ Zorbax ODS
เป็น 1.5, 0.9 และ 0.7 ตามลำดับ และร้อยละของการกั้นกลับของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นของไอโ hekซอล 20, 300 และ
600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของ Alltech Alltima C18, Nucleosil C18 และ Zorbax ODS เป็น 99.9-100.3%, 93.3-100.2%
และ 97.1-100.7% ตามลำดับ ความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและต่างวันกันของ Alltech Alltima C18
มีค่าน้อยกว่า 2% มีเพียงคอลัมน์ Alltech Alltima C18 เท่านั้นที่พีคไอโ hekซอลไม่ถูกรบกวนจากตัวอย่างของผู้ป่วย
โรคไตที่มีระดับครีเอตินิน มากกว่า 7.0 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และผู้ป่วยโรคตับที่มีระดับบิลิรูบินช่วงค่า 0.5-27.3 มิลลิกรัม
ต่อเดซิลิตร จากการที่ Alltech Alltima C18 เป็นคอลัมน์แบบโพสิเมอร์บอนด์และมีการทำดัดเบิ้ลเอนแคปซันเม็ดซิลิกา ทำ
ให้สามารถแยกไอโซฟอร์มของไอโ hekซอลได้ดีขึ้นโดยการทำให้เอนโด-ไอโซฟอร์มมีค่าความสามารถในการจับกับ
คอลัมน์ลดลงและเพิ่มค่าความสามารถในการจับกับคอลัมน์ของเอ็กโซ-ไอโซฟอร์ม ดังนั้น Alltech Alltima C18 จึงเป็น
คอลัมน์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมมากที่สุดสำหรับการวิเคราะห์ไอโ hekซอล นอกจากนี้การตรวจวิเคราะห์ก็ยังง่าย มีความ
น่าเชื่อถือ ถูกต้องและแม่นยำ ให้สัมประสิทธิ์การแยกกันระหว่างไอโซฟอร์มได้ดีที่สุดด้วย