บทที่ 3

ผลการศึกษา และวิจารณ์ผลการศึกษา

การอธิบายผลการศึกษาทดลองที่ครอบคลุมทุกหัวข้อที่กล่าวถึงในบทที่ 2 มีดังนี้

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาแต่ละตัว และแคฟเฟอีนในพลาสมา
   1.1 การวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา
   1.2 การวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา
   1.3 การวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา
   1.4 การวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา
2. การจัดทำมาตรฐานวิธีการปฏิบัติในการวิเคราะห์ยา และแคฟเฟอีนในตัวอย่างพลาสมา
3. การทดลองปฏิบัติตามมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ

เนื่องจากธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน เป็นสารในกลุ่มอนุพันธ์เดียวกัน มีคุณสมบัติทางเคมี กายภาพใกล้เคียงกัน จึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ทั้ง 2 ร่วมกัน

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาแต่ละตัว และแคฟเฟอีนในพลาสมา

1.1 การวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา

1.1.1 สภาวะทาง HPLC สำหรับการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน มีดังนี้

1.1.1.1 ความยาวคลื่นที่เหมาะสมกับอัลตร้าไวโอเลต ดีเทคเตอร์ จากผลการทดลอง พบว่า สารละลายธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในเมธานอล ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่เดียวกัน คือ 272 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 3 และ 4

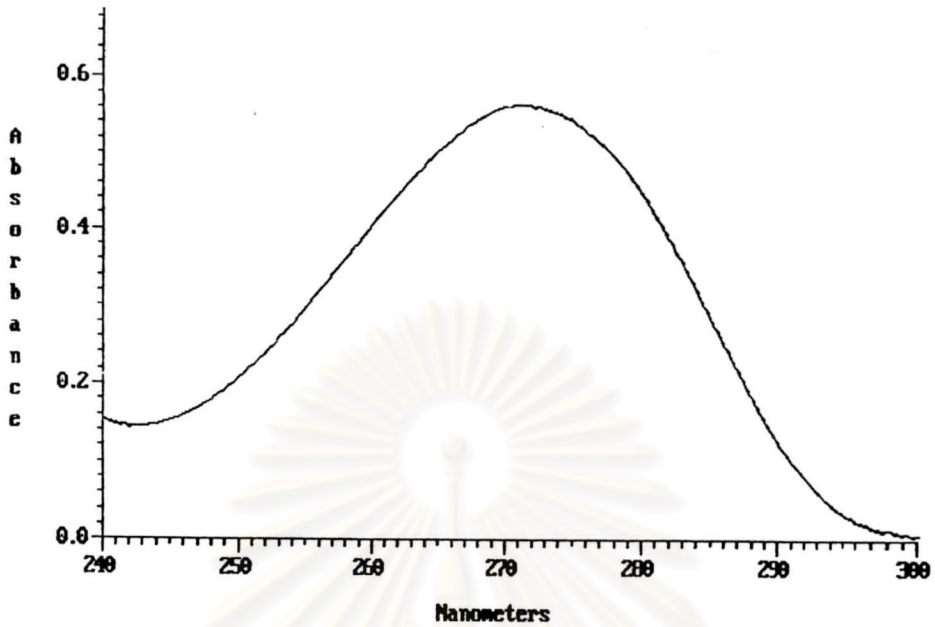
1.1.1.2 **สารมาตรฐานภายในที่เหมาะสม** ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน แม้มีคุณสมบัติต่างๆ ใกล้เคียงกัน แต่ทั้ง 2 เป็นเมตาบอไลท์ซึ่งกันและกันในร่างกาย จึงทำให้ทั้ง 2 ไม่สามารถเป็นสารมาตรฐานภายในซึ่งกันและกันได้ ดังนั้นจึงเลือกสารในกลุ่มอนุพันธ์เดียวกัน และไม่เป็นเมตาบอไลท์ของทั้ง 2 คือ เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน มาเป็นสารมาตรฐานภายในแทน

จากผลการทดลอง พบว่า สารละลายเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในเมธานอล ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 272 นาโนเมตร เช่นเดียวกับธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน ดังแสดงในรูปที่ 5

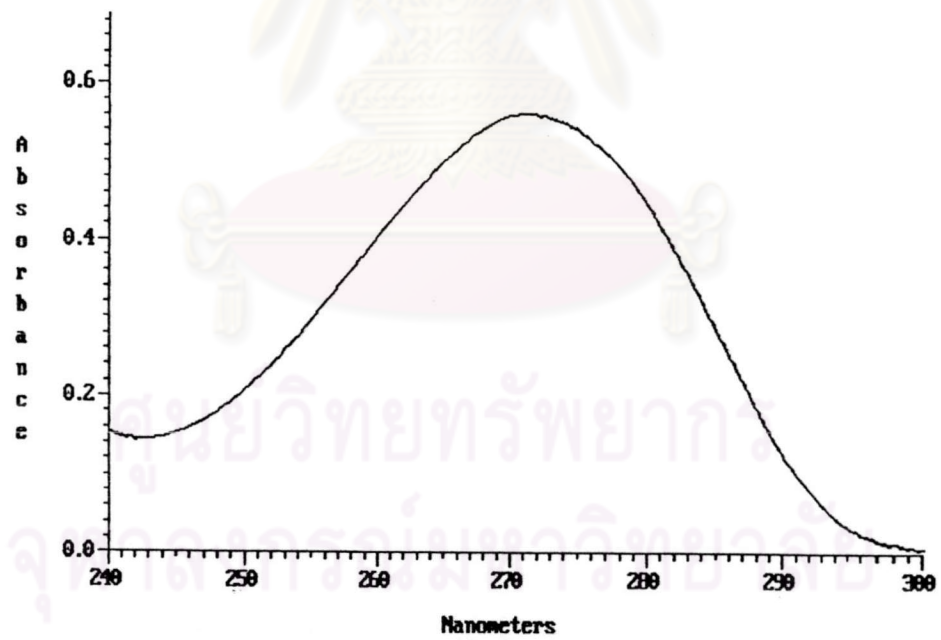
ดังนั้นในการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา จึงใช้ความยาวคลื่นที่ 272 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นในสภาวะทาง HPLC และใช้เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน เป็นสารมาตรฐานภายในในการวิเคราะห์

1.1.1.3 **ผลการใช้สภาวะทาง** HPLC จากการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน ในสารละลายมาตรฐาน ด้วยสภาวะทาง HPLC ที่ทดลองได้ดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่า พีคธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในโครมาโตแกรม มีเวลาที่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ 5.13, 10.90 และ 7.84 นาที ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถใช้สภาวะทาง HPLC นี้ในการศึกษาวิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมาได้

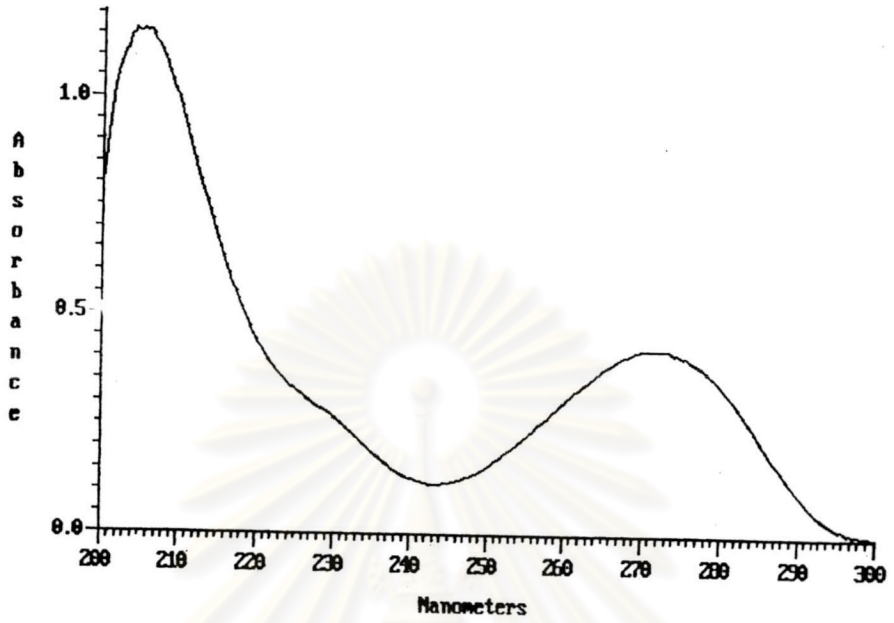
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 สเปกตรัมของสารละลายธีโอฟิลลีนในเมธานอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4 สเปกตรัมของสารละลายแคฟเฟอีนในเมธานอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 5 สเปกตรัมของสารละลายเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในเมธานอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 สภาวะทาง HPLC ของการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน

รายการ	สภาวะทาง HPLC
คอลัมน์	HIQ Sil C-18 5 μm, 150X4.6 mm, i.d.
โมบายเฟส (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	Acetonitrile: Phosphate buffer 0.05M pH 4.50 (10: 90)
อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	1
ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	272

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1.2 ผลการศึกษาวิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา

1.1.2.1 **ผลการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน** โดยใช้อะซีโตไนไตรล์ เมธานอล และซิงค์ ซัลเฟต ร่วมกับเมธานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ซึ่งมีผลดังนี้

1.1.2.1.1 **ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมาด้วยอะซีโตไนไตรล์**

- ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน เป็นตะกอนหยาบ สีเหลืองปนขาว ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่าหลอดทดลอง
- ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน เป็นสารละลายใส สีเหลือง และpH ประมาณ 7-8 สามารถฉีดเข้า HPLC ได้ทันที
- ลักษณะโครมาโตแกรม พีคธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในแบลงค์พลาสมา มีรูปร่างไม่สมมาตร ขนาดเล็ก ฐานพีคกว้าง ดังแสดงในรูปที่ 6

จากลักษณะของพีคธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน ในโครมาโตแกรมที่ไม่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ ทำให้อะซีโตไนไตรล์ไม่เหมาะเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน จึงไม่จำเป็นต้องหาค่า %physical recovery อีกต่อไป

1.1.2.1.2 **ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมาด้วยเมธานอล**

- ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน เป็นตะกอนละเอียด สีขาว ฟุ้งกระจายได้เมื่อเขย่าหลอดทดลอง
- ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน เป็นสารละลายใส สีเหลืองอ่อน และ pH ประมาณ 7-8 สามารถฉีดเข้า HPLC ได้ทันที
- ลักษณะโครมาโตแกรม พีคธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน มีรูปร่างสมมาตร ขนาดพอเหมาะ ฐานพีคแคบ ดังแสดงในรูปที่ 7
- ค่าเฉลี่ย %physical recovery ของธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในพลาสมา เท่ากับ 110.8%, 110.7% และ117.4% ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ทั้ง 3 เกินเกณฑ์ที่กำหนด

ถึงแม้ว่าพีคของธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน ในโครมาโตแกรมทั้งที่อยู่ในน้ำ และในพลาสมา จะมีลักษณะเหมือนกัน และเป็นไปตามเกณฑ์ แต่ค่าเฉลี่ย %physical recovery ของธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน มีค่าเกินที่กำหนด ทำให้เมธานอลไม่เหมาะสมในการใช้เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน เนื่องจากถ้าใช้เมธานอลแล้ว การวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมาจะได้ค่าที่มากกว่าความเป็นจริง

เมื่อทั้งอะซีโตไนไตรล์ และเมธานอล ไม่เหมาะสมกับการเตรียมตัวอย่างพลาสมาของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน จึงเลือกใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนที่มีประจุบวกร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ คือ ซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล มาศึกษาต่อไป

1.1.2.1.3 ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมาด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล

- ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน เป็นตะกอนละเอียด สีขาว ฟุ้งกระจายได้เมื่อเขย่าหลอดทดลอง
- ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน เป็นสารละลายใส ไม่มีสี และ pH ประมาณ 7-8 สามารถฉีดเข้า HPLC ได้ทันที
- ลักษณะโครมาโตแกรม พีคธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน มีรูปร่างสมมาตร ขนาดพอเหมาะ ฐานพีคแคบ ดังแสดงในรูปที่ 8
- ค่าเฉลี่ย %physical recovery ของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในพลาสมา เท่ากับ 98.77% และ 102.4% ตามลำดับ ส่วนเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในพลาสมา มีค่าเฉลี่ย %physical recovery เท่ากับ 100.5% ซึ่งค่าทั้ง 3 อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

จากโครมาโตแกรมของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในน้ำ และในพลาสมา มีลักษณะเหมือนกัน เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ อีกทั้งค่าเฉลี่ย %physical recovery ของธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนอยู่ในช่วงที่กำหนดไว้ ดังนั้นซิงค์ ซัลเฟต ร่วมกับเมธานอล จึงเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างพลาสมาของการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา

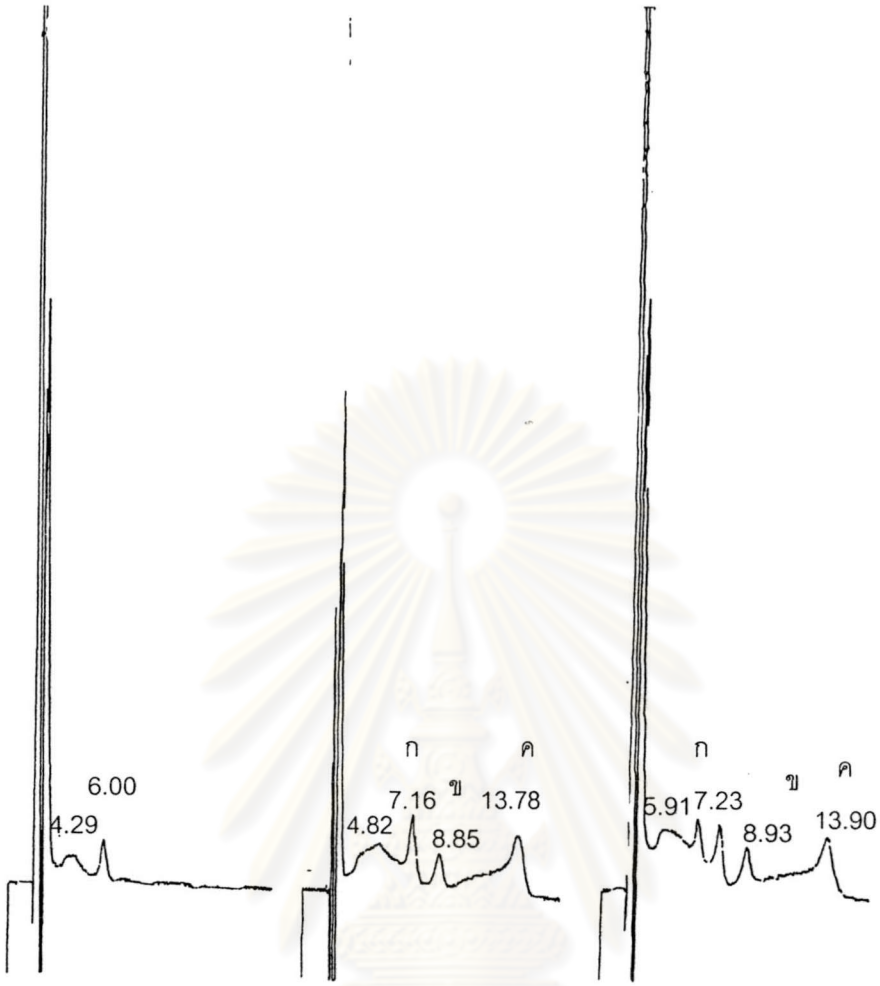
1.1.2.2 **ผลการปรับสภาวะทาง HPLC ให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา**

จากสภาวะทาง HPLC การวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน ในข้อ 1.1.1 เมื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ในพลาสมา ปรากฏว่า พีคธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน มีการรบกวนจาก endogenous substance ในพลาสมา ดังนั้นจึงมีการปรับส่วนประกอบของโมบายเฟสให้เหมาะสม เพื่อให้สามารถศึกษาผลการเตรียมตัวอย่างเมื่อใช้เมธานอล และอะซีโตไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน สำหรับโมบายเฟสที่ได้ คือ อะซีโตไนไตรล์: เมธานอล: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.50 (7:9 :84 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

จากที่อะซีโตไนไตรล์ และเมธานอล ไม่เหมาะสมกับการเตรียมตัวอย่างพลาสมาของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน จึงนำซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล มาศึกษาต่อไป แต่จำเป็นต้องเปลี่ยนส่วนประกอบของโมบายเฟสใหม่อีกครั้ง เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างฟอสเฟต บัฟเฟอร์ กับซิงค์ โดยโมบายเฟสที่เหมาะสม คือ อะซีโตไนไตรล์: เมธานอล: อะซีเตด บัฟเฟอร์ 0.01โมลาร์ pH 3.50 (7: 6: 87 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

วิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา ด้วยซิงค์ ซัลเฟต ร่วมกับเมธานอล ได้รวบรวมและสรุป ดังรูปที่ 9

เมื่อเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมาที่ได้ในการศึกษานี้กับวิธีวิเคราะห์ที่มีรายงานมาก่อน พบว่า วิธีวิเคราะห์ที่ได้นี้มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพลาสมาที่ง่ายกว่า และไม่ยุ่งยาก เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการวิเคราะห์ซึ่งใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างพลาสมาโดยการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง [8, 36] การสกัดด้วยตัวทำละลาย [37] และการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยกรดเปอร์คลอริก [39, 45] นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิเคราะห์ซึ่งใช้อะซีโตไนไตรล์ในการเตรียมตัวอย่างพลาสมา [43] เมื่อทดลองวิเคราะห์ในการศึกษานี้ ปรากฏว่า ไม่สามารถทำได้



รูปที่ 6 โครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน ในแบลงค์พลาสมา เมื่อใช้อะซีโตไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

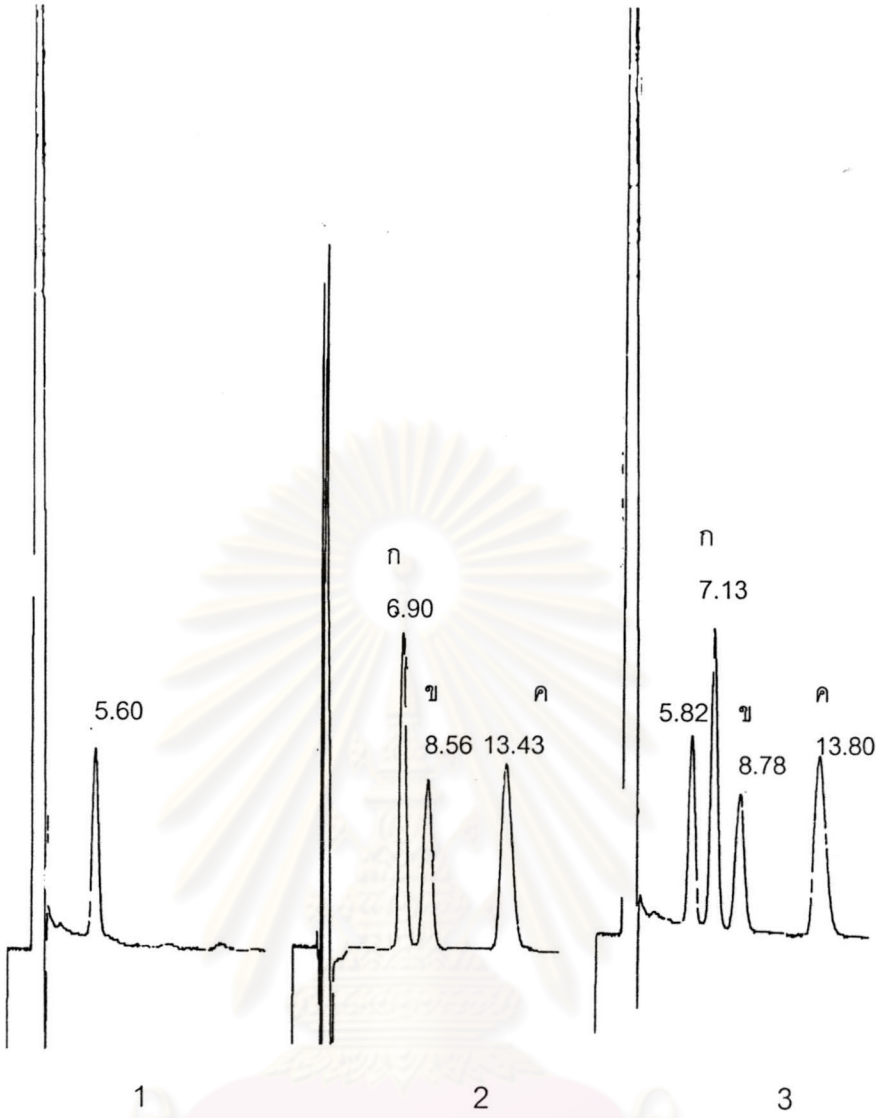
1. โครมาโตแกรมของแบลงค์พลาสมา

2. โครมาโตแกรมของธีโอฟิลลีน เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ

3. โครมาโตแกรมของธีโอฟิลลีน เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา

โดย (ก)ธีโอฟิลลีน(7.16 นาที) (ข)เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน(สารมาตรฐานภายใน) (8.85นาที) (ค)แคฟเฟอีน(13.78นาที)

โมบายเฟสที่ใช้ คือ อะซีโตไนไตรล์: เมธานอล: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.50 (7:9 :84 อัตราส่วนโดยปริมาตร)



รูปที่ 7 โครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน ในแบลงค์พลาสมา เมื่อใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

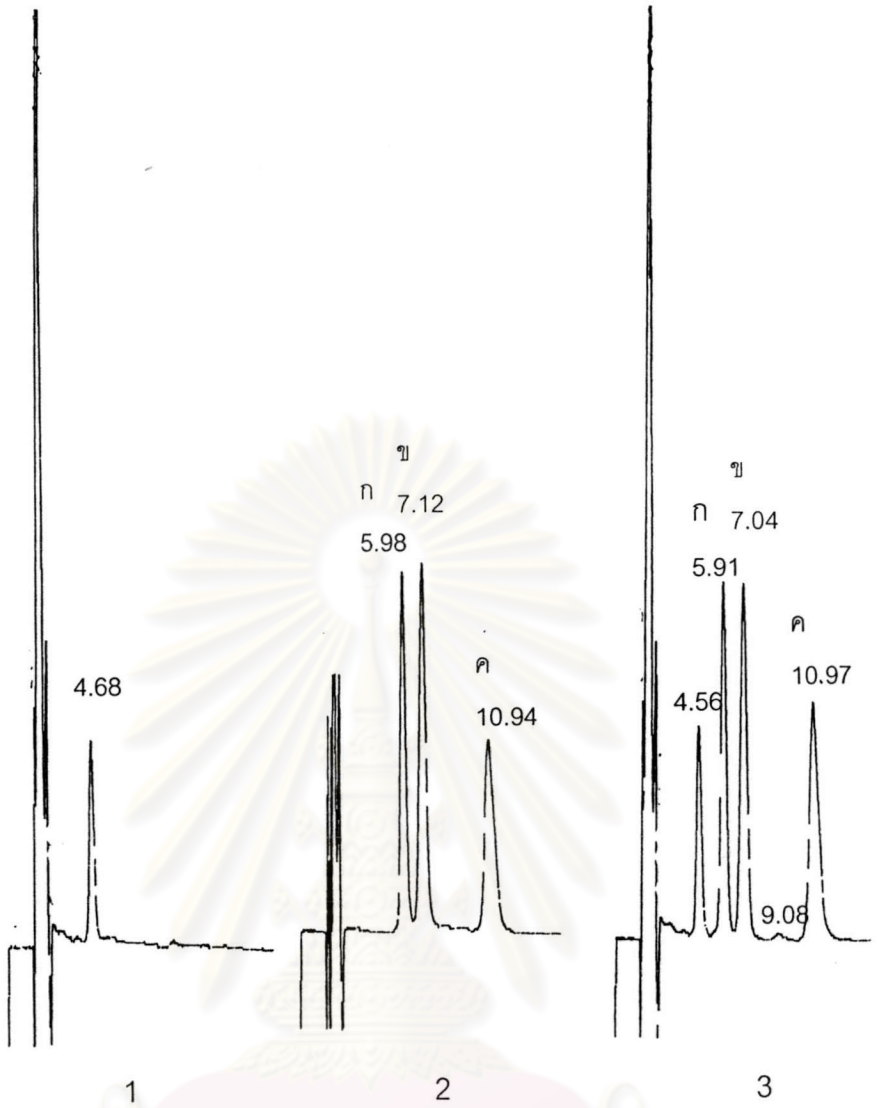
1. โครมาโตแกรมของแบลงค์พลาสมา

2. โครมาโตแกรมของธีโอฟิลลีน เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ

3.โครมาโตแกรมของธีโอฟิลลีน เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา

โดย (ก)ธีโอฟิลลีน(6.90นาที) (ข)เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน(สารมาตรฐานภายใน) (8.56นาที) (ค)แคฟเฟอีน(13.43นาที)

โมบายเฟสที่ใช้ คือ อะซีโตไนไตรล์: เมธานอล: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.50 (7:9 :84 อัตราส่วนโดยปริมาตร)



รูปที่ 8 โครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน ในแบลงค์พลาสมา เมื่อใช้ซิงค์ ซัลเฟต ร่วมกับเมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

1. โครมาโตแกรมของแบลงค์พลาสมา

2. โครมาโตแกรมของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ

3. โครมาโตแกรมของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา โดย (ก)ธีโอฟิลลีน(5.98นาที) (ข) เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน(สารมาตรฐานภายใน) (7.12นาที) (ค) แคฟเฟอีน(10.94นาที)

โมบายเฟสที่ใช้ คือ อะซีโตไนไตรล์: เมธานอล: อะซีเตด บัฟเฟอร์ 0.01โมลาร์ pH 3.50 (7: 6: 87 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

รูปที่ 9 วิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา ด้วยซิงค์ ซัลเฟต ร่วมกับเมธานอล

สภาวะทาง HPLC

คอลัมน์ ; HIQ Sil C-18 5µm, 150X 4.6 mm, i.d.

โมบายเฟส; อะซีโตไนไตรล์: เมธานอล: อะซีเตด บัฟเฟอร์ 0.01โมลาร์ pH 3.50 (7: 6: 87 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

อัตราการไหล; 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ความยาวคลื่น ; 272 นาโนเมตร

วิธีการเตรียมตัวอย่างพลาสมา

ผสมแบลงค์พลาสมา 100 ไมโครลิตร กับสารละลายธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในเมธานอล 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 10 ไมโครลิตร

↓ผสมโดยการวอร์เทก

เติมสารละลายซิงค์ ซัลเฟต ในน้ำ 10%(น้ำหนักโดยปริมาตร) 20 ไมโครลิตร

↓ผสมโดยการวอร์เทก

เติมสารละลายเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในเมธานอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 150 ไมโครลิตร

↓ผสมโดยการวอร์เทก

หมุนเหวี่ยงตัวอย่างพลาสมาด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 15,000 X g ต่อนาที นาน 10 นาที

↓

นำสารละลายใสเหนือตะกอนมาฉีดเข้า HPLC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1.3 **การพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต ร่วมกับเมธานอล** เมื่อได้วิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมาแล้ว จำเป็นต้องทำการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ก่อนนำไปกำหนดมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ ผลการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา มีดังนี้

1.1.3.1 **ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค และความเข้มข้นของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา** ผลการหาความสัมพันธ์ดังกล่าวของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11
สมการตัวแทนเส้นตรงของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา มีดังนี้

ธีโอฟิลลีน; $Y = 0.04372X + 0.02787$ $R^2 = 0.9934$

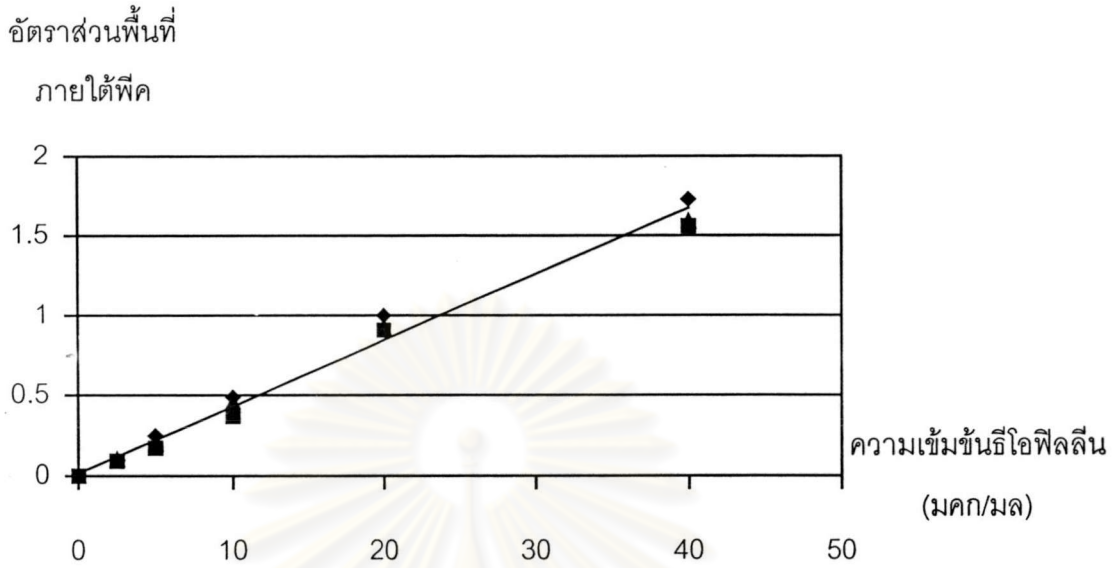
แคฟเฟอีน; $Y = 0.04174X - 0.001306$ $R^2 = 0.9955$

เมื่อ Y เป็นอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค

X เป็นความเข้มข้นของธีโอฟิลลีน หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา

นอกจากนี้ค่า %RSD ของความชันของสมการความสัมพันธ์ดังกล่าวทั้ง 3 ชุด ของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน เท่ากับ 4.95% และ 3.84% ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ 9 และ 10

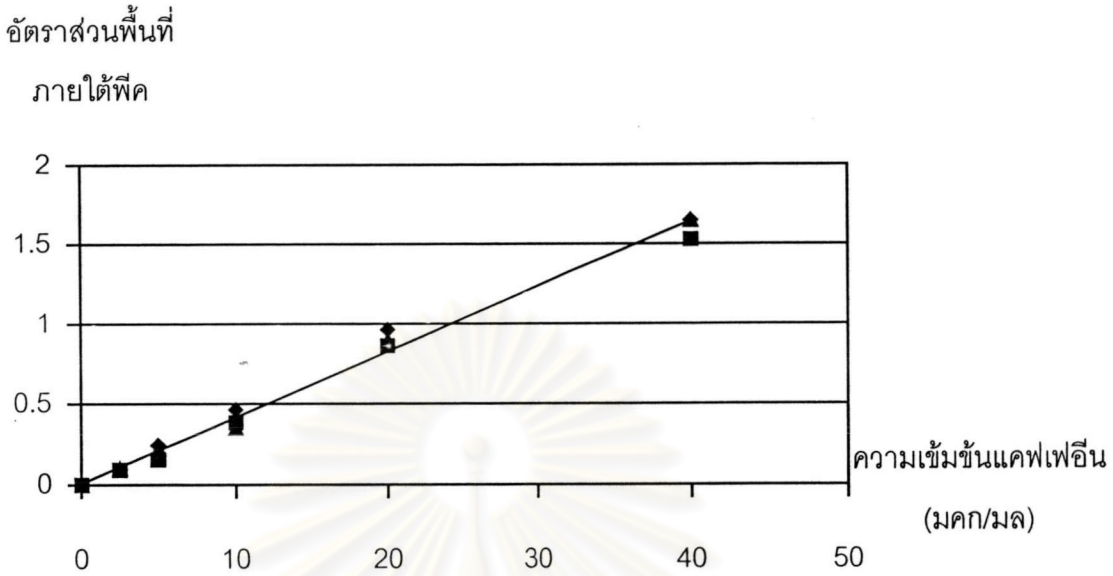
นั่นคือวิธีวิเคราะห์นี้สามารถวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งครอบคลุมช่วงความเข้มข้นในการนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วย



รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีคและความเข้มข้นของธีโอฟิลลีนในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล

ตารางที่ 9 การยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีคและความเข้มข้นของธีโอฟิลลีนในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล ในรูปร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความชันของสมการ (%RSD; n=3)

สมการที่	ความชัน	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
1	0.04372	0.04136	0.00205	4.95
2	0.04000			
3	0.04037			



รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีคและความเข้มข้นของแคฟเฟอีนในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล

ตารางที่ 10 การยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีคและความเข้มข้นของแคฟเฟอีนในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล ในรูปร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความชันของสมการ (%RSD; n=3)

สมการที่	ความชัน	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
1	0.04176	0.04084	0.01570	3.84
2	0.03903			
3	0.04174			

1.1.3.2 **ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา** ผลการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่าง มีค่า %bias อยู่ระหว่าง –4.79 ถึง +7.29 และ –4.80 ถึง +6.98 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน ±15% ดังแสดงในตารางที่ 11 และ 12 สำหรับค่าเฉลี่ย %analytical recovery ของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน มีค่าเท่ากับ 100.6±8.44% และ 99.93±7.04% ตามลำดับ
ดังแสดงในตารางที่ 13 และ 14

จากค่า %bias และ %analytical recovery ที่ได้ไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด แสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมาที่ศึกษา เป็นวิธีวิเคราะห์ที่จัดว่าถูกต้องเพียงพอที่จะนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาได้

1.1.3.3 **ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา**

1.1.3.3.1 **ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน** ผลการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่าง มีค่า %RSD อยู่ระหว่าง 5.76 ถึง 8.74 และ 3.86 ถึง 5.57 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 15 และ 16

1.1.3.3.2 **ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน** ผลการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน มีค่า %RSD อยู่ระหว่าง 3.45 ถึง 7.20 และ 4.26 ถึง 5.93 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 17 และ 18

จากผลการทดลองเพื่อหาความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน และเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน พบว่า ไม่มีการทดลองใดที่มีค่า %RSD เกิน 15% ซึ่งแสดงถึงวิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมานี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หรือในวันอื่นๆได้

1.1.3.3.3 **ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ เมื่อใช้เครื่อง** HPLC **ต่างกัน** ผลการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย HPLC 2 เครื่อง พบว่าการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีนในพลาสมาด้วย HPLC เครื่องที่ 1 และ 2 มีค่า %RSD อยู่ระหว่าง 5.99 ถึง 8.51 และ 3.12 ถึง 4.59 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 19 นอกจากนี้ ค่าความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ของธีโอฟิลลีนด้วยเครื่อง HPLC ทั้ง 2 มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.000$)

สำหรับการวิเคราะห์แคฟเฟอีนในพลาสมาด้วย HPLC เครื่องที่ 1และ 2 มีค่า %RSD อยู่ระหว่าง 2.07 ถึง 5.13 และ 3.32 ถึง 6.28 ดังแสดงในตารางที่ 20 ส่วนค่าความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ของแคฟเฟอีนด้วยเครื่อง HPLC ทั้ง 2 มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.000$)

จากผลการหาความเที่ยงตรงเมื่อใช้เครื่อง HPLC ต่างกัน พบว่าค่า %RSD ของการวิเคราะห์ในแต่ละเครื่อง HPLC ไม่เกิน 15% และการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ทั้ง 2 มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมานี้ สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่แตกต่างกันได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ความถูกต้องในการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีนในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล ในรูปร้อยละของความเบี่ยงเบนของวิธีวิเคราะห์ (%bias)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	%bias (n=5)					ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	
5.0	+1.99	-0.30	-13.20	-2.73	-9.72	-4.79
10.0	+3.58	+7.61	-4.42	+3.19	-14.26	-0.86
20.0	-3.63	+11.13	+9.70	+8.58	+10.67	+7.29

ตารางที่ 12 ความถูกต้องในการวิเคราะห์แคฟเฟอีนในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล ในรูปร้อยละของความเบี่ยงเบนของวิธีวิเคราะห์ (%bias)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	%bias (n=5)					ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	
5.0	-1.74	-0.59	-9.64	-5.52	-6.53	-4.80
10.0	-1.26	-4.40	-4.97	+6.47	-7.68	-2.37
20.0	+5.44	+9.13	+10.0	-2.32	+12.5	+6.98

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับฯของวิธีวิเคราะห์ทีโอฟิลีนในพลาสมาเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล (%analytical recovery)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	%analytical recoveries (n=5)					ค่าเฉลี่ย	SD
	1	2	3	4	5		
5.0	102.0	99.70	86.80	97.28	90.28	95.21	6.43
10.0	103.6	107.6	95.58	103.2	85.74	99.14	8.66
20.0	96.37	111.1	109.7	108.6	110.7	107.3	6.18
ค่าเฉลี่ยรวม						100.6	8.44

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์แคฟเฟอีนในพลาสมาเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล (%analytical recovery)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	% analytical recoveries (n=5)					ค่าเฉลี่ย	SD
	1	2	3	4	5		
5.0	98.26	99.41	90.36	94.48	93.47	95.20	3.67
10.0	98.74	95.60	95.02	106.4	92.32	97.63	5.44
20.0	105.4	109.1	110.1	97.68	112.6	107.0	5.81
ค่าเฉลี่ยรวม						99.93	7.04

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันในการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีนในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล (n=5)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	ความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)					ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
	1	2	3	4	5			
5.0	5.10	4.98	4.34	4.86	4.51	4.76	0.32	6.76
10.0	10.36	10.76	9.56	10.32	8.57	9.91	0.87	8.74
20.0	19.28	22.22	21.94	21.72	22.13	21.46	1.23	5.76

ตารางที่ 16 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันในการวิเคราะห์แคฟเฟอีนในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล (n=5)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	ความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)					ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
	1	2	3	4	5			
5.0	4.91	4.97	4.52	4.72	4.67	4.76	0.18	3.86
10.0	9.87	9.56	9.50	10.65	9.23	9.76	0.55	5.57
20.0	21.09	21.83	22.01	19.54	22.51	21.40	1.16	5.43

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันในการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล (n=5)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	ความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)					ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
	1	2	3	4	5			
5.0	4.84	4.76	5.32	5.31	4.51	4.95	0.36	7.20
10.0	8.89	9.79	9.84	10.30	9.56	9.68	0.51	5.32
20.0	19.33	19.07	19.08	20.67	19.27	19.48	0.67	3.45

ตารางที่ 18 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันในการวิเคราะห์แคฟเฟอีน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล (n=5)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	ความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)					ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
	1	2	3	4	5			
5.0	4.37	4.83	4.79	5.05	4.91	4.79	0.25	5.32
10.0	10.84	10.10	10.28	9.79	9.23	10.05	0.60	5.93
20.0	21.39	19.17	19.80	20.14	19.53	20.01	0.85	4.26

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์เมื่อใช้เครื่อง HPLC ต่างกันในการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีนในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล (n=3)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	ความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)					
	HPLC 1			HPLC 2		
	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
5.0	4.81	0.41	8.51	5.09	0.23	4.59
10.0	10.23	0.61	5.99	9.73	0.30	3.12
20.0	21.15	1.63	7.69	20.74	0.69	3.33

ตารางที่ 20 ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์เมื่อใช้เครื่อง HPLC ต่างกันในการวิเคราะห์แคฟเฟอีนในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล (n=3)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	ความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)					
	HPLC 1			HPLC 2		
	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
5.0	4.80	0.25	5.13	5.22	0.26	4.98
10.0	9.64	0.20	2.07	10.49	0.35	3.32
20.0	21.64	0.49	2.25	21.33	1.34	6.28

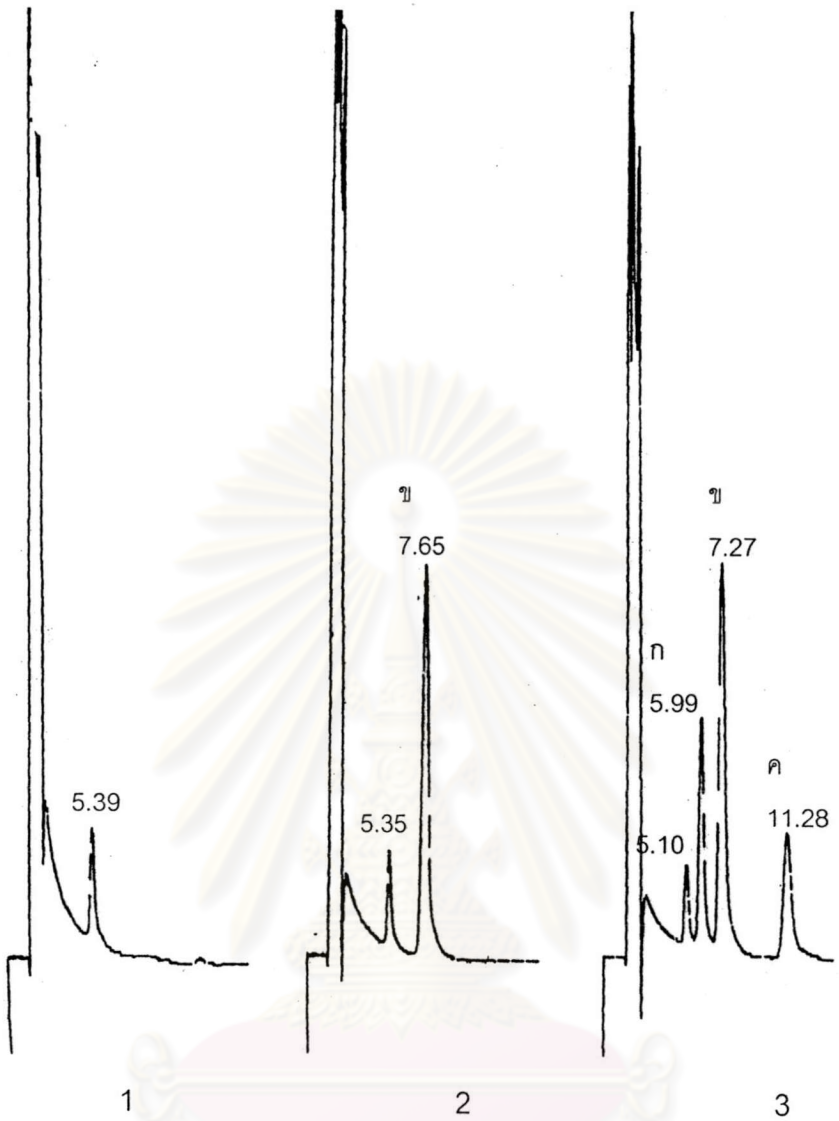
1.1.3.4 **ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา**

1.1.3.4.1 **ความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา** จากโครมาโตแกรม พบว่า พีคธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในแบลงค์พลาสมา ไม่ถูกรบกวนจาก endogenous substance ในพลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 12

1.1.3.4.2 **ความจำเพาะเจาะจงของธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน กับยาต่าง ๆที่อาจมีการใช้ก่อน หรือใช้ร่วมด้วย** จากผลการทดลอง พบว่า เวลาที่ยาต่างๆ ถูกชะออกจากคอลัมน์ ไม่ตรงกับธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน ในสภาวะทาง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา ดังแสดงในตารางที่ 21

นั่นคือการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา มีความจำเพาะเจาะจง ไม่มีการรบกวนจากสารใดในพลาสมา ตลอดทั้งยาที่อาจมีการใช้ก่อน และยาที่ถูกใช้ร่วมด้วย ดังนั้นจึงสามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล

1. แบลงค์พลาสมา
2. เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา
3. ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในแบลงค์พลาสมา และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา

โดย (ก)ธีโอฟิลลีน(5.99นาที) (ข)เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน(สารมาตรฐานภายใน) (7.27นาที) (ค)แคฟเฟอีน(11.28นาที)

โมบายเฟสที่ใช้คือ อะซีโตไนไตรล์: เมธานอล: อะซีเตด บัฟเฟอร์ 0.01โมลาร์ pH 3.50 (7: 6: 87 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

ตารางที่ 21 ความจำเพาะเจาะจงของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน ร่วมกับยาอื่นๆที่คาดว่ามีการใช้ก่อน และใช้ร่วมด้วย

ยา และสาร	เวลาที่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ (นาที)
Theophylline	6.09
Caffeine	11.38
Beta-hydroxyethyltheophylline	7.35
Ketotifen fumarate	>30
Salbutamol sulfate	3.43
Terbutaline sulfate	3.48
Dexamethasone sodium phosphate	>30
Prednisolone	>30
Ephedrine hydrochloride	-[1]
Adrenaline	-[2]

หมายเหตุ 1. Ephedrine hydrochloride ไม่มีการดูดกลืนแสงที่ 272 นาโนเมตร

2. Adrenaline เป็นสารที่มีอยู่ในร่างกาย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1.3.5 **ความคงตัวของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา**

1.1.3.5.1 **ที่อุณหภูมิห้อง** (25±2°C) ค่า %difference ของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน ในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อครบ 8 ชั่วโมง อยู่ระหว่าง -12.70 ถึง +12.15 และ +2.12 ถึง +13.93 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเกิน ±10% และเมื่อดูค่าดังกล่าวของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน ในชั่วโมงที่ 6 พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง -6.89 ถึง +9.64 และ -4.31 ถึง +5.41 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน ±10% ดังแสดงในตารางที่ 22 และ 23

ดังนั้นธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา สามารถคงตัวอยู่เพียง 6 ชั่วโมง เมื่อทิ้งไว้ ณ ห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิห้อง

1.1.3.5.2 **ที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง** (-18±3°C) ค่า %difference ของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อครบ 30 วัน อยู่ระหว่าง –9.58 ถึง +9.76 และ –6.30 ถึง +4.53 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน ±10% ดังแสดงในตารางที่ 24 และ 25

ดังนั้นธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา สามารถคงตัวได้ถึง 30 วัน เมื่อเก็บไว้ในช่องแช่แข็ง

1.1.3.5.3 **ที่** freeze-thaw cycle ค่า %difference ของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อครบ 3 รอบ อยู่ระหว่าง -8.38 ถึง +0.60 และ –8.73 ถึง +5.64 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน ±10% ดังแสดงในตารางที่ 26 และ 27

ดังนั้นธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา สามารถคงตัวอยู่เมื่อนำเข้าและออกจากช่องแช่แข็ง 3 รอบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 22 ความคงตัวของธีโอฟิลลีนในพลาสมา ที่อุณหภูมิห้อง (25±2°C)
ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างของความเข้มข้น (%difference)

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			ความเข้มข้น 20.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	+3.00	+6.25	+3.08	+7.02	+5.23	-3.31
4	-6.08	+6.08	-13.28	-3.58	+5.44	-9.42
6	+7.74	+7.62	+9.64	+0.38	-6.89	-1.27
8	+4.74	+12.15	-12.70	+0.26	-5.27	-4.84

ตารางที่ 23 ความคงตัวของแคฟเฟอีนในพลาสมา ที่อุณหภูมิห้อง (25±2°C)
ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างของความเข้มข้น (%difference)

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			ความเข้มข้น 20.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	-0.39	+5.34	-5.01	+3.50	+9.57	+9.18
4	+4.40	+9.58	+1.76	+9.66	+9.01	+4.19
6	-2.22	+2.70	-4.31	+5.41	+1.48	+1.62
8	+6.19	+13.93	+2.12	+4.51	+6.80	+4.99

ตารางที่ 24 ความคงตัวของธีโอฟิลลีนในพลาสมา ที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง (-18±3°C) ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างของความเข้มข้น (%difference)

ระยะเวลา (วัน)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			ความเข้มข้น 20.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	+3.96	+5.93	+7.73	-5.54	+4.80	+0.48
5	+0.51	+5.07	+5.47	-2.24	+4.47	+6.81
7	+6.06	+1.40	+6.09	-12.67	+8.85	-4.48
14	+5.23	+9.82	+7.53	-7.65	-6.56	-7.38
30	+5.76	+5.61	+9.76	-9.58	-6.75	-0.91

ตารางที่ 25 ความคงตัวของแคฟเฟอีนในพลาสมา ที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง (-18±3°C) ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างของความเข้มข้น (%difference)

ระยะเวลา (วัน)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			ความเข้มข้น 20.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	-6.62	-8.81	-3.88	+8.12	+6.59	+4.30
5	-3.60	-12.25	+5.93	+1.36	+9.42	+5.01
7	-9.56	+5.40	+10.43	-3.40	+4.25	+6.99
14	-8.68	-4.89	+3.65	-4.06	+6.49	-2.27
30	-6.30	-4.36	-3.43	-4.04	+4.53	-5.29

ตารางที่ 26 ความคงตัวของธีโอฟิลลีนในพลาสมา ที่ freeze-thaw cycle ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างของความเข้มข้น (%difference)

ระยะเวลา (รอบ)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			ความเข้มข้น 20.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	+9.03	+10.63	+6.86	-1.11	+3.92	+0.53
2	+4.61	+8.33	+9.30	+4.36	+9.55	+7.00
3	-2.47	+0.60	+0.04	-1.61	-8.38	-6.04

ตารางที่ 27 ความคงตัวของแคฟเฟอีนในพลาสมา ที่ freeze-thaw cycle ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างของความเข้มข้น (%difference)

ระยะเวลา (รอบ)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			ความเข้มข้น 20.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	-5.70	+0.51	+6.02	-1.99	+1.89	-2.34
2	-6.40	-4.44	+0.18	-2.12	+0.40	+4.82
3	+5.64	-8.73	+3.00	+1.67	+5.22	+4.42

1.1.3.6 **ความคงตัวของธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในสารละลายมาตรฐาน**

1.1.3.6.1 **ความคงตัวของธีโอฟิลลีนในสารละลายมาตรฐาน** ค่าเฉลี่ย %response ของสารละลายมาตรฐานเทียบกับที่เตรียมใหม่ของธีโอฟิลลีนในเมธานอล ที่ 100, 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อครบ 90 วัน มีค่าอยู่ที่ 99.96%, 98.27% และ 95.83% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 28

ดังนั้นสารละลายมาตรฐานธีโอฟิลลีนในเมธานอล ทั้งที่ใช้ในการวิเคราะห์ และใช้เป็นสต็อก สามารถคงตัวได้ถึง 90 วัน เมื่อเก็บในช่องแช่แข็ง

1.1.3.6.2 **ความคงตัวของแคฟเฟอีนในสารละลายมาตรฐาน** ค่าเฉลี่ย %response ของสารละลายมาตรฐานเทียบกับที่เตรียมใหม่ของแคฟเฟอีนในเมธานอล ที่ 100, 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อครบ 90 วัน มีค่าอยู่ที่ 93.21%, 93.57% และ 97.08% ตามลำดับ ซึ่งไม่มีค่าใดเกินเกณฑ์ที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 29

ดังนั้นสารละลายมาตรฐานแคฟเฟอีนในเมธานอล ทั้งที่ใช้ในการวิเคราะห์ และใช้เป็นสต็อก สามารถคงตัวได้ถึง 90 วัน เมื่อเก็บในช่องแช่แข็ง

1.1.3.6.3 **ความคงตัวของเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในสารละลายมาตรฐาน** ค่าเฉลี่ย %response ของสารละลายมาตรฐานเทียบกับที่เตรียมใหม่ของเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในเมธานอล ที่ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อครบ 90 วัน มีค่าอยู่ที่ 110.8% และ 113.2% ตามลำดับ ซึ่งค่าทั้ง 2 เกินเกณฑ์ที่กำหนด และเมื่อดูค่าเฉลี่ย %response ในวันที่ 60 พบว่า มีค่าอยู่ที่ 104.9% และ 100.0% ตามลำดับ ซึ่งไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 30

ดังนั้นสารละลายมาตรฐานเบต้า-ไฮรอกเอทิลธีโอฟิลลีนในเมธานอล ทั้งที่ใช้ในการวิเคราะห์ และใช้เป็นสต็อก คงตัวอยู่เพียง 60 วัน เมื่อเก็บในช่องแช่แข็ง

จากผลการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา โดยใช้การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต ร่วมกับเมธานอล ปรากฏว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นผ่านการประเมินในทุกหัวข้อ ทำให้สามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้มาใช้การติดตามระดับธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมาของผู้ป่วยได้ แต่เนื่องจากวิธีวิเคราะห์ที่ได้ใช้ปริมาตรพลาสมา และสารแยกพลาสมาโปรตีนที่น้อยมาก โอกาสเกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์จึงอาจมีได้ ดังนั้นเมื่อมีนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้จึงควรระมัดระวัง

ผลการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในทุกหัวข้อของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา ได้รวบรวมและสรุป ดังแสดงในตารางที่ 31 และ 32 ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 28 ความคงตัวของสารละลายธีโอฟิลลีนในเมธานอล ที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง (-18±3°C) ในรูปค่า %response ของสารละลายมาตรฐานเทียบกับที่เตรียมใหม่

ระยะเวลา (วัน)	%response (n=3)					
	ความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์				ความเข้มข้นที่ใช้เป็นสต็อก	
	100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
0	100.0	0.00	100.0	0.00	100.0	0.00
7	99.70	1.41	102.9	0.90	104.9	1.27
14	102.1	3.39	100.7	0.20	99.87	0.74
21	97.35	3.65	96.92	4.00	100.3	1.58
30	98.23	0.91	108.9	3.14	98.31	0.72
40	98.36	3.68	94.98	1.83	106.5	2.21
50	104.5	2.77	101.2	1.72	99.13	1.41
60	100.3	4.08	93.68	4.23	102.4	1.89
90	99.96	3.02	98.27	4.37	95.83	1.57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 29 ความคงตัวของสารละลายแคฟเฟอีนในเมธานอล ที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง (-18±3°C) ในรูปค่า %response ของสารละลายมาตรฐานเทียบกับที่เตรียมใหม่

ระยะเวลา (วัน)	%response (n=3)					
	ความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์				ความเข้มข้นที่ใช้เป็นสต็อก	
	100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
0	100.0	0.00	100.0	0.00	100.0	0.00
7	98.97	0.60	99.15	0.15	99.15	2.19
14	100.9	3.59	99.60	1.87	99.29	1.92
21	97.83	4.32	96.50	1.90	103.9	0.81
30	97.22	3.56	94.78	16.58	100.1	6.86
40	93.13	2.43	98.72	2.08	96.12	1.85
50	95.94	2.38	94.99	0.83	100.1	2.32
60	104.3	4.11	95.02	3.47	104.8	3.67
90	93.21	0.39	93.57	0.85	97.08	3.92

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 30 ความคงตัวของสารละลายเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในเมธานอลที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง (-18±3°C) ในรูปค่า %response ของสารละลายมาตรฐานเทียบกับที่เตรียมใหม่

ระยะเวลา (วัน)	%response (n=3)					
	ความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์				ความเข้มข้นที่ใช้เป็นสต็อก	
	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
0	100.0	0.00	100.0	0.00	100.0	0.00
7	99.77	4.94	99.23	1.80	103.1	0.80
14	105.0	1.74	98.26	0.73	99.05	0.37
21	104.1	0.85	96.58	1.90	104.5	2.37
30	100.2	3.77	101.5	1.61	99.6	0.61
40	107.2	2.16	102.2	9.44	101.3	1.87
50	107.3	3.73	100.9	5.82	99.03	4.28
60	104.9	1.00	102.0	4.90	100.0	4.63
90	110.8	6.78	123.3	20.89	113.2	5.36

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 31 สรุปการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีนในพลาสมาเมื่อแยกพลาสมาโปรตีน ด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล

หัวข้อของการ validate	ผลการทดลอง
1.Linearity	
Equation	$Y = 0.04372X + 0.02787$ ($R^2 = 0.9934$)
%RSD of slope	4.95
2.Accuracy	
%bias	-4.79 to +7.29
%analytical recovery $\bar{X}$(SD)	100.6 (8.44)
3.Precision	
intra-day precision %RSD	5.76 to 8.74
inter-day precision %RSD	3.45 to 7.20
reproducibility	
HPLC1 %RSD	5.99 to 8.51
HPLC2 %RSD	3.12 to 4.59
Correlation test	p = 0.000
4.Specificity and Selectivity	pass
5.Stability	
in plasma	
at room temperature (hours)	6
at storage temperature (days)	30
freeze thaw cycle (cycles)	3
in standard solution	
theophylline	
working solution (days)	90
stock solution (days)	90
beta-hydroxyethyltheophylline	
working solution (days)	60
stock solution (days)	60

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 32 สรุปการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แคฟเฟอีนในพลาสมาเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล

หัวข้อของการ validate	ผลการทดลอง
1.Linearity	
Equation	$Y = 0.04174X - 0.001306$ ($R^2 = 0.9955$)
% RSD of slope	3.84
2.Accuracy	
%bias	-4.80 to +6.98
%analyitcal recovery $\bar{X}$(SD)	99.93(7.04)
3.Precision	
intra-day precision %RSD	3.86 to 5.57
inter-day precision %RSD	4.26 to 5.93
reproducibility	
HPLC1 %RSD	2.07 to 5.13
HPLC2 %RSD	3.32 to 6.28
correlation test	p = 0.000
4.Specificity and Selectivity	pass
5.Stability	
in plasma	
at room temperature (hours)	6
at storage temperature (days)	30
freeze thaw cycle (cycles)	3
in standard solution	
caffeine	
working solution (days)	90
stock solution (days)	90
beta-hydroxyethyltheophylline	
working solution (days)	60
stock solution (days)	60

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1.4 การศึกษาระยะเวลาการใช้กราฟเทียบมาตรฐานในการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา

จากผลการทดลองได้สร้างกราฟเทียบมาตรฐานของการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา 3 เส้น ได้สมการของกราฟเทียบมาตรฐานดังนี้

ธีโอฟิลลีน

1. $Y = 0.04372X + 0.02787$ $R^2 = 0.9934$
2. $Y = 0.04557X - 0.01446$ $R^2 = 0.9995$
3. $Y = 0.04465X + 0.01056$ $R^2 = 0.9985$

แคฟเฟอีน

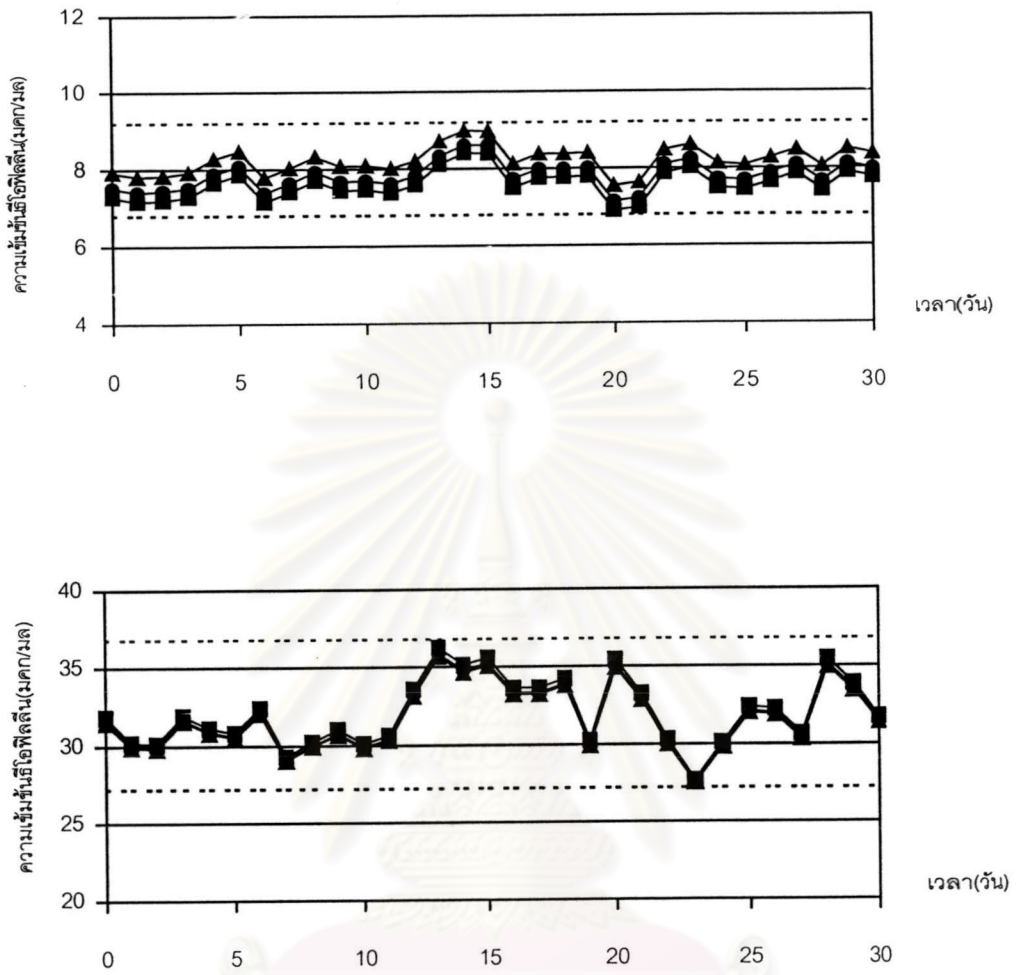
1. $Y = 0.04176X + 0.03001$ $R^2 = 0.9925$
2. $Y = 0.04213X + 0.00478$ $R^2 = 0.9987$
3. $Y = 0.04527X - 0.00959$ $R^2 = 0.9998$

เมื่อ Y เป็นอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค

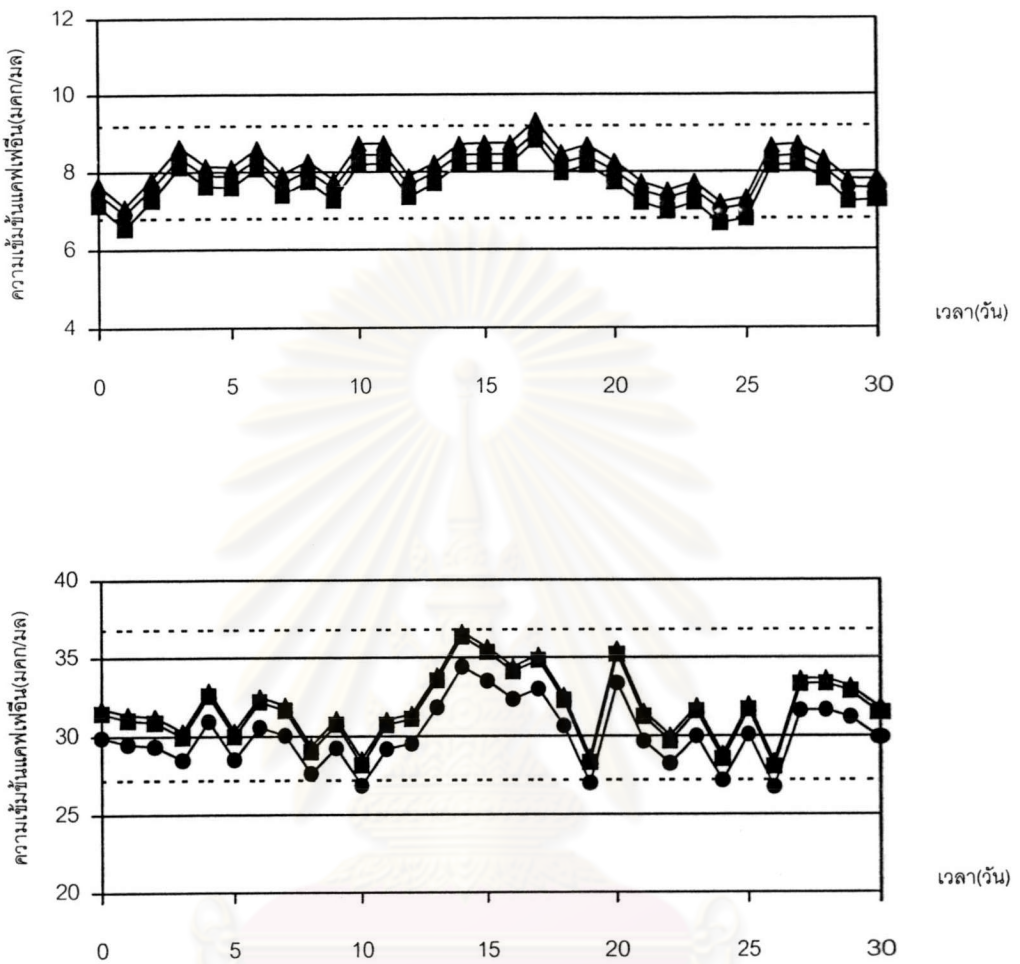
X เป็นความเข้มข้นของธีโอฟิลลีน หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา

เมื่อวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 8 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยกราฟเทียบมาตรฐานที่สร้างขึ้นข้างต้น ทุกๆวัน จนครบ 30 วัน พบว่า ค่าความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนด้วยกราฟเทียบมาตรฐาน 3 เส้นแล้วมีค่า % bias ไม่เกิน ±15% ดังแสดงในรูปที่ 13 และ 14

จากผลการศึกษาระยะเวลาการใช้กราฟเทียบมาตรฐาน จะเห็นได้ว่า กราฟเทียบมาตรฐานของการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนที่เตรียมขึ้น สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาในวันอื่นๆได้ โดยใช้แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของธีโอฟิลลีน หรือแคฟเฟอีน เป็นตัวตรวจสอบประสิทธิภาพของกราฟเทียบมาตรฐานในแต่ละวันที่มีการวิเคราะห์ และกราฟเทียบมาตรฐานของธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนที่เตรียมขึ้นในแต่ละครั้ง สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยได้ถึง 30 วัน



รูปที่ 13 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของธีโอฟิลลีนจากการวิเคราะห์กับเวลา เมื่อวิเคราะห์ด้วยกราฟเทียบมาตรฐาน 3 เส้น โดยในรูปบน และล่าง เป็นการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีนในแบลงค์พลาสมา ที่ 8 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในแต่ละกราฟนี้ มีเส้นปะ(- - - - -) แสดงถึงช่วงความเข้มข้น 6.80 ถึง 9.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 27.20 ถึง 36.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นของธีโอฟิลลีนจากการวิเคราะห์ที่มีค่า % bias ไม่เกิน ±15%



รูปที่ 14 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแคฟเฟอีนจากการวิเคราะห์กับเวลา เมื่อวิเคราะห์ด้วยกราฟเทียบมาตรฐาน 3 เส้น โดยในรูปบน และล่าง เป็นการวิเคราะห์แคฟเฟอีนในแบลงค์พลาสมา ที่ 8 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในแต่ละกราฟนี้ มีเส้นปะ(- - - -) แสดงถึงช่วงความเข้มข้น 6.80 ถึง 9.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 27.20 ถึง 36.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นของแคฟเฟอีนจากการวิเคราะห์ที่มีค่า % bias ไม่เกิน ±15%

1.2 การวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา

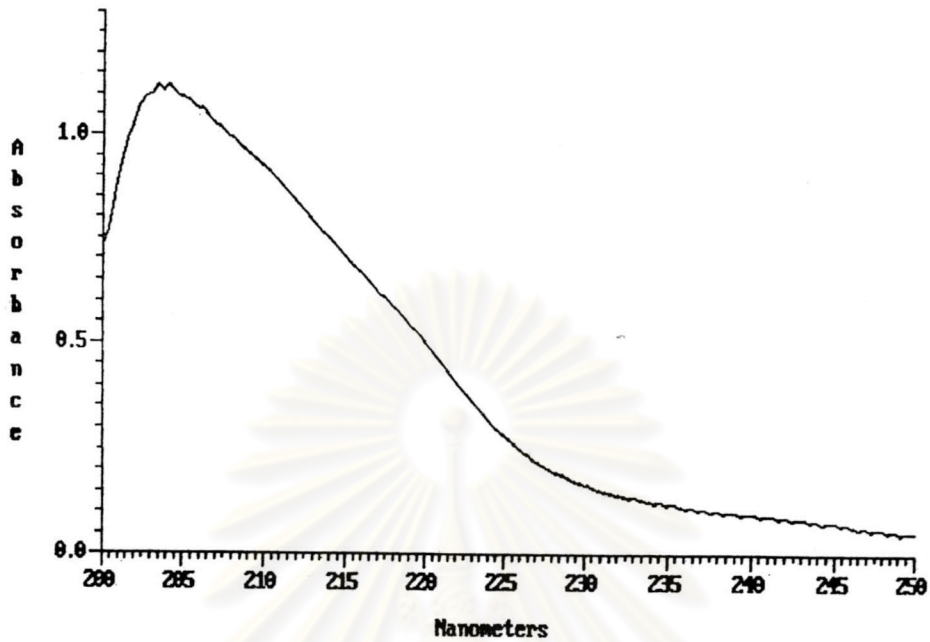
1.2.1 **สภาวะทางโครมาโตกราฟีสำหรับการวิเคราะห์เฟนิโทอิน** มีดังนี้

1.2.1.1 **ความยาวคลื่นที่เหมาะสมกับอัลตร้าไวโอเลต ดีเทคเตอร์** จากผลการทดลอง พบว่า สารละลายเฟนิโทอินในเมธานอล ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 205 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 15 ซึ่งความยาวคลื่นนี้ไม่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้ เพราะเป็นความยาวคลื่นที่ต่ำเกินไป สารต่างๆในพลาสมามีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าว ส่งผลให้รบกวนการวิเคราะห์เป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงเลื่อนค่าความยาวคลื่นขึ้นเรื่อยๆ จนได้ความยาวคลื่นที่ไม่มีสารต่างๆในพลาสมามารบกวนการวิเคราะห์ของ HPLC ซึ่งค่าความยาวคลื่นที่ได้คือ 225 นาโนเมตร

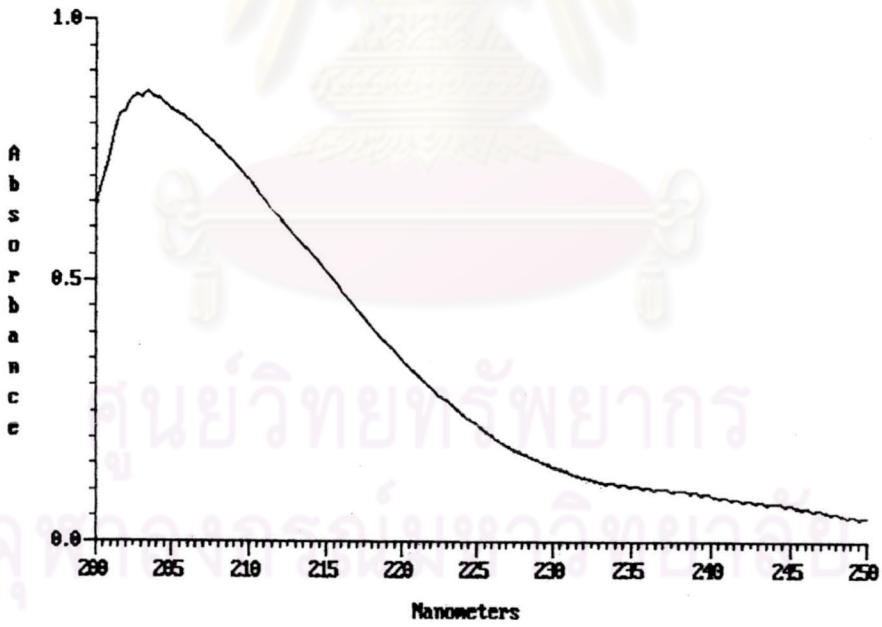
1.2.1.2 **สารมาตรฐานภายในที่เหมาะสม** การวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมาได้ทดลองนำฟีโนบาร์บิทอลมาเป็นสารมาตรฐานภายใน จากผลการทดลองพบว่าสารละลายฟีโนบาร์บิทอลในเมธานอล ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 204 นาโนเมตร ในขณะเดียวกันฟีโนบาร์บิทอลก็สามารถดูดกลืนแสงที่ 225 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์เฟนิโทอิน ดังแสดงในรูปที่ 16

ดังนั้นการวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา จึงใช้ความยาวคลื่นที่ 225 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นในสภาวะทาง HPLC และใช้ฟีโนบาร์บิทอลเป็นสารมาตรฐานภายในในการวิเคราะห์

1.2.1.3 **ผลการใช้สภาวะทาง HPLC** จากการวิเคราะห์เฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอลในสารละลายมาตรฐาน ด้วยสภาวะทาง HPLC ที่ทดลองได้ ดังแสดงในตารางที่ 33 พบว่า พีคเฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอลในโครมาโตแกรมมีเวลาที่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ 11.43 และ 5.58 นาที ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถใช้สภาวะทาง HPLC นี้ในการศึกษาวิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมาต่อไป



รูปที่ 15 สเปกตรัมของสารละลายเฟนิโทอินในเมธานอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 16 สเปกตรัมของสารละลายฟีโนบาร์บิทอลในเมธานอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 33 สภาวะทาง HPLC ของการวิเคราะห์เฟนิโทอิน

รายการ	สภาวะทาง HPLC
คอลัมน์	HIQ Sil C-18 5 μm,150X4.6 mm, i.d.
โมบายเฟส (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	Acetonitrile: Phosphate buffer 0.05 M pH 4.50 (30: 70)
อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	1
ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	225

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.2 ผลการศึกษาวิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา

1.2.2.1 **ผลการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนของเฟนิโทอิน** โดยใช้อะซีโตไนไตรล์ และเมธานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ซึ่งมีผลดังนี้

1.2.2.1.1 **ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของเฟนิโทอินในพลาสมาด้วยอะซีโตไนไตรล์**

- ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน เป็นตะกอนหยาบ สีเหลืองปนขาว ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่าหลอดทดลอง
- ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน เป็นสารละลายใส สีเหลือง และ pH ประมาณ 7 สามารถฉีดเข้า HPLC ได้ทันที
- ลักษณะโครมาโตแกรม พีคเฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอลในแบลงค์พลาสมา มีรูปร่างสมมาตร ขนาดพอเหมาะ ฐานพีคแคบ ดังแสดงในรูปที่ 17
- ค่าเฉลี่ย %physical recovery ของเฟนิโทอิน ฟีโนบาร์บิทอล ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในพลาสมา เท่ากับ 98.65% และ 98.54% ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ทั้ง 2 อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

1.2.2.2.2 **ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของเฟนิโทอินในพลาสมาด้วยเมธานอล**

- ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน เป็นตะกอนละเอียด สีขาว ฟุ้งกระจายได้เมื่อเขย่าหลอดทดลอง
- ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน เป็นสารละลายใส สีเหลืองอ่อน และ pH ประมาณ 7-8 สามารถฉีดเข้า HPLC ได้ทันที
- ลักษณะโครมาโตแกรม พีคเฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอล มีรูปร่างสมมาตร ขนาดพอเหมาะ ฐานพีคแคบ ดังแสดงในรูปที่ 18
- ค่าเฉลี่ย % physical recovery ของเฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอล ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในพลาสมา เท่ากับ 100.9% และ 98.49% ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ทั้ง 2 อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

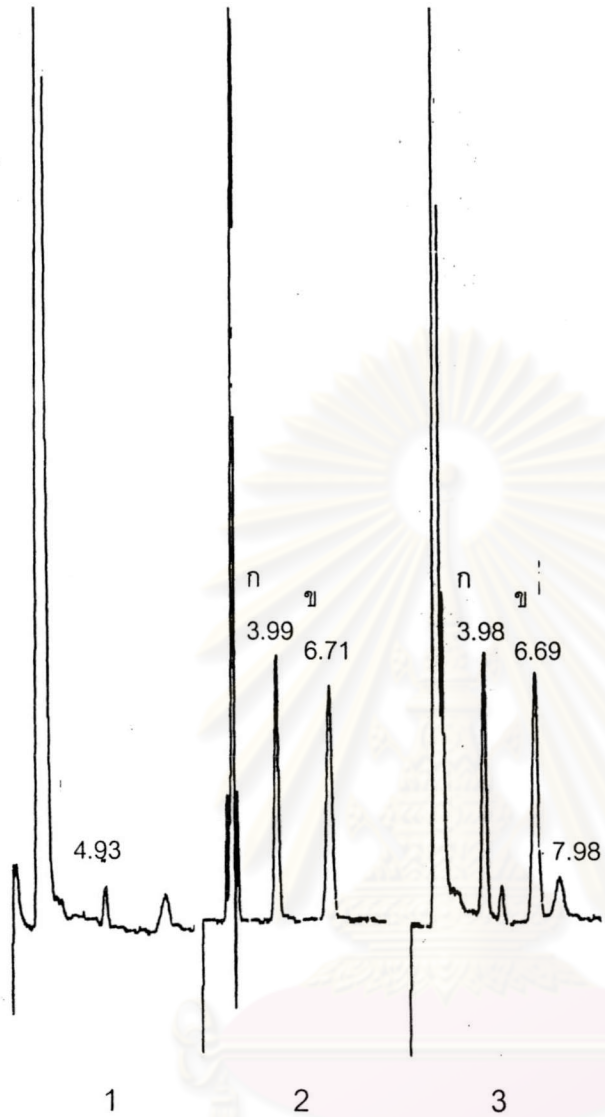
จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่า อะซีโตไนไตรล์ และเมธานอล เหมาะสมในการใช้เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน แต่เมื่อเปรียบเทียบผลการแยกพลาสมาโปรตีนของทั้ง 2 พบว่า อะซีโตไนไตรล์ เหมาะสมมากกว่าเมธานอล เพราะลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีนที่ได้ของอะซีโตไนไตรล์ เป็นตะกอนหยาบ ไม่ฟุ้งกระจาย ส่งผลให้การแยกสารละลายใสเหนือตะกอนทำได้ง่ายกว่าการใช้เมธานอล

1.2.2.2 ผลการปรับสภาวะทาง HPLC ให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา

จากสภาวะทาง HPLC ในการวิเคราะห์เฟนิโทอินในข้อ 1.2.1 เมื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ในพลาสมา ปรากฏว่า พีคเฟนิโทอิน ถูกรบกวนจาก endogenous substance ในพลาสมา ดังนั้นจึงมีการเปลี่ยนส่วนประกอบของโมบายเฟสให้เหมาะสม เพื่อให้สามารถศึกษาผลการเตรียมตัวอย่างได้ สำหรับโมบายเฟสที่ได้ คือ อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 6.00 (36: 64 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

วิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา ด้วยอะซีโตไนไตรล์ที่ได้ ได้รวบรวมและสรุปดังรูปที่ 19

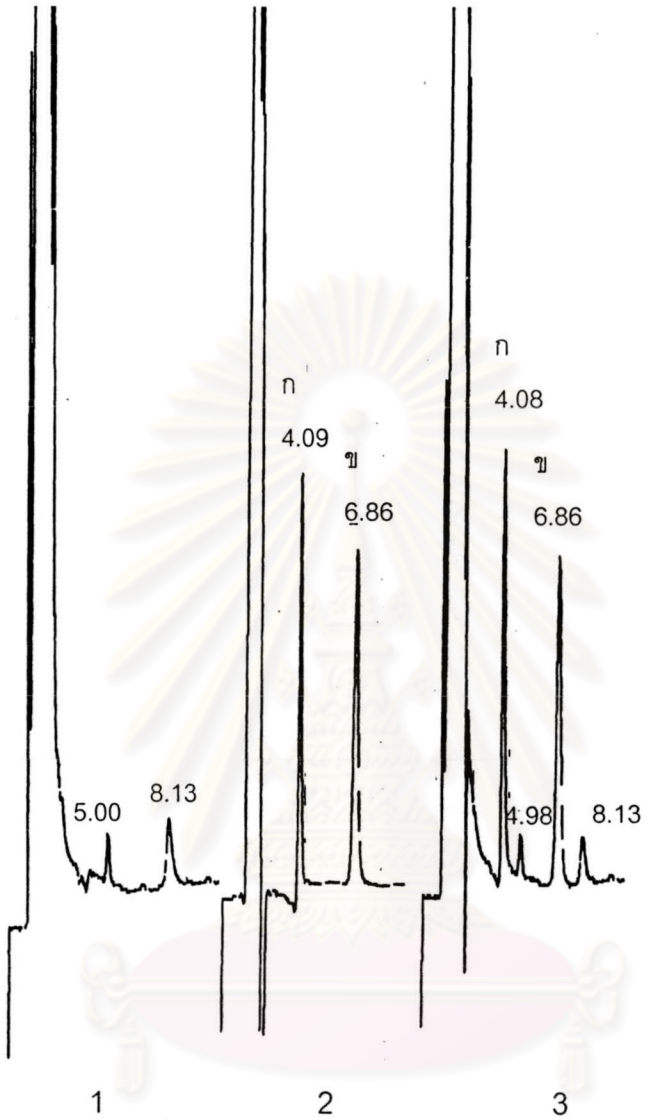
เมื่อเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมาที่ได้ในการศึกษานี้กับวิธีวิเคราะห์ที่มีรายงานมาก่อน พบว่า วิธีวิเคราะห์ที่ได้นี้มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพลาสมาที่ง่ายกว่า และไม่ยุ่งยาก เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการวิเคราะห์ซึ่งใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างพลาสมาโดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย [35, 37,40] และวิธีวิเคราะห์ที่ได้มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพลาสมาคล้ายกับรายงานการวิเคราะห์ [54] แต่เนื่องจากวิธีวิเคราะห์ที่เคยมีรายงานดังกล่าวไม่มีการใช้สารมาตรฐานภายใน โอกาสเกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์จึงสูงกว่าวิธีวิเคราะห์นี้



รูปที่ 17 โครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์เฟนิโทอินในแบลงค์พลาสมา เมื่อใช้อะซีโตไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

1. โครมาโตแกรมของแบลงค์พลาสมา
2. โครมาโตแกรมของเฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ
3. โครมาโตแกรมของเฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในแบลงค์พลาสมา

โดย (ก)ฟีโนบาร์บิทอล(สารมาตรฐานภายใน)(3.99นาที) (ข)เฟนิโทอิน(6.71นาที)
โมบายเฟสที่ใช้ คือ อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 6.00
(36: 64 อัตราส่วนโดยปริมาตร)



รูปที่ 18 โครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์เฟนิโทอินในแบลงค์พลาสมา เมื่อใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

1. โครมาโตแกรมของแบลงค์พลาสมา
2. โครมาโตแกรมของเฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ
3. โครมาโตแกรมของเฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในแบลงค์พลาสมา

โดย (ก)ฟีโนบาร์บิทอล(สารมาตรฐานภายใน)(4.09นาที) (ข)เฟนิโทอิน(6.86นาที)
โมบายเฟสที่ใช้ คือ อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 6.00
(36: 64 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

รูปที่ 19 วิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมาด้วยอะซีโตไนไตรล์

สภาวะทาง HPLC

คอลัมน์ ; HIQ Sil C-18 5μm, 150X 4.6 mm, i.d.

โมบายเฟส; อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05โมลาร์ pH 6.00 (36:64 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

อัตราการไหล; 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ความยาวคลื่น ; 225 นาโนเมตร

วิธีการเตรียมตัวอย่างพลาสมา

ผสมแบลงค์พลาสมา 100 ไมโครลิตร กับสารละลายเฟนิโทอิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 10 ไมโครลิตร

↓

เติมสารละลายฟีโนบาร์บิทอลในเมธานอล100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 10 ไมโครลิตร

↓ผสมโดยการวอร์เทก

เติมอะซีโตไนไตรล์ 400ไมโครลิตร

↓ผสมโดยการวอร์เทก

หมุนเหวี่ยงตัวอย่างพลาสมาด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 15,000 X g ต่อนาที นาน 5 นาที

↓

นำสารละลายใสเหนือตะกอนมาฉีดเข้า HPLC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.3 **การพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมาเมื่อแยกพลาสมาโปรตีน ด้วยอะซีโตไนไตรล์** เมื่อได้วิธีวิเคราะห์ของเฟนิโทอินในพลาสมาแล้ว จำเป็นต้องทำการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ก่อนนำไปกำหนดมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ ผลการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมามีดังนี้

1.2.3.1 **ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีคและความเข้มข้นของเฟนิโทอินในพลาสมา** จากผลหาความสัมพันธ์ดังกล่าวของเฟนิโทอินในพลาสมา มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 20
สมการตัวแทนเส้นตรงของเฟนิโทอินในพลาสมา คือ

$$Y = 0.1400X + 0.06442 \qquad R^2 = 0.9961$$

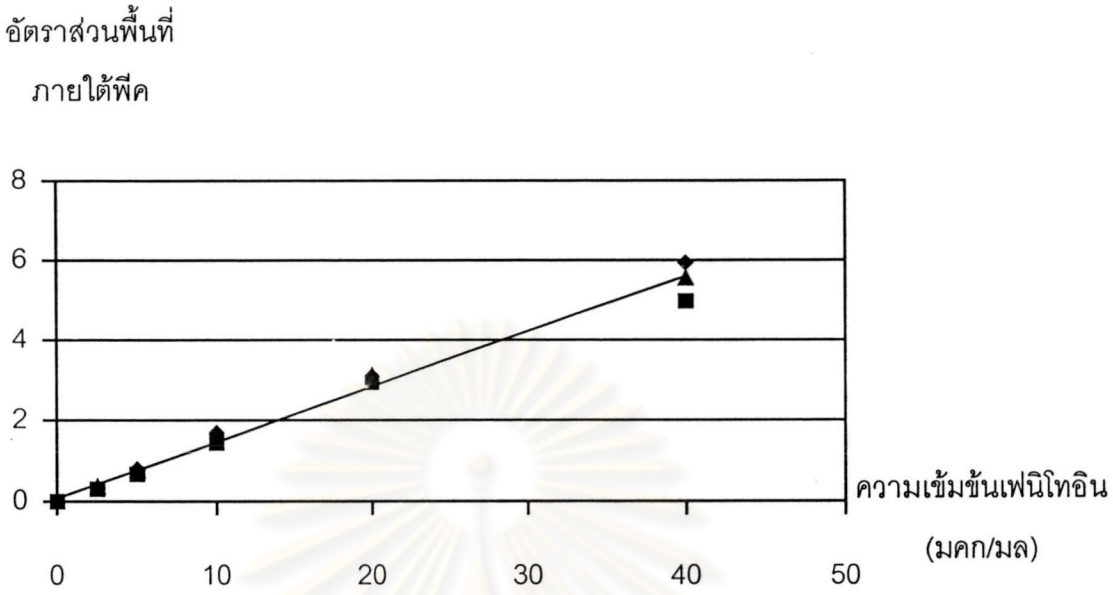
เมื่อ Y เป็นอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค และ X เป็นความเข้มข้นของเฟนิโทอินในพลาสมา

นอกจากนี้ ค่า%RSD ของความชันของสมการความสัมพันธ์ดังกล่าวทั้ง 3 ชุดของเฟนิโทอิน เท่ากับ 8.11% ซึ่งไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ 34

จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์นี้สามารถวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งครอบคลุมช่วงความเข้มข้นในการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วย

1.2.3.2 **ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา**
ผลการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของเฟนิโทอิน ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่าง มีค่า %bias อยู่ระหว่าง -5.39 ถึง +1.71 ซึ่งไม่เกิน ±15% ดังแสดงในตารางที่ 35 สำหรับค่าเฉลี่ย %analytical recovery เท่ากับ 96.76±5.73% ดังแสดงในตารางที่ 36

จากค่า %bias และ %analytical recovery ที่ได้ไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมานี้ เป็นวิธีวิเคราะห์ที่จัดว่าถูกต้องเพียงพอที่จะนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาได้



รูปที่ 20 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีคและความเข้มข้นของเฟนิโทอินในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์

ตารางที่ 34 การยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีคและความเข้มข้นของเฟนิโทอินในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ ในรูปร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความชันของสมการ (%RSD; n=3)

สมการที่	ความชัน	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
1	0.1484	0.1382	0.0112	8.11
2	0.1262			
3	0.1400			

ตารางที่ 35 ความถูกต้องในการวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีน ด้วยอะซีโตไนไตรล์ ในรูปร้อยละของความเบี่ยงเบนของวิธีวิเคราะห์ (%bias)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	%bias (n=5)					ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	
5.0	-9.37	-4.74	-9.13	-4.37	-2.74	-6.07
10.0	-0.85	-1.86	+0.16	+1.85	+9.26	+1.71
20.0	-10.84	-7.56	+2.08	+0.46	-11.13	-5.39

ตารางที่ 36 เปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ (%analytical recovery)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	%analytical recoveries (n=5)					ค่าเฉลี่ย	SD
	1	2	3	4	5		
5.0	90.63	95.26	90.87	95.63	97.26	93.93	3.00
10.0	99.15	98.14	100.2	101.8	109.3	101.7	4.45
20.0	89.18	92.44	102.1	100.5	88.87	94.62	6.28
ค่าเฉลี่ยรวม						96.76	5.73

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.3.3 **ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา**

1.2.3.3.1 **ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน** ผลการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของเฟนิโทอิน ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่าง มีค่า %RSD อยู่ระหว่าง 3.19 ถึง 6.64 ดังแสดงในตารางที่ 37

1.2.3.3.2 **ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน** ผลการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของเฟนิโทอิน ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน มีค่า %RSD อยู่ระหว่าง 5.64 ถึง 13.29 ดังแสดงในตารางที่ 38

จากผลการทดลองเพื่อหาความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน พบว่า ไม่มีการทดลองใดที่มีค่า %RSD เกิน 15% ซึ่งแสดงถึงวิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมานี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หรือในวันอื่นๆได้

1.2.3.3.3 **ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์เมื่อใช้เครื่อง HPLC ต่างกัน** ผลการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของเฟนิโทอิน ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย HPLC 2 เครื่อง พบว่า การวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา ด้วย HPLC เครื่องที่ 1 และ 2 มีค่า %RSD อยู่ระหว่าง 1.02 ถึง 7.10 และ 4.75 ถึง 9.89 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 39 นอกจากนี้ การวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมาด้วยเครื่อง HPLC ทั้ง 2 มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.000$)

จากผลการหาความเที่ยงตรงเมื่อใช้เครื่อง HPLC ต่างกัน พบว่า ไม่มีการทดลองกับเครื่อง HPLC ใดที่มีค่า %RSD เกิน 15% และการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ทั้ง 2 มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมานี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่แตกต่างกันได้

ตารางที่ 37 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันในการวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ (n=5)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	ความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)					ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
	1	2	3	4	5			
5.0	4.53	4.76	4.54	4.78	4.86	4.70	0.15	3.19
10.0	9.91	9.81	10.02	10.18	10.93	10.17	0.44	4.37
20.0	17.83	18.49	20.42	20.09	17.77	18.92	1.25	6.64

ตารางที่ 38 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันในการวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ (n=5)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	ความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)					ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
	1	2	3	4	5			
5.0	4.35	4.48	4.62	5.90	4.54	4.78	0.63	13.29
10.0	9.31	9.11	8.63	8.95	10.02	9.20	0.52	5.64
20.0	22.79	20.67	19.93	20.22	17.77	20.28	1.79	8.85

ตารางที่ 39 ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์เมื่อใช้เครื่อง HPLC ต่างกันในการวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ (n=3)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	ความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)					
	HPLC 1			HPLC 2		
	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
5.0	4.61	0.13	2.83	5.36	0.25	4.75
10.0	9.91	0.10	1.02	9.66	0.51	5.31
20.0	18.91	1.34	7.10	19.95	1.97	9.89

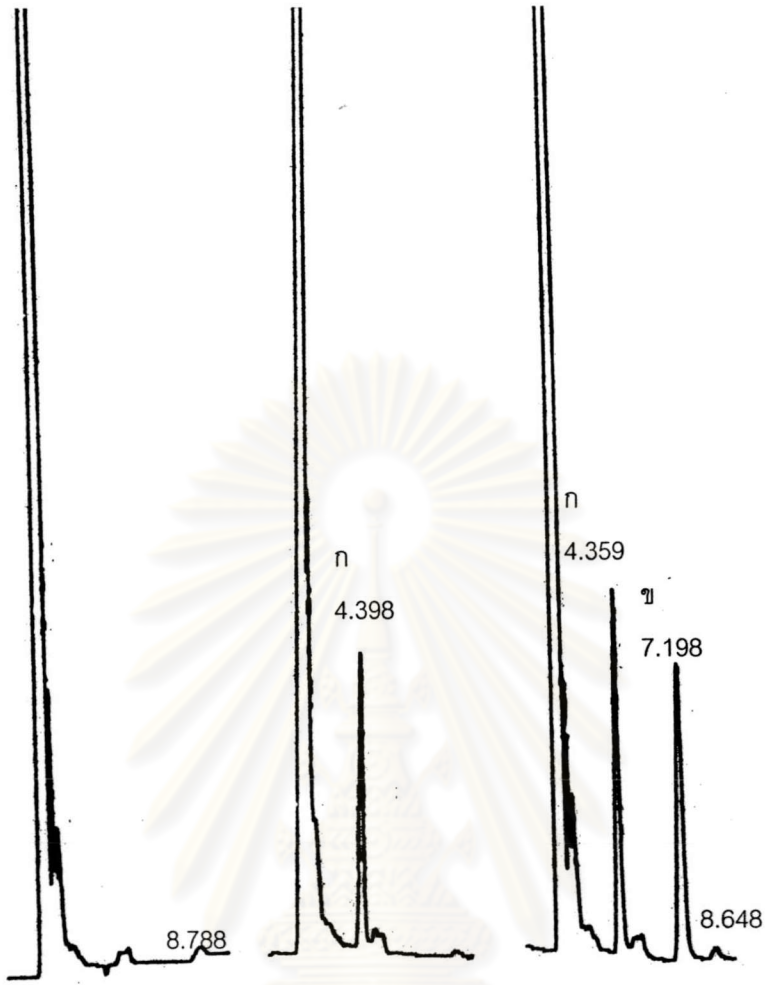
1.2.3.4 **ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา**

1.2.3.4.1 **ความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา** จากโครมาโตแกรม พบว่า พีคเฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอลในแบลงค์พลาสมาไม่มีการรบกวนจาก endogenous substance ในพลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 21

1.2.3.4.2 **ความจำเพาะเจาะจงของเฟนิโทอิน กับยาต่างๆที่อาจมีการใช้ก่อน หรือใช้ร่วมด้วย** จากผลการทดลอง พบว่า เวลาที่ยาต่างๆถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ ไม่ตรงกับของเฟนิโทอิน ในสภาวะทาง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา ดังแสดงในตารางที่ 40

จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่า วิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมานี้มีความจำเพาะเจาะจง ไม่มีการรบกวนจากสารใดในพลาสมา รวมทั้งยาที่อาจมีการใช้ก่อนและยาที่ถูกใช้ร่วมด้วย ด้วยเหตุนี้วิธีวิเคราะห์นี้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 21 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์

1. แบลงค์พลาสมา
2. ฟีโนบาร์บิทอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา
3. เฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา

โดย (ก)ฟีโนบาร์บิทอล(สารมาตรฐานภายใน)(4.359นาที) (ข)เฟนิโทอิน(7.198นาที)
โมบายเฟสที่ใช้ คือ อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 6.00
(36: 64 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

ตารางที่ 40 ความจำเพาะเจาะจงของเฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอล ร่วมกับยาอื่นๆ ที่คาดว่ามีการใช้ก่อน และใช้ร่วมด้วย

ยา	เวลาที่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์(นาที)
Phenytoin	7.627
Phenobarbital	4.475
Carbamazepine	7.253
Lidocaine hydrochloride	8.807
Lorazepam	9.577
Clonazepam	11.007
Diazepam	27.745
Valproic acid	>30

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.3.5 **ความคงตัวของเฟนิโทอินในพลาสมา**

1.2.3.5.1 **ที่อุณหภูมิห้อง** (25±2°C) ค่า %difference ของเฟนิโทอินในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อครบ 8 ชั่วโมง อยู่ระหว่าง –6.24 ถึง +2.40 ซึ่งไม่เกิน ±10% ดังแสดงในตารางที่ 41

ดังนั้นเฟนิโทอินในพลาสมา สามารถคงตัวถึง 8 ชั่วโมง เมื่อทิ้งไว้ ณ ห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิห้อง

1.2.3.5.2 **ที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง** (-18±3°C) ค่า %difference ของเฟนิโทอินในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อถึงวันที่ 7 มีค่าอยู่ระหว่าง +32.80 ถึง +153.6 ซึ่งมีค่าเกิน ±10% และเมื่อดูค่าดังกล่าวในวันที่ 5 พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง –8.48 ถึง +4.29 ซึ่งไม่เกิน ±10 % ดังแสดงในตารางที่ 42

ดังนั้นเฟนิโทอินในพลาสมา สามารถคงตัวเพียง 5 วัน เมื่อเก็บไว้ในช่องแช่แข็ง

1.2.3.5.3 **ที่** freeze-thaw cycle ค่า % difference ของเฟนิโทอินในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อครบ 3 รอบ อยู่ระหว่าง -0.13 ถึง+9.16 ซึ่งไม่เกิน ±10% ดังแสดงในตารางที่ 43

ดังนั้นเฟนิโทอินในพลาสมา สามารถคงตัวเมื่อนำเข้าและออกจากช่องแช่แข็ง 3 รอบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 41 ความคงตัวของเฟนิโทอินในพลาสมา ที่อุณหภูมิห้อง (25±2°C) ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างของความเข้มข้น (%difference)

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			ความเข้มข้น 20.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	-1.90	+2.97	+4.70	+5.12	-3.20	+3.21
4	-5.98	-6.20	+4.00	-6.09	+6.48	-2.27
6	+4.15	-3.09	+4.16	+6.73	+6.20	+3.94
8	+2.40	-0.22	-6.24	-1.27	+1.79	-1.59

ตารางที่ 42 ความคงตัวของเฟนิโทอินในพลาสมา ที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง (-18±3°C) ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างของความเข้มข้น (%difference)

ระยะเวลา (วัน)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			ความเข้มข้น 20.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	+0.38	+3.07	-1.47	-3.95	-3.77	-3.97
5	+4.29	+2.19	-8.48	-1.16	-0.93	-2.94
7	+35.73	+35.88	+32.80	+150.5	+153.6	+112.5

ตารางที่ 43 ความคงตัวของเฟนิโทอินในพลาสมา ที่ freeze-thaw cycle ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างของความเข้มข้น (%difference)

ระยะเวลา (รอบ)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			ความเข้มข้น 20.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	+1.17	+3.56	-0.63	+5.54	+5.89	+1.07
2	+3.91	-0.33	+4.93	+0.85	-5.18	-4.75
3	+9.16	+4.40	+0.68	-0.13	+0.06	+7.06

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.3.6 **ความคงตัวของเฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอลในสารละลายมาตรฐาน**

1.2.3.6.1 **ความคงตัวของเฟนิโทอินในสารละลายมาตรฐาน**

ค่าเฉลี่ย % response ของสารละลายมาตรฐานเทียบกับที่เตรียมใหม่ของเฟนิโทอินในเมธานอล ที่ 100, 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อครบ 90 วัน พบว่า มีค่าอยู่ที่ 115.1%, 101.7% และ 105.6% ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ย %response ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเกินเกณฑ์ที่กำหนด ส่วนอีก 2 ความเข้มข้น ไม่มีค่าใดเกินเกณฑ์ที่กำหนด เมื่อดูค่าเฉลี่ย %response ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 60 พบว่า มีค่าอยู่ที่ 104.5 ซึ่งไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 44

ดังนั้นสารละลายมาตรฐานเฟนิโทอินในเมธานอล ที่ใช้ในการวิเคราะห์ สามารถคงตัวเพียง 60 วัน ส่วนที่ใช้เป็นสต็อก สามารถคงตัวถึง 90 วัน เมื่อเก็บในช่องแช่แข็ง

1.2.3.6.2 **ความคงตัวของฟีโนบาร์บิทอลในสารละลายมาตรฐาน**

เนื่องจากฟีโนบาร์บิทอล เป็นทั้งยาที่ศึกษา และสารมาตรฐานภายในในการวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา ดังนั้นการศึกษาความคงตัวของฟีโนบาร์บิทอลในสารละลายมาตรฐาน จึงมีการศึกษาจำนวน 3 ความเข้มข้น เช่นเดียวกับการศึกษาความคงตัวของยาที่ศึกษา

ค่าเฉลี่ย %response ของสารละลายมาตรฐานเทียบกับที่เตรียมใหม่ของฟีโนบาร์บิทอล ในเมธานอล ที่ 100, 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อครบ 90 วัน พบว่า มีค่าอยู่ที่ 113.2%, 104.1 และ 102.9% ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ย %response ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเกินเกณฑ์ที่กำหนด ส่วนอีก 2 ความเข้มข้น ไม่มีค่าใดเกินเกณฑ์ที่กำหนด เมื่อดูค่าเฉลี่ย %response ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 60 พบว่า มีค่าอยู่ที่ 101.2% ซึ่งไม่เกณฑ์เกินที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 45

ดังนั้นสารละลายมาตรฐานฟีโนบาร์บิทอลในเมธานอล ที่ใช้ในการวิเคราะห์ สามารถคงตัวเพียง 60 วัน ส่วนที่ใช้เป็นสต็อก สามารถคงตัวถึง 90 วัน เมื่อเก็บในช่องแช่แข็ง

จากผลการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา โดยใช้การเตรียมตัวอย่างพลาสมาด้วยอะซีโตไนไตรล์ ปรากฏว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นผ่านการประเมินในทุกหัวข้อ ถึงแม้จะใช้ปริมาตรพลาสมาในการวิเคราะห์ที่น้อย ดังนั้นสามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้มาใช้การติดตามระดับเฟนิโทอินในพลาสมาของผู้ป่วยได้

ผลการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในทุกหัวข้อของเฟนิโทอินในพลาสมา ได้รวบรวมและสรุป ดังแสดงในตารางที่ 46

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 44 ความคงตัวของสารละลายเฟนิโทอินในเมธานอล ที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง (-18±3°C) ในรูปค่า %response ของสารละลายมาตรฐานเทียบกับที่เตรียมใหม่

ระยะเวลา (วัน)	%response (n=3)					
	ความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์				ความเข้มข้นที่ใช้เป็นสต็อก	
	100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
0	100.0	0.00	100.0	0.00	100.0	0.00
7	95.14	1.45	101.6	1.61	100.9	4.17
14	97.39	6.23	98.97	2.18	99.05	1.61
21	106.5	4.06	97.49	0.96	98.79	5.05
30	93.60	6.24	93.16	0.16	108.3	10.74
40	96.70	1.61	101.6	3.10	101.3	1.00
50	100.6	6.20	98.39	1.67	103.4	3.92
60	104.5	4.95	97.46	2.53	102.5	2.84
90	115.1	13.16	101.7	4.35	105.6	1.46

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 45 ความคงตัวของสารละลายฟีโนบาร์บิทอลในเมธานอล ที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง (-18±3°C) ในรูปค่า %response ของสารละลายมาตรฐานเทียบกับที่เตรียมใหม่

ระยะเวลา (วัน)	%response (n=3)					
	ความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์				ความเข้มข้นที่ใช้เป็นสต็อก	
	100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
0	100.0	0.00	100.0	0.00	100.0	0.00
7	102.5	3.43	104.9	2.01	96.39	2.30
14	99.33	5.72	102.3	2.58	103.1	5.00
21	100.4	2.88	103.6	2.23	101.4	2.28
30	93.80	0.04	90.89	2.70	101.8	1.31
40	98.34	4.68	92.45	4.25	104.8	2.25
50	103.0	5.88	100.1	1.84	106.7	2.37
60	101.2	2.22	97.01	1.06	102.4	0.89
90	113.2	6.92	104.1	1.57	102.9	3.46

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 46 สรุปการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมาเมื่อแยกพลาสมาโปรตีน ด้วยอะซีโตไนไตรล์

หัวข้อของการ validate		ผลการทดลอง
1.Linearity		
Equation		$Y = 0.1400X + 0.06442$ ($R^2 = 0.9961$)
%RSD of slope		8.11
2.Accuracy		
%bias		-6.07 to +1.71
%analytical recovery	$\bar{X}$(SD)	96.76(5.73)
3.Precision		
intra-day precision	%RSD	3.19 to 6.64
inter-day precision	%RSD	5.64 to 13.29
reproducibility		
HPLC1	%RSD	1.02 to 7.10
HPLC2	%RSD	4.75 to 9.89
correlation test		p = 0.000
4.Specificity and Selectivity		pass
5.Stability		
in plasma		
at room temperature	(hours)	8
at storage temperature	(days)	5
freeze thaw cycle	(cycles)	3
in standard solution		
phenytoin		
working solution	(days)	60
stock solution	(days)	90
phenobarbital		
working solution	(days)	60
stock solution	(days)	90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.4 การหาระยะเวลาการใช้กราฟเทียบมาตรฐานในการวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา

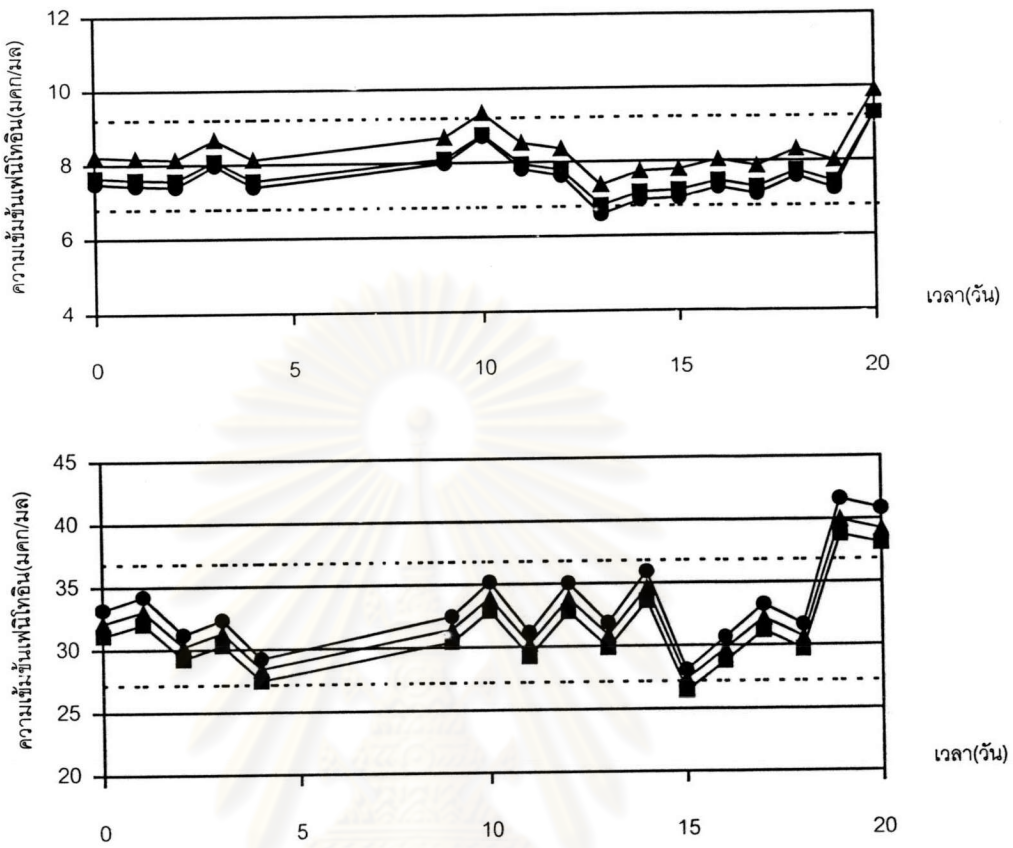
จากผลการทดลองได้สร้างกราฟเทียบมาตรฐานของการวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา 3 เส้น ได้สมการของกราฟเทียบมาตรฐานดังนี้

1. $Y = 0.1184X + 0.0309$ $R^2 = 0.9995$
2. $Y = 0.1162X - 0.0186$ $R^2 = 0.9990$
3. $Y = 0.1080X + 0.1279$ $R^2 = 0.9970$

เมื่อ Y เป็นอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค และ X เป็นความเข้มข้นของเฟนิโทอินในพลาสมา

เมื่อวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของเฟนิโทอินในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 8 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยกราฟเทียบมาตรฐานที่สร้างขึ้นข้างต้น ทุกๆวัน จนถึงวันที่ 19 พบว่า ค่าความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ด้วยกราฟเทียบมาตรฐานทั้ง 3 เส้น ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่า %bias เกิน ±15% และเมื่อทำการทดลองต่อในวันที่ 20 ค่าความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ที่ได้ทั้งที่ความเข้มข้น 8 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลตร มีค่า %bias เกินกำหนดอีกครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 22

จากผลการศึกษาระยะเวลาการใช้กราฟเทียบมาตรฐาน จะเห็นได้ว่ากราฟเทียบมาตรฐานของการวิเคราะห์เฟนิโทอินที่เตรียมขึ้น สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาในวันอื่นๆได้ โดยใช้แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของเฟนิโทอินเป็นตัวตรวจสอบประสิทธิภาพของกราฟเทียบมาตรฐานในแต่ละวันที่มีการวิเคราะห์ และกราฟเทียบมาตรฐานของเฟนิโทอินที่เตรียมขึ้นในแต่ละครั้ง สามารถนำไปใช้วิเคราะห์เฟนิโทอินในตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยได้ไม่เกิน 18 วัน



รูปที่ 22 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเฟนิโทอินจากการวิเคราะห์กับเวลา เมื่อวิเคราะห์ด้วยกราฟเทียบมาตรฐาน 3 เส้น โดยในรูปบน และล่างเป็นการวิเคราะห์เฟนิโทอินในแบลงค์พลาสมา ที่ 8 และ 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในแต่ละกราฟนี้ มีเส้นปะ(- - - - -) แสดงถึงช่วงความเข้มข้น 6.80 ถึง 9.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 27.20 ถึง 36.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นของเฟนิโทอินจากการวิเคราะห์ที่มีค่า % bias ไม่เกิน ±15%

1.3 **การวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอล ในพลาสมา**

1.3.1 **สภาวะทาง HPLC ในการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอล** มีดังนี้

1.3.1.1 **ความยาวคลื่นที่เหมาะสมกับอัลตร้าไวโอเลต ดีเทคเตอร์** จากผลการทดลอง พบว่า สารละลายฟีโนบาร์บิทอลในเมธานอล ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 204 นาโนเมตร ตามที่ได้กล่าวไปแล้วในการหาวิธีวิเคราะห์เฟนิโทอิน ดังแสดงในรูปที่ 16 ซึ่งความยาวคลื่นนี้ไม่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้ เพราะเป็นความยาวคลื่นที่ต่ำเกินไป สารต่างๆในพลาสมามีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าว ส่งผลให้รบกวนการวิเคราะห์เป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงเลื่อนค่าความยาวคลื่นขึ้นเรื่อยๆ จนได้ความยาวคลื่นที่ไม่มีสารต่างๆในพลาสมามารบกวนการวิเคราะห์ของ HPLC ซึ่งค่าความยาวคลื่นที่ได้คือ 225 นาโนเมตร เป็นค่าเดียวกันกับการวิเคราะห์เฟนิโทอิน

1.3.1.2 **สารมาตรฐานภายในที่เหมาะสม** การวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา ได้ทดลองนำเฟนิโทอินมาเป็นสารมาตรฐานภายใน จากผลการทดลอง พบว่า สารละลายเฟนิโทอินในเมธานอล ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 205 นาโนเมตร ตามที่ได้กล่าวไปแล้วในการหาวิธีวิเคราะห์เฟนิโทอิน ดังแสดงในรูปที่ 15 ในขณะเดียวกันเฟนิโทอินก็สามารถดูดกลืนแสงที่ 225 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลได้

ดังนั้นการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา จึงใช้ความยาวคลื่นที่ 225 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นในสภาวะทาง HPLC และใช้เฟนิโทอิน เป็นสารมาตรฐานภายในในการวิเคราะห์

1.3.1.3 **ผลการใช้สภาวะทาง HPLC** เนื่องจากการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอล มีสภาวะทาง HPLC เหมือนกับการวิเคราะห์เฟนิโทอินทุกประการ จึงได้นำผลในการวิเคราะห์เฟนิโทอินมาพิจารณา ซึ่งพบว่า สามารถนำใช้สภาวะทาง HPLC ในการวิเคราะห์เฟนิโทอิน ดังแสดงในตารางที่ 33 มาใช้ในการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลได้

1.3.2 ผลการศึกษาวิธีวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา

1.3.2.1 **ผลการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนของฟีโนบารีบิทอล** โดยใช้อะซีโตไนไตรล์ และเมธานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ซึ่งมีผลดังนี้

1.3.2.1.1 **ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมาด้วยอะซีโตไนไตรล์**

- ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน เป็นตะกอนหยาบ สีเหลืองปนขาว ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่าหลอดทดลอง
- ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน เป็นสารละลายใส สีเหลือง และ pH ประมาณ 7 สามารถฉีดเข้า HPLC ได้ทันที
- ลักษณะโครมาโตแกรม พีคฟีโนบาร์บิทอล และเฟนิโทอิน ในแบลงค์พลาสมา มีรูปร่างสมมาตร ขนาดพอเหมาะ ฐานพีคแคบ ดังแสดงในรูปที่ 23
- ค่าเฉลี่ย %physical recovery ของฟีโนบาร์บิทอล ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในพลาสมา เท่ากับ 99.47% ส่วนเฟนิโทอิน ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในพลาสมา มีค่าเท่ากับ 98.91% ซึ่งค่าที่ได้ทั้ง 2 อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

1.3.2.1.2 **ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา ด้วยเมธานอล**

- ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน เป็นตะกอนละเอียด สีขาว ฟุ้งกระจายได้เมื่อเขย่าหลอดทดลอง
- ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน เป็นสารละลายใส สีเหลืองอ่อน และ pH ประมาณ 7-8 สามารถฉีดเข้า HPLC ได้ทันที
- ลักษณะโครมาโตแกรม พีคฟีโนบาร์บิทอล และเฟนิโทอิน มีรูปร่างสมมาตร ขนาดพอเหมาะ ฐานพีคแคบ ดังแสดงในรูปที่ 24
- ค่าเฉลี่ย %physical recovery ของฟีโนบาร์บิทอล ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในพลาสมา เท่ากับ 98.86% ส่วนเฟนิโทอิน ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในพลาสมา มีค่าเท่ากับ 98.21% ซึ่งค่าที่ได้ทั้ง 2 อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

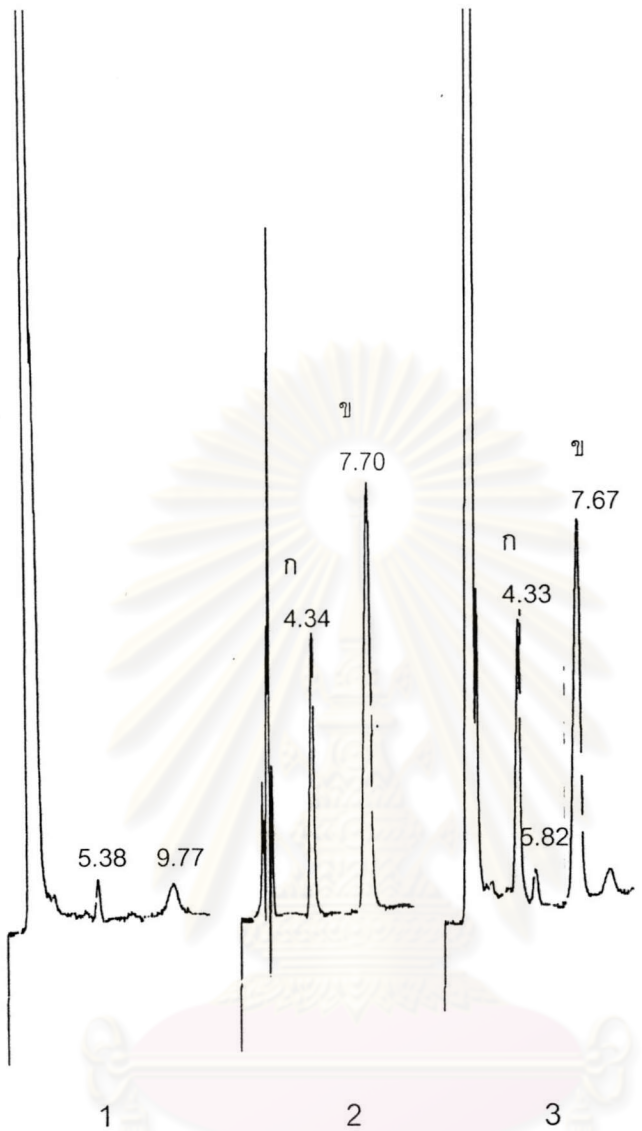
จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่า ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของฟีโนบาร์บิทอล เหมือนกับผลการแยกพลาสมาโปรตีนของเฟนิโทอิน กล่าวคือ ทั้งอะซีโตไนไตรล์ และเมธานอล สามารถใช้เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนได้ แต่หากเปรียบเทียบผลของทั้ง 2 แล้วพบว่า อะซีโตไนไตรล์ เหมาะสมกว่าเมธานอล เนื่องจากตะกอนพลาสมาโปรตีนที่ได้จากอะซีโตไนไตรล์ หยาบและแน่นกว่า การดูดแยกสารละลายเหนือตะกอนทำได้ง่ายกว่าการใช้เมธานอล

1.3.2.2 ผลการปรับสภาวะทาง HPLC ให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา

จากสภาวะทาง HPLC ในการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอล ในข้อ 1.3.1 เมื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ในพลาสมา ปรากฏว่า พีคเฟนิโทอิน ถูกรบกวนจาก endogenous substance ในพลาสมา เช่นเดียวกับการวิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมา และเนื่องจากการวิเคราะห์เฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมาคล้ายคลึงกัน จึงนำส่วนประกอบของโมบายเฟสที่ใช้วิเคราะห์เฟนิโทอินในพลาสมามาใช้กับการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา เพื่อให้ศึกษาวิธีเตรียมตัวอย่างพลาสมาได้ สำหรับโมบายเฟสที่ได้ คือ อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 6.00 (36: 64 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

วิธีวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา ด้วยอะซีโตไนไตรล์ที่ได้ ได้รวบรวมและสรุป ดังแสดงในรูปที่ 25

เมื่อเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมาที่ได้ในการศึกษานี้ กับวิธีวิเคราะห์ที่มีรายงานมาก่อน พบว่า วิธีวิเคราะห์ที่ได้นี้มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพลาสมาที่ง่ายกว่า และไม่ซับซ้อน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ที่เคยมีรายงานซึ่งใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างพลาสมาโดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย [35, 37,40]



รูปที่ 23 โครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในแบลงค์พลาสมาเมื่อใช้อะซีโตไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

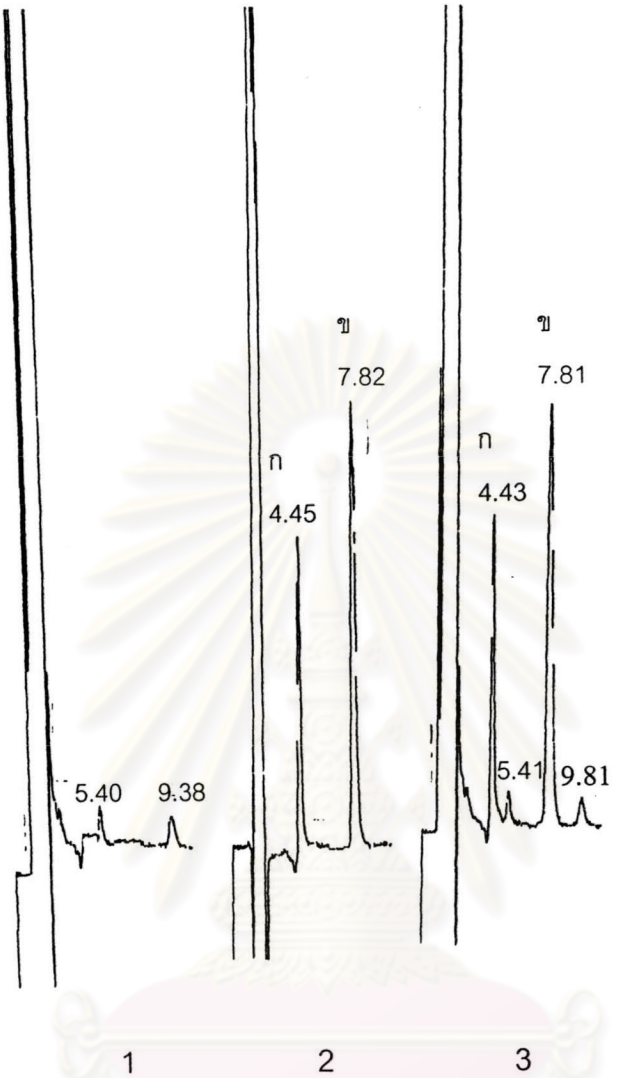
1. โครมาโตแกรมของแบลงค์พลาสมา

2. โครมาโตแกรมของฟีโนบาร์บิทอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ และเฟนิโทอิน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ

3.โครมาโตแกรมของฟีโนบาร์บิทอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา และเฟนิโทอิน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา

โดย (ก)ฟีโนบาร์บิทอล(สารมาตรฐานภายใน)(4.34นาที) (ข)เฟนิโทอิน(7.70นาที)

โมบายเฟสที่ใช้ คือ อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 6.00 (36: 64 อัตราส่วนโดยปริมาตร)



รูปที่ 24 โครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในแบลงค์พลาสมาเมื่อใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

1. โครมาโตแกรมของแบลงค์พลาสมา
2. โครมาโตแกรมของฟีโนบาร์บิทอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ และเฟนิโทอิน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ
3. โครมาโตแกรมของฟีโนบาร์บิทอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา และเฟนิโทอิน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา

โดย (ก)ฟีโนบาร์บิทอล(สารมาตรฐานภายใน)(4.45นาที) (ข)เฟนิโทอิน(7.82นาที)
โมบายเฟสที่ใช้ คือ อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 6.00 (36: 64 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

รูปที่ 25 วิธีวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมาด้วยอะซีโตไนไตรล์

สภาวะทาง HPLC

คอลัมน์ ; HIQ Sil C-18 5μm, 150X 4.6 mm, i.d.

โมบายเฟส; อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05โมลาร์ pH 6.00 (36:64 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

อัตราการไหล; 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ความยาวคลื่น ; 225 นาโนเมตร

วิธีการเตรียมตัวอย่างพลาสมา

ผสมแบลงค์พลาสมา 100 ไมโครลิตร กับสารละลายฟีโนบาร์บิทอลในเมธานอล 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 10 ไมโครลิตร

↓

เติมสารละลายเฟนิโทอินในเมธานอล 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 10 ไมโครลิตร

↓ผสมโดยการวอร์เทก

เติมอะซีโตไนไตรล์ 400ไมโครลิตร

↓ผสมโดยการวอร์เทก

หมุนเหวี่ยงตัวอย่างพลาสมาด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 15,000 X g ต่อนาที นาน 5 นาที

↓

นำสารละลายใสเหนือตะกอนมาฉีดเข้า HPLC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3.3 **การพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมาเมื่อแยกพลาสมาโปรตีน ด้วยอะซีโตไนไตรล์** เมื่อได้วิธีวิเคราะห์ของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมาแล้ว จำเป็นต้องพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ก่อนนำไปกำหนดมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ ผลการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา มีดังนี้

1.3.3.1 **ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีคและความเข้มข้นของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา** ผลการหาความสัมพันธ์ของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 26
สมการตัวแทนเส้นตรงของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา คือ

$$Y = 0.03772X - 0.02137 \qquad R^2 = 0.9998$$

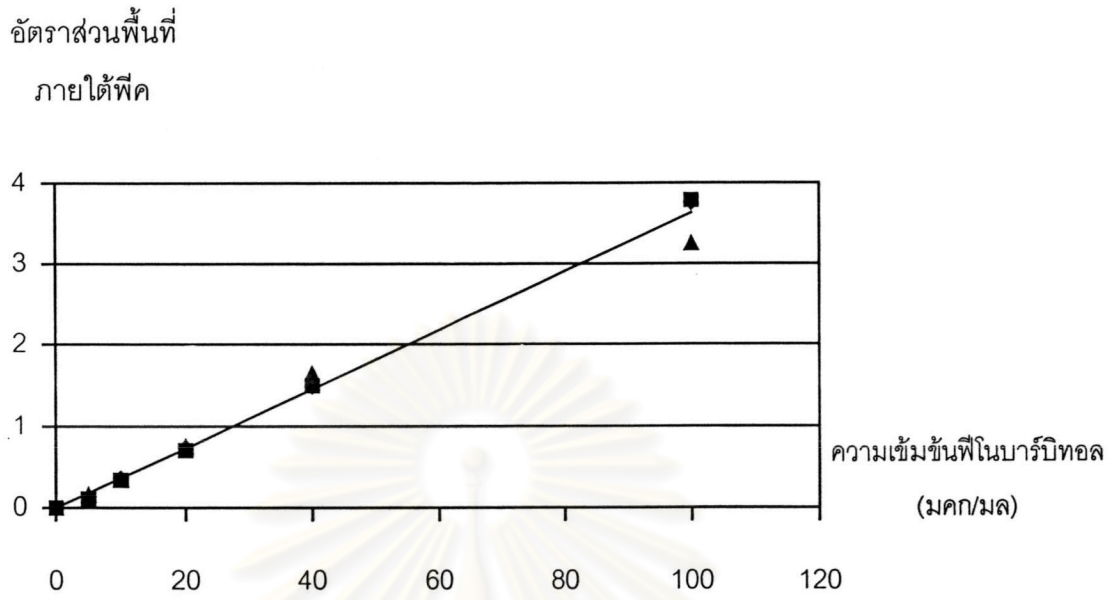
เมื่อ Y เป็นอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค และ X เป็นความเข้มข้นของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา

นอกจากนี้ ค่า%RSD ของความชันของสมการความสัมพันธ์ดังกล่าวทั้ง 3 ชุด ของฟีโนบาร์บิทอล เท่ากับ 8.22% ซึ่งไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ 47

ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้สามารถวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งครอบคลุมช่วงความเข้มข้นในการนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วย

1.3.3.2 **ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา** ผลการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของฟีโนบาร์บิทอล ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่าง มีค่า %bias อยู่ระหว่าง -8.36 ถึง -3.04 ซึ่งไม่เกิน ±15% ดังแสดงในตารางที่ 48 และมีค่าเฉลี่ย %analytical recovery เท่ากับ 94.15±3.72% ดังแสดงในตารางที่ 49

จากค่า %bias และ % analytical recovery ที่ไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด จะได้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมาที่ได้นี้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่จัดว่าถูกต้องเพียงพอที่จะนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาได้



รูปที่ 26 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค และความเข้มข้นของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์

ตารางที่ 47 การยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค และความเข้มข้นของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ ในรูปร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความชันของสมการ (%RSD; n=3)

สมการที่	ความชัน	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
1	0.03777	0.03631	0.00298	8.22
2	0.03829			
3	0.03288			

ตารางที่ 48 ความถูกต้องในการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ ในรูปร้อยละของความเบี่ยงเบนของวิธีวิเคราะห์ (%bias)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	%bias (n=5)					ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	
10.0	-8.64	-6.31	-5.23	-5.33	-5.23	-6.15
20.0	-13.13	-1.09	-9.47	-10.77	-7.41	-8.36
40.0	-4.27	-0.63	-0.50	-6.98	-2.81	-3.04

ตารางที่ 49 เปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ (% analytical recovery)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	% analytical recoveries (n=5)					ค่าเฉลี่ย	SD
	1	2	3	4	5		
10.0	91.36	93.69	94.77	94.67	94.77	93.85	1.47
20.0	86.87	98.91	90.53	89.23	92.59	91.63	4.57
40.0	95.73	99.37	99.50	93.02	97.19	96.96	2.71
ค่าเฉลี่ยรวม						94.15	3.72

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3.3.3 **ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา**

1.3.3.3.1 **ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน**

ผลการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของฟีโนบาร์บิทอล ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่าง มีค่า %RSD อยู่ระหว่าง 1.56 ถึง 4.99 ดังแสดงในตารางที่ 50

1.3.3.3.2 **ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน** ผลการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของฟีโนบาร์บิทอล ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน มีค่า %RSD อยู่ระหว่าง 3.27 ถึง 6.82 ดังแสดงในตารางที่ 51

จากผลการทดลองเพื่อหาความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน พบว่า ไม่มีการทดลองใดใน 2หัวข้อนี้ ที่มีค่า %RSD เกิน 15% แสดงถึงวิธีวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมานี้ สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันหรือในวันอื่นๆได้

1.3.3.3.3 **ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์เมื่อใช้เครื่อง HPLC ต่างกัน** ผลการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของฟีโนบาร์บิทอล ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย HPLC 2 เครื่อง พบว่า การวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา ด้วย HPLC เครื่องที่ 1 และ 2 มีค่า %RSD อยู่ระหว่าง 1.87 ถึง 6.70 และ 3.97 ถึง 5.27 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 52 นอกจากนี้ การวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมาด้วยเครื่อง HPLC ทั้ง 2 มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.000$)

จากผลการหาความเที่ยงตรงเมื่อใช้เครื่อง HPLC ต่างกัน พบว่า ไม่มีการทดลองในเครื่อง HPLC ใดที่มีค่า %RSD เกิน 15% และการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ทั้ง 2 มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมานี้ สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่แตกต่างกันได้

ตารางที่ 50 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันในการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ (n=5)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	ความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)					ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
	1	2	3	4	5			
10.0	9.14	9.37	9.48	9.47	9.48	9.39	0.15	1.56
20.0	17.37	19.78	18.10	17.85	18.52	18.32	0.91	4.99
40.0	38.29	39.75	39.80	37.21	38.87	38.78	1.08	2.80

ตารางที่ 51 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันในการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ (n=5)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	ความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)					ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
	1	2	3	4	5			
10.0	9.20	9.33	9.14	10.70	9.37	9.55	0.65	6.82
20.0	19.31	19.87	19.50	20.98	19.78	19.89	0.65	3.27
40.0	34.00	38.69	38.55	36.19	36.87	36.86	1.93	5.22

ตารางที่ 52 ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ เมื่อใช้เครื่อง HPLC ต่างกัน ในการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ (n=3)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	ความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)					
	HPLC 1			HPLC 2		
	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
10.0	9.32	0.17	1.87	9.25	0.40	4.27
20.0	18.42	1.23	6.70	19.02	0.76	3.97
40.0	39.28	0.86	2.18	42.86	2.26	5.27

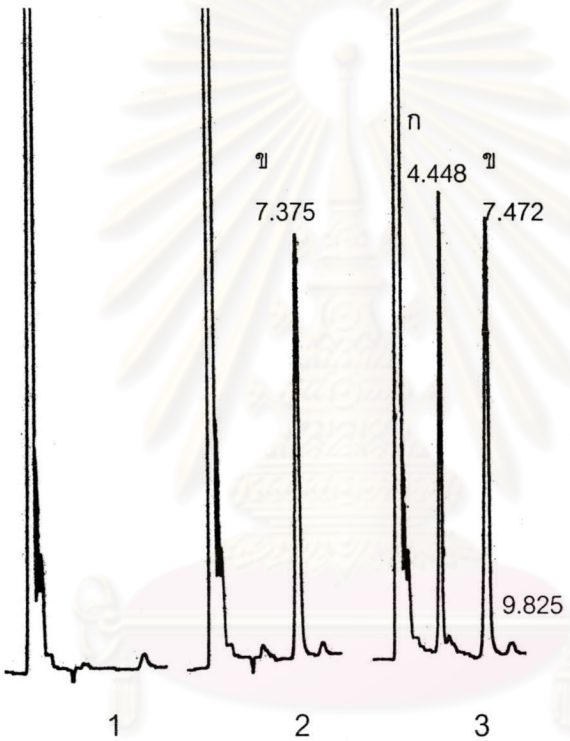
1.3.3.4 **ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา**

1.3.3.4.1 **ความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา** จากโครมาโตแกรม พบว่า พีคฟีโนบาร์บิทอล และเฟนิโทอิน ในแบลงค์พลาสมา ไม่มีการรบกวนจาก endogenous substance ในพลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 27

1.3.3.4.2 **ความจำเพาะเจาะจงของฟีโนบาร์บิทอล กับยาต่างๆที่อาจมีการใช้ก่อน หรือใช้ร่วมด้วย** จากผลการทดลอง พบว่า เวลาที่ยาต่างๆ ถูกชะออกจากคอลัมน์ไม่ตรงกับฟีโนบาร์บิทอล ในสภาวะ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอล ดังแสดงในตารางที่ 40

นั่นคือการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมานี้ มีความจำเพาะเจาะจง ไม่มีการรบกวนจากสารใดในพลาสมา ตลอดทั้งยาที่อาจมีการใช้ก่อน และยาที่ถูกใช้ร่วมด้วย ดังนั้นสามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 27 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์

1. แบลงค์พลาสมา
2. เฟนิโทอิน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา
3. ฟีโนบาร์บิทอล และเฟนิโทอิน 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา

โดย (ก)ฟีโนบาร์บิทอล(4.448นาที) (ข)เฟนิโทอิน(สารมาตรฐานภายใน)(7.472นาที)
โมบายเฟสที่ใช้ คือ อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 6.00
(36: 64 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

1.3.3.5 **ความคงตัวของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา**

1.3.3.5.1 **ที่อุณหภูมิห้อง** (25±2°C) ค่า %difference ของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 10 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อครบ 8 ชั่วโมง มีค่าอยู่ระหว่าง +3.27 ถึง +22.62 ซึ่งมีค่าเกิน ±10% และเมื่อดูค่าดังกล่าว ในชั่วโมงที่ 6 พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง –3.00 ถึง +2.93 ซึ่งไม่เกิน ±10 % ดังแสดงในตารางที่ 53

ดังนั้นฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา สามารถคงตัวเพียง 6 ชั่วโมง เมื่อทิ้งไว้ ณ ห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิห้อง

1.3.3.5.2 **ที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง** (-18±3°C) ค่า %difference ของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 10 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อครบ 30 วัน มีค่าอยู่ระหว่าง +10.90 ถึง +96.63 ซึ่งมีค่าเกิน ±10% และเมื่อดูค่าดังกล่าว ในวันที่ 14 พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง –3.61 ถึง +9.06 ซึ่งไม่มีเกิน ±10 % ดังแสดงในตารางที่ 54

ดังนั้นฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา สามารถคงตัวเพียง 14 วัน เมื่อเก็บไว้ในช่องแช่แข็ง

1.3.3.5.3 **ที่** freeze-thaw cycle ค่า % difference ของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 10 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อครบ 3 รอบ มีค่าอยู่ระหว่าง –16.50 ถึง –0.43 ซึ่งมีค่าเกิน ±10% และเมื่อดูค่าดังกล่าว ในรอบที่ 2 พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง –5.00 ถึง +1.95 ซึ่งไม่เกิน ±10% ดังแสดงในตารางที่ 55

ดังนั้นฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา สามารถคงตัวเมื่อนำเข้าและออกจากช่องแช่แข็งไม่เกิน 2 รอบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3.3.6 **ความคงตัวของฟีโนบาร์บิทอล และเฟนิโทอิน ในสารละลายมาตรฐาน**

ความคงตัวของฟีโนบาร์บิทอล และเฟนิโทอิน(สารมาตรฐานภายใน) ในสารละลายมาตรฐาน ได้แสดงในการวิเคราะห์เฟนิโทอิน ในตารางที่ 45 และ 44 ตามลำดับ โดยสารละลายมาตรฐานฟีโนบาร์บิทอลในเมธานอล ที่ใช้ในการวิเคราะห์ สามารถเก็บในช่องแช่แข็ง(-18±3°C) ได้เพียง 60 วัน ส่วนที่ใช้เป็นสต็อก เก็บได้ถึง 90 วัน สำหรับสารละลายมาตรฐานเฟนิโทอินในเมธานอล ที่ใช้ในการวิเคราะห์ สามารถเก็บในช่องแช่แข็งได้เพียง 60 วัน และที่ใช้เป็นสต็อก เก็บได้ถึง 90 วัน

จากผลการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา โดยใช้การเตรียมตัวอย่างพลาสมาด้วยอะซีโตไนไตรล์ ปรากฏว่า วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนานี้ผ่านการประเมินในทุกหัวข้อ ถึงแม้จะใช้ปริมาตรพลาสมาในการวิเคราะห์ที่น้อย ดังนั้นสามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้มาใช้การติดตามระดับฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมาของผู้ป่วยได้

ผลการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในทุกหัวข้อของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา ได้รวบรวม และสรุป ดังแสดงในตารางที่ 56

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 53 ความคงตัวของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา ที่อุณหภูมิห้อง (25±2°C) ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างของความเข้มข้นของยา (%difference)

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			ความเข้มข้น 40.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	-3.02	-4.51	-2.18	+1.43	+2.72	+0.27
4	+2.73	+8.64	+4.80	+2.38	+2.16	+1.23
6	-2.73	-3.00	-2.53	+2.93	+2.93	-1.43
8	+22.26	+11.72	+13.54	+3.27	+11.95	+6.00

ตารางที่ 54 ความคงตัวของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา ที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง (-18±3°C) ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างของความเข้มข้นของยา (%difference)

ระยะเวลา (วัน)	% difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			ความเข้มข้น 40.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	-8.72	-3.350	+1.37	-1.460	+0.28	+5.39
5	-1.71	+0.05	+3.58	+0.50	+2.17	+5.02
7	-3.74	+1.34	-2.14	+1.17	-4.11	-3.55
14	-3.61	+0.82	+9.04	-5.16	+3.86	-3.20
30	+47.72	+10.90	+37.97	+36.19	+96.63	+27.96

ตารางที่ 55 ความคงตัวของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา ที่ freeze-thaw cycle ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างของความเข้มข้นของยา (%difference)

ระยะเวลา (รอบ)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			ความเข้มข้น 40.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	-1.01	-3.06	-3.60	-1.67	-4.48	-7.01
2	-4.69	-5.00	-2.87	-1.95	+1.63	+0.59
3	-8.26	-8.99	-16.50	-7.62	-0.43	-4.22

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 56 สรุปการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมาเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์

หัวข้อของการ validate		ผลการทดลอง
1.Linearity		
Equation		$Y = 0.03772X - 0.02137 (R^2 = 0.9998)$
%RSD of slope		8.22
2.Accuracy		
%bias		-8.36 to –3.04
%analytical recovery	$\bar{X}$(SD)	94.15(3.72)
3.Precision		
intra-day precision	%RSD	1.56 to 4.99
inter-day precision	%RSD	3.27 to 6.82
reproducibility		
HPLC1	%RSD	1.87 to 6.70
HPLC2	%RSD	3.97 to 5.27
correlation test		p=0.000
4.Specificity and Selectivity		pass
5.Stability		
in plasma		
at room temperature	(hours)	6
at storage temperature	(days)	14
freeze thaw cycle	(cycles)	2
in standard solution		
phenobarbital		
working solution	(days)	60
stock solution	(days)	90
phenytoin		
working solution	(days)	60
stock solution	(days)	90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3.4 การหาระยะเวลาการใช้กราฟเทียบมาตรฐานในการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา

จากผลการทดลองได้สร้างกราฟเทียบมาตรฐานของการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา 3 เส้น ได้สมการของกราฟเทียบมาตรฐานดังนี้

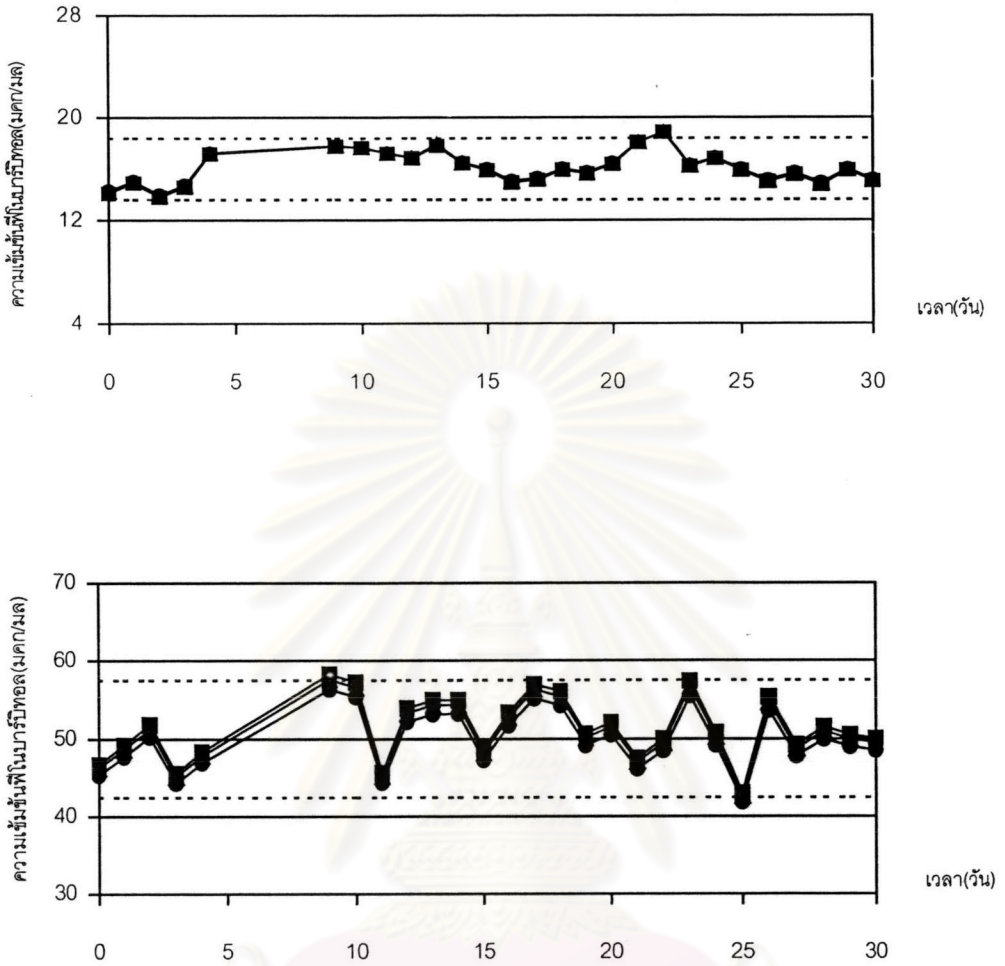
1. $Y = 0.03585X + 0.01405$ $R^2 = 0.9999$
2. $Y = 0.03649X - 0.00257$ $R^2 = 0.9999$
3. $Y = 0.03764X - 0.01789$ $R^2 = 0.9980$

เมื่อ Y เป็นอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค และ X เป็นความเข้มข้นของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา

เมื่อวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 16 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยกราฟเทียบมาตรฐานที่สร้างขึ้นข้างต้น ทุกๆวัน จนครบ 30 วัน พบว่า ค่าความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลด้วยกราฟเทียบมาตรฐาน 3 เส้น มีค่า % bias ไม่เกิน ±15% ดังแสดงในรูปที่ 28

จากผลการศึกษาระยะเวลาการใช้กราฟเทียบมาตรฐาน จะเห็นได้ว่ากราฟเทียบมาตรฐานของการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลที่เตรียมขึ้น สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาในวันอื่นๆได้ โดยใช้แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของฟีโนบาร์บิทอล เป็นตัวตรวจสอบประสิทธิภาพของกราฟเทียบมาตรฐานในแต่ละวันที่มีการวิเคราะห์ และกราฟเทียบมาตรฐานของฟีโนบาร์บิทอลที่เตรียมขึ้นในแต่ละครั้ง สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยได้ถึง 30 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 28 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟีโนบาร์บิทอลจากการวิเคราะห์ กับเวลา เมื่อวิเคราะห์ด้วยกราฟเทียบมาตรฐาน 3 เส้น โดยในรูปบน และล่าง เป็นการวิเคราะห์ฟีโนบาร์บิทอลในแบลงค์พลาสมา ที่ 16 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในแต่ละกราฟนี้ มีเส้นปะ(- - - - -) แสดงถึงช่วงความเข้มข้น 13.60 ถึง 18.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 42.50 ถึง 57.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นของฟีโนบาร์บิทอลจากการวิเคราะห์ที่มีค่า % bias ไม่เกิน ±15%

1.4 การวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา

1.4.1 **สภาวะทางโครมาโตกราฟีในการวิเคราะห์แวนโคมัยซิน** มีดังนี้

1.4.1.1 **ความยาวคลื่นที่เหมาะสมกับอัลตร้าไวโอเลต ดีเทคเตอร์** จากผลการทดลอง พบว่า สารละลายแวนโคมัยซินในเมธานอล ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 280 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 29 แต่เนื่องจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวต่ำ เมื่อนำค่าดังกล่าวไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า พีคแวนโคมัยซินมีขนาดเล็กมาก ดังนั้นจึงเลื่อนความยาวคลื่นลงไปที่ 225 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่แวนโคมัยซินมีการดูดกลืนแสงมากขึ้น ซึ่งค่าความยาวคลื่นที่ 225 นาโนเมตรที่ใช้ในการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมานี้เป็นค่าความยาวคลื่นเดียวกับที่ใช้ในการวิเคราะห์เฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอล

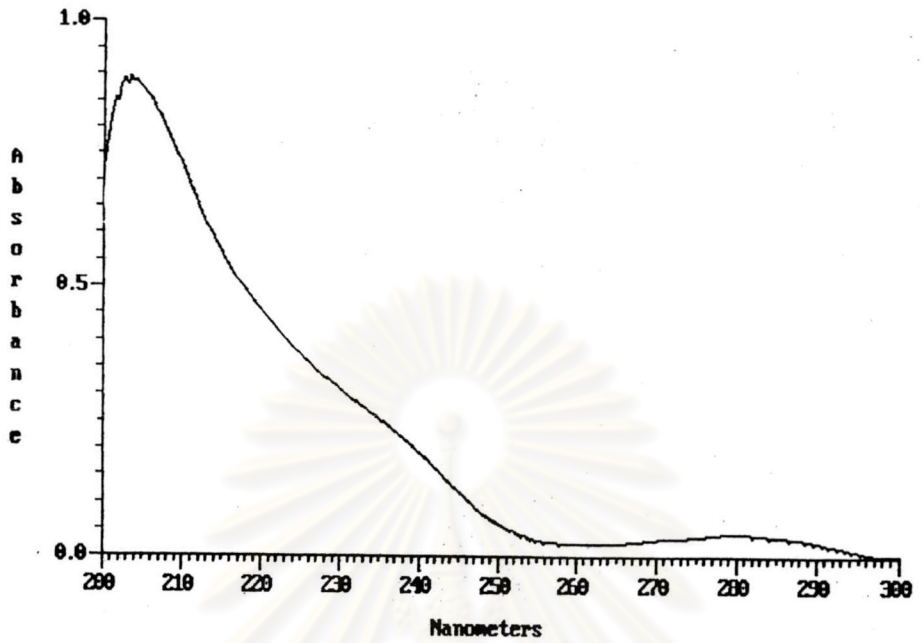
1.4.1.2 **สารมาตรฐานภายในที่เหมาะสม** การวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมาได้ทดลองนำเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน มาเป็นสารมาตรฐานภายในเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน เพื่อให้ชนิดของสารมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษานี้ไม่มากจนเกินไป

จากผลการทดลองพบว่า สารละลายเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในเมธานอล ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 272 นาโนเมตร ตามที่ได้กล่าวไปแล้วในการหาวิธีวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน แต่ในขณะเดียวกันเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนก็สามารถดูดกลืนแสงที่ 225 นาโนเมตรได้ ดังแสดงในรูปที่ 5

ดังนั้นการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา จึงใช้ความยาวคลื่นที่ 225 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นในสภาวะทาง HPLC และใช้เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนเป็นสารมาตรฐานภายในในการวิเคราะห์

1.4.1.3 **ผลการใช้สภาวะทาง HPLC** จากการวิเคราะห์แวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในสารละลายมาตรฐาน ด้วยสภาวะทาง HPLC ที่ทดลองได้ดังแสดงในตารางที่ 57 พบว่า พีคแวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในโครมาโตแกรม มีเวลาที่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ 6.117 และ 7.845 นาที ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถใช้สภาวะทาง HPLC นี้ในการศึกษาวิธีวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมาต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 29 สเปกตรัมของสารละลายแวนโคมัยซินในเมธานอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 57 สภาวะทาง HPLC ของการวิเคราะห์ปริมาณแวนโคมัยซิน

รายการ	สภาวะทาง HPLC
คอลัมน์	HIQ Sil C-18 5 µm, 150x4.6 mm, i.d.
โมบายเฟส (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	Acetonitrile: Phosphate buffer 0.05M pH 4.50 (10: 90)
อัตราการไหล(มิลลิลิตรต่อนาที)	1
ความยาวคลื่น(นาโนเมตร)	225

1.4.2 ผลการศึกษาวิธีวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา

1.4.2.1 **ผลการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนของแวนโคมัยซิน** โดยใช้อะซีโตไนไตรล์ เมธานอล และกรดไตรคลอโรอะซีติด เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ซึ่งมีผลดังนี้

1.4.2.1.1 **ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของแวนโคมัยซินในพลาสมาด้วยอะซีโตไนไตรล์**

- ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน เป็นตะกอนหยาบ สีเหลืองปนขาว ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่าหลอดทดลอง
- ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน เป็นสารละลายใส สีเหลือง และ pH ประมาณ 7-8 สามารถฉีดเข้า HPLC ได้ทันที
- ลักษณะโครมาโตแกรม พีคแวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิล ธีโอฟิลลีน ในแบลงค์พลาสมา มีรูปร่างไม่สมมาตร ขนาดเล็ก ฐานพีคกว้าง ดังแสดงในรูปที่ 30

จากลักษณะของพีคแวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน ในโครมาโตแกรมไม่เหมาะสม แสดงให้เห็นว่า อะซีโตไนไตรล์ไม่เหมาะเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนของการวิเคราะห์แวนโคมัยซิน จึงไม่จำเป็นต้องหาค่า %physical recovery อีกต่อไป

1.4.2.1.2 **ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของแวนโคมัยซินในพลาสมาด้วยเมธานอล**

- ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน เป็นตะกอนละเอียด สีขาว ฟุ้งกระจายได้เมื่อเขย่าหลอดทดลอง
- ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน เป็นสารละลายใส สีเหลืองอ่อน และ pH ประมาณ 7-8 สามารถฉีดเข้า HPLC ได้ทันที
- ลักษณะโครมาโตแกรม พีคพีคแวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิล ธีโอฟิลลีน มีรูปร่างสมมาตร ขนาดเล็ก ฐานพีคแคบ ดังแสดงในรูปที่ 31
- ค่าเฉลี่ย %analytical recovery ของแวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในพลาสมา เท่ากับ 43.97% และ 95.92% ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ย %analytical recovery ของแวนโคมัยซินที่ได้ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนด ส่วนเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน ค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

ถึงแม้โครมาโตแกรมของแวนโคมัยซินในน้ำ และในพลาสมา มีลักษณะเหมือนกัน เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ แต่เนื่องจากค่าเฉลี่ย %physical recovery ของแวนโคมัยซิน เมื่อใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน มีค่าต่ำกว่าที่กำหนดไว้ ทำให้เมธานอล จึงไม่เหมาะที่จะเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนของการวิเคราะห์แวนโคมัยซิน เนื่องจากถ้าใช้เมธานอลแล้ว การวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมาจะได้ค่าที่น้อยกว่าความเป็นจริง

เมื่อทั้งอะซีโตไนไตรล์ และเมธานอล ไม่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างพลาสมา และในขณะเดียวกันสารแยกพลาสมาโปรตีนประจุบวก เช่น ซิงค์ ก็ไม่เหมาะที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างพลาสมาของแวนโคมัยซิน เนื่องจากแวนโคมัยซิน สามารถทำปฏิกิริยากับซิงค์ได้ ดังนั้นจึงเลือกสารแยกพลาสมาโปรตีนที่มีประจุลบ คือ กรดไตรคลอโรอะซีติด มาศึกษาต่อไป

1.4.2.1.3 ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของแวนโคมัยซินในพลาสมาด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติด

- ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน เป็นตะกอนละเอียด สีขาว ฟุ้งกระจายได้เมื่อเขย่าหลอดทดลอง
- ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน เป็นสารละลายใส ไม่มีสี และ pH ประมาณ 0-1 ไม่สามารถฉีดเข้า HPLC ได้ จึงปรับ pH ของสารละลายดังกล่าวหลังจากแยกจากตะกอน และ pH ที่ได้อยู่ประมาณ 6-7 ซึ่งเป็น pH ที่สามารถฉีดสารละลายเหนือตะกอนเข้า HPLC ได้
- ลักษณะโครมาโตแกรม พีคพีคแวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน มีรูปร่างสมมาตร ขนาดพอเหมาะ ฐานพีคแคบ ดังแสดงในรูปที่ 32
- ค่าเฉลี่ย %physical recovery ของแวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในพลาสมา เท่ากับ 97.13% และ 98.94% ตามลำดับ ซึ่งค่าทั้ง 2 อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

จากโครมาโตแกรมของแวนโคมัยซิน ทั้งในน้ำ และในพลาสมา มีลักษณะเหมือนกัน เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด รวมทั้งค่าเฉลี่ย %physical recovery ของแวนโคมัยซิน ผ่านเกณฑ์ที่กำหนดไว้เช่นกัน ดังนั้นกรดไตรคลอโรอะซีติด จึงเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แวนโคมัยซิน

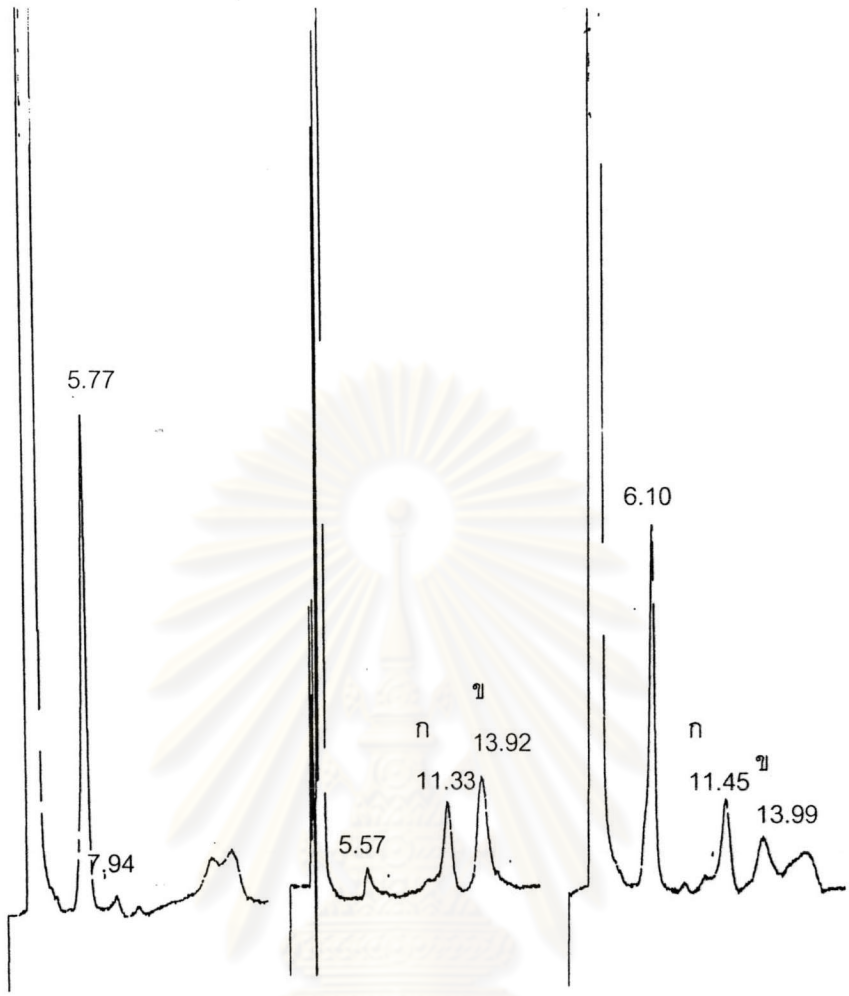
1.4.2.2 ผลการปรับสภาวะทาง HPLC ให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา

จากสภาวะทาง HPLC ในการวิเคราะห์แวนโคมัยซิน ในข้อ 1.4.1 เมื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ในพลาสมา ปรากฏว่า พีคแวนโคมัยซิน ถูกรบกวนของ endogenous substance ในพลาสมา ดังนั้นจึงมีการปรับสัดส่วนโมบายเพสให้เหมาะสมอีกครั้ง เพื่อให้สามารถศึกษาผลการเตรียมตัวอย่างได้ สำหรับโมบายเพสที่ได้ คือ อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.50 (8: 92 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

วิธีวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมาด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติดที่ได้ได้รวบรวมและสรุป ดังรูปที่ 33

เมื่อเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมาที่ได้ในการศึกษานี้กับวิธีวิเคราะห์ที่มีรายงานมาก่อน พบว่า รายงานการวิเคราะห์ซึ่งใช้เมธานอลในการเตรียมตัวอย่างพลาสมา [44] เมื่อทดลองวิเคราะห์ในการศึกษานี้ ไม่สามารถทำได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้กรดไตรคลอโรอะซีติด ร่วมกับไดเอทิล อีเทอร์ [33] การใช้กรดเปอร์คลอริกร่วมกับไดคลอโรมีเทน [41] และการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง [42] ซึ่งล้วนแต่มีความยุ่งยาก และซับซ้อนกว่าวิธีวิเคราะห์ที่ได้ในการศึกษานี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 30 โครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในแบลงค์พลาสมา เมื่อใช้อะซีโตไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

1. โครมาโตแกรมของแบลงค์พลาสมา

2. โครมาโตแกรมของแวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน

10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ

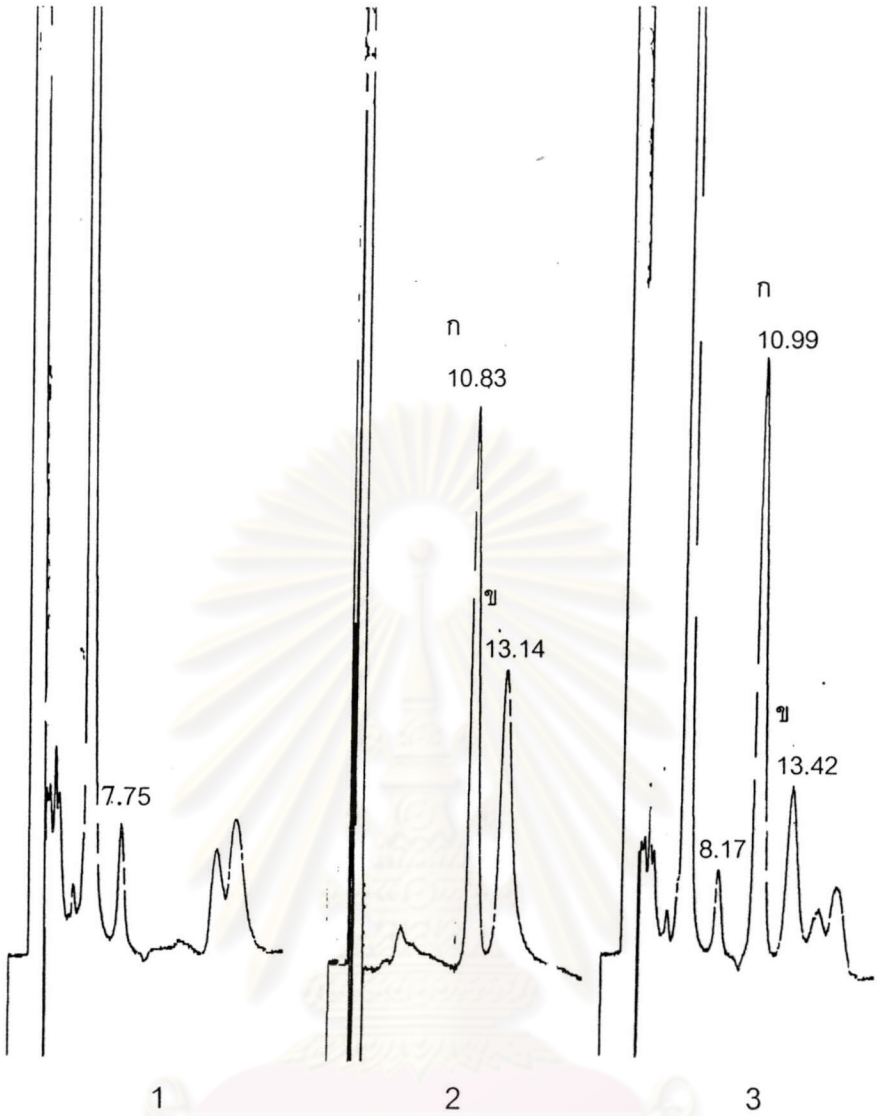
3. โครมาโตแกรมของแวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน

10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา

โดย (ก)เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน(สารมาตรฐานภายใน)(11.33นาที) (ข)แวนโคมัยซิน (13.92นาที)

โมบายเฟสที่ใช้ คือ อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.50

(8: 92 อัตราส่วนโดยปริมาตร)



รูปที่ 31 โครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในแบลงค์พลาสมา เมื่อใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

1. โครมาโตแกรมของแบลงค์พลาสมา

2. โครมาโตแกรมของแวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน

10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ

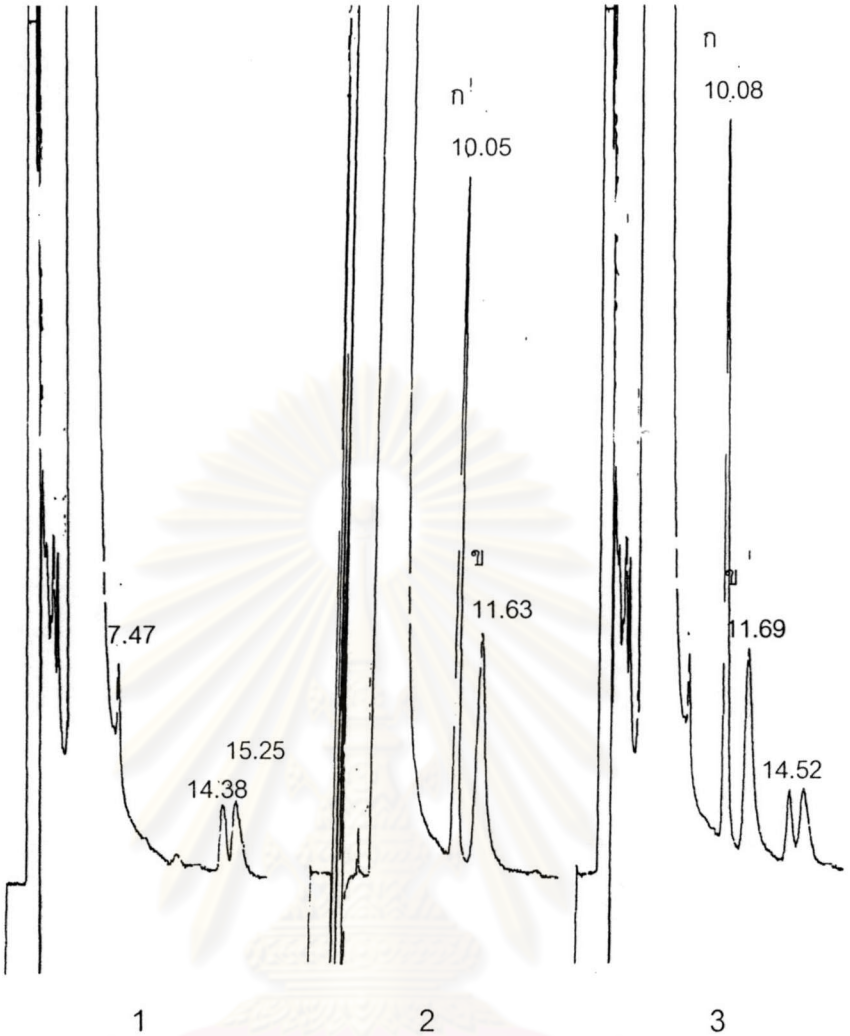
3. โครมาโตแกรมของแวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน

10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา

โดย (ก)เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน(สารมาตรฐานภายใน)(10.83นาที) (ข)แวนโคมัยซิน (13.14นาที)

โมบายเฟสที่ใช้ คือ อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.50

(8: 92 อัตราส่วนโดยปริมาตร)



รูปที่ 32 โครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในแบลงค์พลาสมาเมื่อใช้กรดไตรคลอโรอะซีติดเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

1. โครมาโตแกรมของแบลงค์พลาสมา

2. โครมาโตแกรมของแวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำ

3. โครมาโตแกรมของแวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา

โดย (ก)เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน(สารมาตรฐานภายใน)(10.05นาที)

(ข)แวนโคมัยซิน(11.63นาที)

โมบายเฟสที่ใช้ คือ อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.50

(8: 92 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

รูปที่ 33 วิธีวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมาด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติด

สภาวะทาง HPLC

คอลัมน์ ; HIQ Sil C-18 5µm, 150X 4.6 mm, i.d.

โมบายเพส; อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.50 (8:92 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

อัตราการไหล; 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

ความยาวคลื่น ; 225 นาโนเมตร

วิธีการเตรียมตัวอย่างพลาสมา

ผสมแบลงค์พลาสมา 100 ไมโครลิตร กับสารละลายแวนโคมัยซินในเมธานอล 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 10 ไมโครลิตร

↓

เติมสารละลายเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในเมธานอล 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 10 ไมโครลิตร

↓ผสมโดยการวอร์เทก

เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติด 10% (น้ำหนักโดยปริมาตร) 40ไมโครลิตร

↓ผสมโดยการวอร์เทก

หมุนเหวี่ยงตัวอย่างพลาสมาด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 15,000 X g ต่อนาที นาน 15 นาที

↓ผสมโดยการวอร์เทก

เติมสารละลายไดโปแตสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต 0.1 โมลาร์ 200 ไมโครลิตร

↓ผสมโดยการวอร์เทก

หมุนเหวี่ยงตัวอย่างพลาสมาด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็ว 15,000 X g ต่อนาที นาน 5 นาที

↓

นำสารละลายใสเหนือตะกอนมาฉีดเข้า HPLC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4.3 **การพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมาเมื่อแยกพลาสมาโปรตีน ด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติด** เมื่อได้วิธีวิเคราะห์ของแวนโคมัยซินในพลาสมาแล้ว จำเป็นต้องทำการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ก่อนนำไปกำหนดมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ ผลการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา มีดังนี้

1.4.3.1 **ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีคและความเข้มข้นของแวนโคมัยซินในพลาสมา** จากผลการทดลองหาความสัมพันธ์ดังกล่าวของแวนโคมัยซินในพลาสมา มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 34
สมการตัวแทนเส้นตรงของแวนโคมัยซินในพลาสมา คือ

$$Y = 0.05612X - 0.05374 \qquad R^2 = 0.9996$$

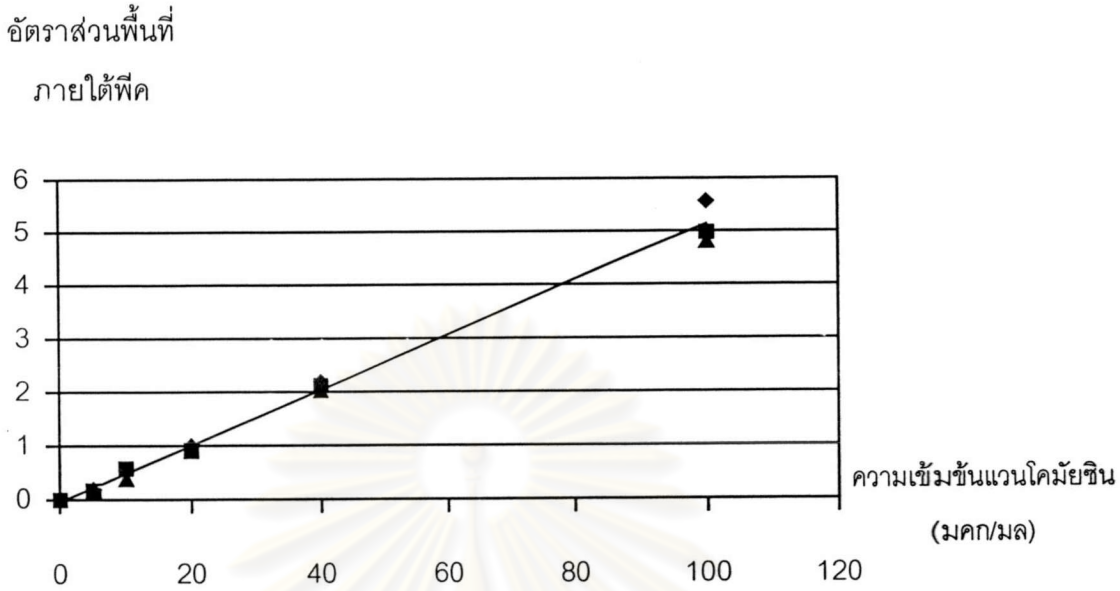
เมื่อ Y เป็นอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค และ X เป็นความเข้มข้นของแวนโคมัยซินในพลาสมา

นอกจากนี้ ค่า%RSD ของความชันของสมการความสัมพันธ์ดังกล่าวทั้ง 3 ชุดของแวนโคมัยซิน เท่ากับ 7.59% ซึ่งไม่เกิน 15% ดังแสดงในตารางที่ 58

จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า วิธีวิเคราะห์นี้สามารถวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งครอบคลุมช่วงความเข้มข้นในการนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วย

1.4.3.2 **ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา** ผลการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของแวนโคมัยซิน ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่าง มีค่า %bias อยู่ระหว่าง -6.35 ถึง -5.39 ซึ่งไม่เกิน ±15% ดังแสดงในตารางที่ 59 และสำหรับค่าเฉลี่ย %analytical recovery เท่ากับ 94.22±3.14% ดังแสดงในตารางที่ 60

จากค่า %bias และ %analytical recovery ที่ได้ไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด แสดงให้เห็นถึง วิธีวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมาที่ศึกษา เป็นวิธีวิเคราะห์ที่จัดว่าถูกต้องเพียงพอที่จะนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาได้



รูปที่ 34 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค และความเข้มข้นของแวนโคมัยซินในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติด

ตารางที่ 58 การยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค และความเข้มข้นของแวนโคมัยซินในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติด ในรูปร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความชันของสมการ (%RSD; n=3)

สมการที่	ความชัน	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
1	0.05612	0.05166	0.00392	7.59
2	0.05010			
3	0.04876			

ตารางที่ 59 ความถูกต้องในการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติด ในรูปร้อยละของความเบี่ยงเบนของวิธีวิเคราะห์ (%bias)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	%bias (n=5)					ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	
10.0	-7.30	-8.52	-5.34	-4.83	-5.78	-6.35
20.	-3.84	-8.70	0.13	-5.99	-9.56	-5.59
40.0	-8.95	-6.92	1.19	-4.46	-7.80	-5.39

ตารางที่ 60 เปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติด (%analytical recovery)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	% analytical recoveries (n=5)					ค่าเฉลี่ย	SD
	1	2	3	4	5		
10.0	92.70	91.48	94.66	95.17	94.22	93.65	1.52
20.0	96.16	91.30	100.1	94.01	90.44	94.41	3.92
40.0	91.05	93.08	101.2	95.54	92.20	94.61	4.03
ค่าเฉลี่ยรวม						94.22	3.14

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4.3.3 **ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา**

1.4.3.3.1 **ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน**

ผลการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของแวนโคมัยซินที่ความเข้มข้น 10, 20 และ40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่าง มีค่า %RSD อยู่ระหว่าง 1.62 ถึง 4.26 ดังแสดงในตารางที่ 61

1.4.3.3.2 **ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน** ผลการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของแวนโคมัยซิน ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน มีค่า %RSD อยู่ระหว่าง 3.48 ถึง 7.90 ดังแสดงในตารางที่ 62

จากผลการทดลองเพื่อหาความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน พบว่า ไม่มีการทดลองใดที่มีค่า %RSD เกิน 15% ดังนั้นการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หรือในวันอื่นๆ ได้

1.4.3.3.3 **ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ เมื่อใช้เครื่อง HPLC ต่างกัน** ผลการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของแวนโคมัยซิน ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย HPLC 2 เครื่อง พบว่า การวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา ด้วย HPLC เครื่องที่ 1 และ 2 มีค่า %RSD อยู่ระหว่าง 1.73 ถึง 5.64 และ 2.67 ถึง 8.40 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 63 นอกจากนี้การวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมาด้วยเครื่อง HPLC ทั้ง 2 มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.000)

จากผลการหาความเที่ยงตรงเมื่อใช้เครื่อง HPLC ต่างกัน พบว่า ไม่มีการทดลองในเครื่อง HPLC ใดที่มีค่า %RSD เกิน 15% และการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ทั้ง 2 มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมานี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ที่แตกต่างกันได้

ตารางที่ 61 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันในการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติด (n=5)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	ความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)					ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
	1	2	3	4	5			
10.0	9.27	9.15	9.47	9.52	9.422	9.36	0.15	1.62
20.0	19.23	18.26	20.03	18.80	18.09	18.88	0.78	4.15
40.0	36.42	37.23	40.48	38.22	36.88	37.85	1.61	4.26

ตารางที่ 62 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันในการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมาเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติด (n=5)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	ความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)					ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
	1	2	3	4	5			
10.0	9.64	9.47	9.50	10.22	9.38	9.64	0.33	3.48
20.0	19.12	20.03	19.35	18.14	18.97	19.12	0.68	3.57
40.0	37.76	40.47	43.59	35.43	38.18	39.09	3.09	7.90

ตารางที่ 63 ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ เมื่อใช้เครื่อง HPLC ต่างกันในการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติด (n=3)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	ความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)					
	HPLC 1			HPLC 2		
	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD	ค่าเฉลี่ย	SD	%RSD
10.0	9.29	0.16	1.73	11.11	0.30	2.67
20.0	19.17	0.88	4.61	21.56	0.96	4.44
40.0	38.04	2.14	5.64	38.62	3.24	8.40

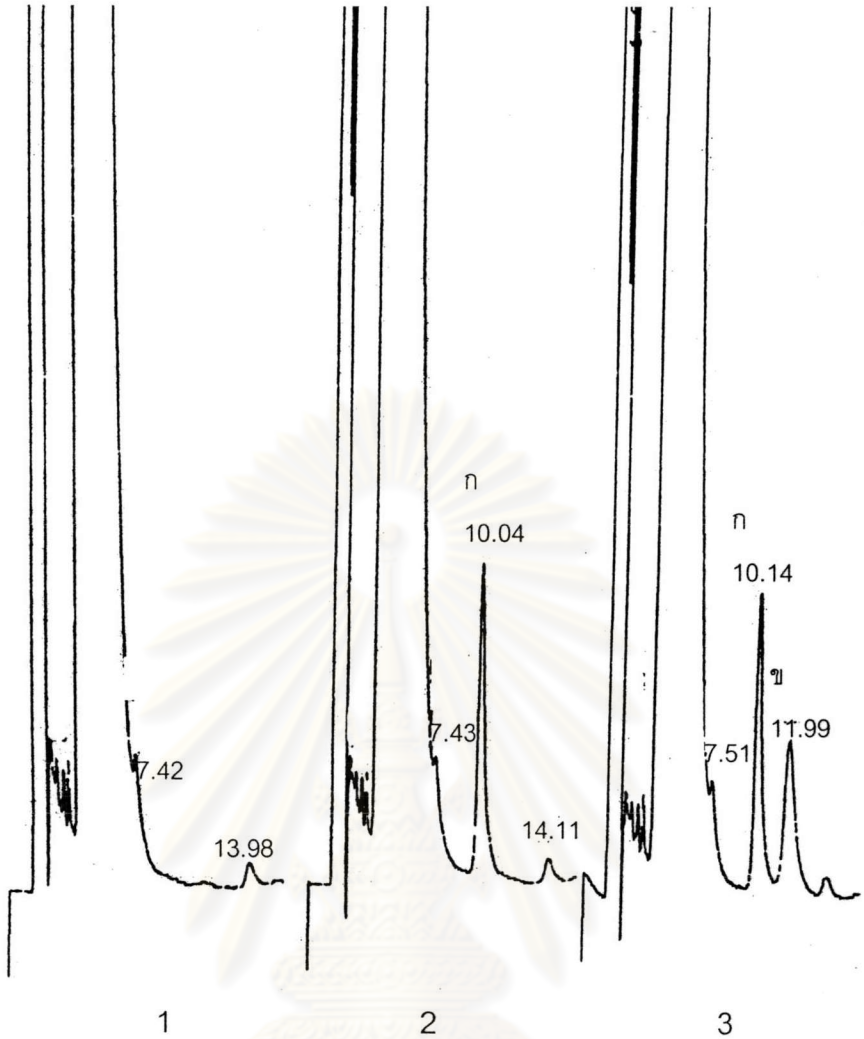
1.4.3.4 **ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา**

1.4.3.4.1 **ความจำเพาะเจาะจงของการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา** จากโครมาโตแกรม พบว่า พีคแวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน ในแบลงค์พลาสมา ไม่มีการรบกวนจาก endogenous substance ในพลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 35

1.4.3.4.2 **ความจำเพาะเจาะจงของแวนโคมัยซิน กับยาต่าง ๆที่อาจมีการใช้ก่อน หรือใช้ร่วมด้วย** จากผลการทดลอง พบว่า เวลาที่ยาต่างๆถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ไม่ตรงกับแวนโคมัยซิน ในสภาวะทาง HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมาดังแสดงในตารางที่ 64

นั่นคือวิธีวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมานี้ มีความจำเพาะเจาะจง ไม่มีการรบกวนจากสารใดในพลาสมา รวมทั้งยาที่อาจมีการใช้ก่อน และยาที่ถูกใช้ร่วมด้วย ดังนั้นสามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 35 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติด

1. แบลงค์พลาสมา

2. เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา

3. แวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในแบลงค์พลาสมา

โดย (ก)เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน(สารมาตรฐานภายใน)(10.14นาที)

(ข)แวนโคมัยซิน(11.99นาที)

โมบายเฟสที่ใช้ คือ อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.50

(8: 92 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

ตารางที่ 64 ความจำเพาะเจาะจงของแวนโคมัยซิน ร่วมกับยาอื่นๆที่คาดว่ามีการใช้ก่อน หรือใช้ร่วมด้วย

ยา และสาร	เวลาที่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ (นาที)
Vancomycin	10.97
Beta-hydroxyethyltheophylline	9.38
Penicillin G sodium	>30
Ampicillin sodium	6.56
Cefazolin sodium	6.97
Ceftriaxone sodium	8.58
Cefuroxime axetile	>30
Cefotaxime sodium	19.90
Cefoperazone sodium	>30
Cefaclor	7.81
Cloxacillin sodium	>30
Rifampicin	>30
Aminoglycosides	-[1]

หมายเหตุ 1. aminoglycosides ไม่มี chromophore จึงไม่พบเมื่อตรวจวัดด้วย uv- detector

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4.3.5. **ความคงตัวของแวนโคมัยซินในพลาสมา**

1.4.3.5.1 **ที่อุณหภูมิห้อง** (25±2°C) จากผลการทดลอง ค่า %difference ของแวนโคมัยซินในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 10 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้ง 3 ตัวอย่าง ในชั่วโมงที่ 6 มีค่าอยู่ระหว่าง -12.53 ถึง –1.38 ซึ่งมีค่าเกิน ±10% และเมื่อดูค่าดังกล่าว ในชั่วโมงที่ 4 พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง –7.82 ถึง +3.11 ซึ่งไม่เกิน ±10 % ดังแสดงในตารางที่ 65

ดังนั้นแวนโคมัยซินในพลาสมา สามารถคงตัวเพียง 4 ชั่วโมง เมื่อทิ้งไว้ ณ ห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิห้อง

1.4.3.5.2 **ที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง** (-18±3°C) ค่า %difference ของแวนโคมัยซินในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 10 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อถึงวันที่ 7 มีค่าอยู่ระหว่าง –13.88 ถึง +7.33 ซึ่งมีค่าเกิน ±10% และเมื่อดูค่าดังกล่าว ในวันที่ 5 พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง –8.45 ถึง +3.54 ซึ่งไม่เกิน ±10 % ดังแสดงในตารางที่ 66

ดังนั้นแวนโคมัยซินในพลาสมา สามารถคงตัวเพียง 5 วัน เมื่อเก็บไว้ในช่องแช่แข็ง

1.4.3.5.3 **ที่** freeze-thaw cycle ค่า % difference ของแวนโคมัยซินในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 10 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อครบ 3 รอบ มีค่าอยู่ระหว่าง -6.54 ถึง -0.34 ซึ่งไม่เกิน ±10% ดังแสดงในตารางที่ 67

ดังนั้นแวนโคมัยซินในพลาสมา สามารถคงตัวเมื่อนำเข้าและออกจากช่องแช่แข็ง 3 รอบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4.3.6 **ความคงตัวของแวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิล ธีโอฟิลลีนในสารละลายมาตรฐาน**

1.4.3.6.1 **ความคงตัวของแวนโคมัยซินในสารละลายมาตรฐาน** ค่าเฉลี่ย %response ของสารละลายมาตรฐานเทียบกับที่เตรียมใหม่ของแวนโคมัยซินในเมธานอล ที่ 100 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อครบ 90 วัน มีค่าอยู่ที่ 96.05% และ 96.45% ตามลำดับ ไม่มีค่าใดเกินเกณฑ์ที่กำหนด ส่วนที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เมื่อถึงวันที่ 50 วัน มีค่าอยู่ที่ 116.5% ค่าเกินเกณฑ์ที่กำหนด และเมื่อดูค่าดังกล่าวในวันที่ 40 มีค่าอยู่ที่ 101.0% ค่าไม่เกินเกณฑ์ที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 68

ดังนั้นสารละลายมาตรฐานแวนโคมัยซินในเมธานอล ที่ใช้ในการวิเคราะห์สามารถคงตัวถึง 90 วัน ส่วนที่ใช้เป็นสต็อกสามารถคงตัวเพียง 40 วัน เมื่อเก็บในช่องแช่แข็ง

1.4.3.6.2 **ความคงตัวของเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในสารละลายมาตรฐาน** เนื่องจากเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน ได้ใช้เป็นสารมาตรฐานภายในของการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนเช่นเดียวกัน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงพิจารณาความคงตัวของเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน ในตารางที่ 30 ซึ่งได้แสดงในการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน

จากผลการทดลอง ค่าเฉลี่ย %response ของสารละลายมาตรฐานเทียบกับที่เตรียมใหม่ของเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในเมธานอล ที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อครบ 90 วัน มีค่าอยู่ที่ 123.3% และ 113.2% ตามลำดับ ค่าทั้ง 2 เกณฑ์ที่กำหนด และเมื่อดูค่าดังกล่าวในวันที่ 60 มีค่าอยู่ที่ 102.0% และ 100.0% ไม่มีค่าเกินเกณฑ์ที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 30

ดังนั้นสารละลายมาตรฐานเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในเมธานอล ทั้งที่ใช้ในการวิเคราะห์ และใช้เป็นสต็อกสามารถคงตัวเพียง 60 วัน เมื่อเก็บในช่องแช่แข็ง

จากผลการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา โดยใช้การเตรียมตัวอย่างพลาสมาด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติด ปรากฏว่า วิธีวิเคราะห์นี้ผ่านการประเมินในทุกหัวข้อ ทำให้สามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้มาใช้การติดตามระดับแวนโคมัยซินในพลาสมาของผู้ป่วยได้ แต่เนื่องจากวิธีวิเคราะห์ที่ได้ใช้ปริมาตรพลาสมา และสารแยกพลาสมาที่น้อยมาก อีกทั้งยังมีการปรับ pH ของสารละลายก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC ซึ่งอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ได้ ถ้าไม่มีระมัดระวังในการวิเคราะห์

ผลการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในทุกหัวข้อของแวนโคมัยซินในพลาสมา ได้รวบรวมและสรุป ดังแสดงในตารางที่ 69

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 65 ความคงตัวของแวนโคมัยซินในพลาสมา ที่อุณหภูมิห้อง (25±2°C) ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างของความเข้มข้นของยา (%difference)

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			ความเข้มข้น 40.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	-9.36	+1.10	+7.24	+1.03	+1.65	+1.42
4	-7.82	+3.11	-3.57	+1.55	+1.42	-5.69
6	-12.53	-8.63	-10.09	-6.75	-4.50	-1.38
8	-20.75	-19.54	-16.63	+1.46	+3.08	+3.23

ตารางที่ 66 ความคงตัวของแวนโคมัยซินในพลาสมา ที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง (-18±3°C) ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างของความเข้มข้นของยา (%difference)

ระยะเวลา (วัน)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			ความเข้มข้น 40.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	-9.24	-4.13	2.17	+5.53	-3.72	-4.87
5	-8.45	-1.54	-1.15	+3.54	-6.10	+0.09
7	-13.88	-10.96	-9.62	-7.33	-9.92	-7.35
14	-14.14	-11.48	-10.50	+0.82	-11.87	-7.24
30	-15.34	-12.72	-9.67	-2.51	-16.40	-16.16

ตารางที่ 67 ความคงตัวของแวนโคมัยซินในพลาสมา ที่ freeze-thaw cycle ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างของความเข้มข้นของยา (difference)

ระยะเวลา (รอบ)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร			ความเข้มข้น 40.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	-10.52	-6.33	-5.83	-2.43	-3.97	-2.37
2	-7.37	-1.40	+0.38	-1.17	-0.51	-5.51
3	-6.54	-1.24	-0.34	-4.82	-6.43	-1.27

ตารางที่ 68 ความคงตัวของสารละลายแวนโคมัยซินในเมธานอล ที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง (-18±3°C) ในรูปค่า %response ของสารละลายมาตรฐานเทียบกับที่เตรียมใหม่

ระยะเวลา (วัน)	%response (n=3)					
	ความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์				ความเข้มข้นที่ใช้เป็นสต็อก	
	100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร		1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD
0	100.0	0.00	100.0	0.00	100.0	0.00
7	100.9	4.03	104.2	2.17	100.8	1.11
14	101.5	4.09	98.46	1.29	99.43	2.70
21	99.81	3.62	99.14	2.00	99.76	2.01
30	103.8	2.68	95.82	3.14	104.0	2.67
40	97.15	3.67	94.68	1.72	101.0	2.71
50	92.61	0.57	93.38	1.98	116.5	8.77
60	101.1	3.64	98.85	4.20	118.3	3.71
90	96.05	1.66	96.45	0.55	126.3	10.76

ตารางที่ 69 สรุปการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมาเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติด

หัวข้อของการ validate	ผลการทดลอง
1.Linearity	
Equation	$Y = 0.05612X - 0.05374$ ($R^2 = 0.9996$)
%RSD of slope	7.59
2.Accuracy	
%bias	-6.35 to –5.39
%analytical recovery $\bar{X}$(SD)	94.22(3.14)
3.Precision	
intra-day precision %RSD	1.62 to 4.26
inter-day precision %RSD	3.48 to 7.90
reproducibility	
HPLC1 %RSD	1.73 to 5.64
HPLC2 %RSD	2.67 to 8.40
Correlation test	p=0.000
4.Specificity and Selectivity	pass
5.Stability	
in plasma	
at room temperature (hours)	4
at storage temperature (days)	5
freeze thaw cycle (cycles)	3
in standard solution	
vancomycin	
working solution (days)	90
stock solution (days)	40
beta-hydroxyethyltheophylline	
working solution (days)	60
stock solution (days)	60

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4.4 การหาระยะเวลาการใช้กราฟเทียบมาตรฐานในการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา

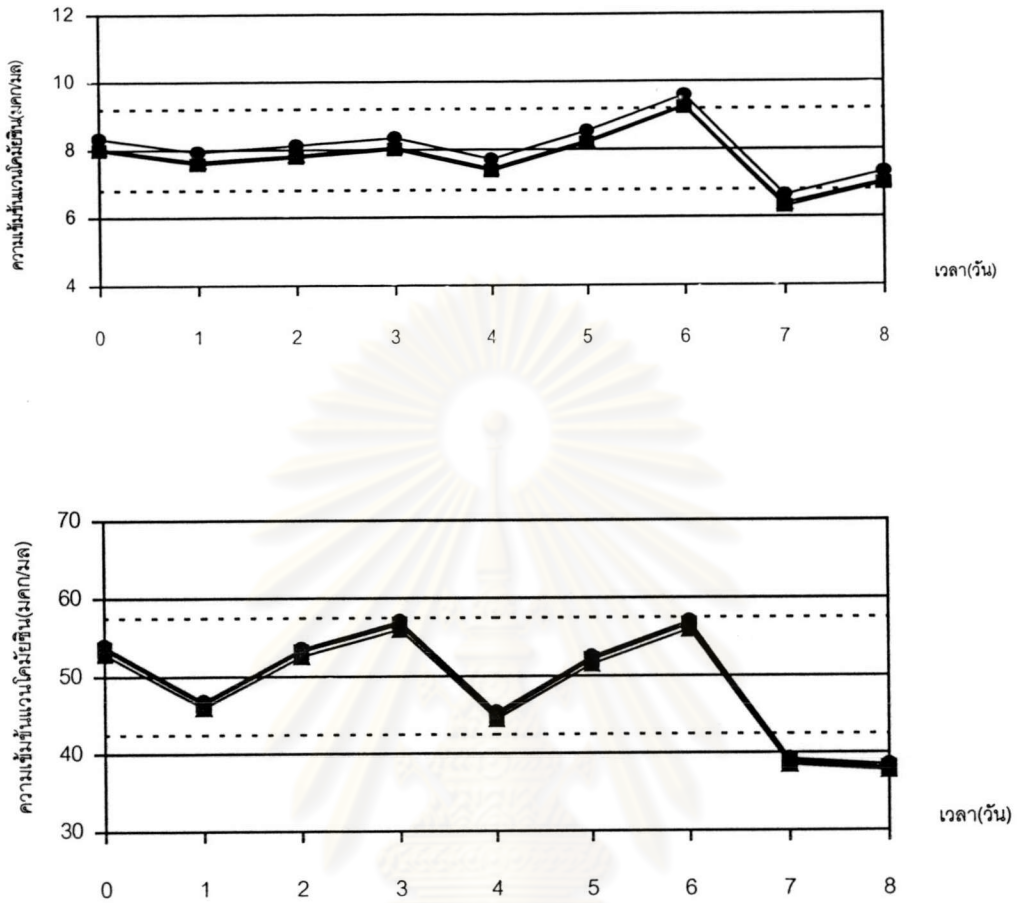
จากผลการทดลองได้สร้างกราฟเทียบมาตรฐานของการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา 3 เส้น ได้สมการของกราฟเทียบมาตรฐานดังนี้

1. $Y = 0.03965X - 0.05222$ $R^2 = 0.9984$
2. $Y = 0.04024X - 0.05958$ $R^2 = 0.9989$
3. $Y = 0.03961X - 0.06576$ $R^2 = 0.9932$

เมื่อ Y เป็นอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค และ X เป็นความเข้มข้นของแวนโคมัยซินในพลาสมา

เมื่อวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของแวนโคมัยซินในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 8 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยกราฟเทียบมาตรฐานที่สร้างขึ้นข้างต้น ทุกๆวัน จนถึงในวันที่ 6 พบว่า ค่าความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ด้วยกราฟเทียบมาตรฐานทั้ง 3 เส้น ที่ความเข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า %bias เกิน ±15% และเมื่อทำการทดลองต่อในวันที่ 7 ค่าความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ ทั้งที่ความเข้มข้น 8 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า %bias เกินกำหนดอีกครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 36

จากผลการศึกษาระยะเวลาการใช้กราฟเทียบมาตรฐาน จะเห็นได้ว่ากราฟเทียบมาตรฐานของการวิเคราะห์แวนโคมัยซินที่เตรียมขึ้น สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาในวันอื่นๆได้ โดยใช้แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของแวนโคมัยซินเป็นตัวตรวจสอบประสิทธิภาพของกราฟเทียบมาตรฐานในแต่ละวันที่มีการวิเคราะห์ และกราฟเทียบมาตรฐานของแวนโคมัยซินที่เตรียมขึ้นในแต่ละครั้ง สามารถนำไปใช้วิเคราะห์เฟนิโทอินในตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยได้เพียง 5 วันเท่านั้น



รูปที่ 36 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแวนโคมัยซินจากการวิเคราะห์กับเวลา เมื่อวิเคราะห์ด้วยกราฟเทียบมาตรฐาน 3 เส้น โดยในรูปบน และล่าง เป็นการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในแบลงค์พลาสมา ที่ 8 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในแต่ละกราฟนี้ มีเส้นปะ(- - - - -) แสดงถึงช่วงความเข้มข้น 6.80 ถึง 9.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 42.50 ถึง 57.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นของแวนโคมัยซินจากการวิเคราะห์ที่มีค่า % bias ไม่เกิน ±15%

2. **การจัดทำมาตรฐานวิธีการปฏิบัติในการวิเคราะห์ยา และแคฟเฟอีนในตัวอย่างพลาสมา** เมื่อได้วิธีวิเคราะห์ของยาแต่ละตัว และแคฟเฟอีนในพลาสมาแล้ว จึงจัดทำมาตรฐานวิธีการปฏิบัติในการวิเคราะห์ยา และแคฟเฟอีนในพลาสมาด้วยเทคนิค HPLC

มาตรฐานวิธีการปฏิบัติสำหรับกระบวนการวิเคราะห์ระดับธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน เฟนิโทอิน ฟีโนบาร์บิทอล และแวนโคมัยซินในพลาสมา ที่ผ่านการประเมินมีดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มาตรฐานวิธีการปฏิบัติสำหรับกระบวนการวิเคราะห์ เพื่อควบคุมและติดตามระดับธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน เฟนิโทอิน ฟีโนบาร์บิทอล และแวนโคมัยซินในพลาสมา ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี

ประกอบด้วย

SOP No. 1 การเตรียมความพร้อม HPLC

SOP No. 2 การสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน

SOP No. 3 การรับ แบ่งบรรจุ และเก็บรักษาตัวอย่างพลาสมา

SOP No. 4 การเตรียมตัวอย่างพลาสมา

SOP No. 5 การวิเคราะห์ด้วย HPLC

SOP No. 6 การหาปริมาณยา หรือแคฟเฟอีนในตัวอย่างพลาสมา

SOP No. 7 การเก็บรักษา HPLC

เอกสารประกอบ 1 ตารางประวัติการใช้ HPLC

เอกสารประกอบ 2 ตารางประวัติประสิทธิภาพคอลัมน์

เอกสารประกอบ 3 ตารางผลการเตรียมโมบายเฟส

เอกสารประกอบ 4 ตารางผลการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน

เอกสารประกอบ 5 ตารางผลการตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน

เอกสารประกอบ 6 ใบรับ และแจ้งผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา

เอกสารประกอบ 7 ตารางผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา

เอกสารประกอบ 8 ตารางผลการเตรียมสารละลาย

เอกสารประกอบ 9 การตรวจสอบความผิดปกติ และแนวทางแก้ไขปัญหา HPLC เบื้องต้น

เอกสารประกอบ 10 การหาประสิทธิภาพคอลัมน์

เอกสารประกอบ 11 คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

เอกสารประกอบ 12 การเตรียมสารละลายต่างๆในการวิเคราะห์

เอกสารประกอบ 13 ลำดับกระบวนการวิเคราะห์ด้วย HPLC ในแต่ละวัน

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มาตรฐานวิธีการปฏิบัติ

SOP No. 1

เรื่อง

การเตรียมความพร้อม HPLC

สารบัญ

	หน้า
1. วัตถุประสงค์	1
2. ขอบเขตของงาน	1
3. หน่วยงานที่รับผิดชอบ	1
4. คำอธิบายศัพท์	1
5. แผนภูมิการทำงาน	3
6. รายละเอียดของขั้นตอนการทำงาน	4
7. เอกสารประกอบ	8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเตรียมความพร้อม HPLC**	SOP No. 1 วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../..... หน้า 1 ของ 8 หน้า

1. วัตถุประสงค์

เพื่อเป็นวิธีปฏิบัติในการเตรียม HPLC ให้พร้อมกับการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาในแต่ละวัน

2. ขอบเขตของงาน

วิธีปฏิบัตินี้ใช้ในการต่อคอลัมน์กับ HPLC การเปิดทุกๆส่วนของ HPLC ตลอดจนการปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสมดุล เพื่อให้ HPLC พร้อมในการวิเคราะห์

3. หน่วยงานที่รับผิดชอบ

หน่วยงานที่รับผิดชอบงานด้านการควบคุม และติดตามระดับยาในสถานพยาบาล

4. คำอธิบายศัพท์

- *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* เทคนิคใช้แยกสารและตรวจวัดปริมาณสาร โดยเมื่อฉีดสารเข้า HPLC สารถูกแยกโดยหลักการแยกสารทาง chromatography ซึ่งใช้คอลัมน์ที่มีขนาดอนุภาคภายในเล็กทำหน้าที่เป็นสารหน่วงเหนี่ยวการผ่านของสารตัวอย่าง มีโมบายเฟสเป็นตัวพา และชะสารให้เคลื่อนที่ผ่านไปด้วยความดันสูงจาก pump และหลังจากสารต่างๆถูกแยกออกจากกันแล้วสารจะถูกวัดปริมาณด้วย detector
- *โมบายเฟส* ส่วนผสมของสารละลายใช้เป็นตัวพา และชะสารให้ออกจากคอลัมน์
- *โครมาโตแกรม* บันทึกที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มีลักษณะเป็นกราฟความสัมพันธ์ของสัญญาณตอบรับ (response signal) กับเวลา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเตรียมความพร้อม HPLC**	SOP No. 1
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 2 ของ 8 หน้า

- *HPLC column* คอลัมน์ที่ใช้แยกสาร มีลักษณะเป็นแท่งยาว ขนาด 15 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร มักทำด้วย stainless steel ภายในประกอบด้วยสารอนุภาคเล็กๆ ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 5 ไมโครเมตร ซึ่งอนุภาคเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นสารหน่วงเหนี่ยวการผ่านของสารตัวอย่าง ทำให้เกิดการแยกของสารเกิดขึ้น
- *Guard column* คอลัมน์ขนาด 0.5 เซนติเมตร ภายในบรรจุด้วยสารอนุภาคเล็ก และชนิดเช่นเดียวกับ HPLC column ทำหน้าที่ปกป้องคอลัมน์ จากสิ่งที่อาจมีในตัวอย่างที่วิเคราะห์ และมีผลเสียต่อคอลัมน์
- *Ferrule* อุปกรณ์ที่ใช้เชื่อมระหว่างคอลัมน์ กับส่วนต่างๆของ HPLC
- *Pump* อุปกรณ์เพิ่มแรงดัน เพื่อให้เกิดการไหลของโมบายเฟสผ่านคอลัมน์ตามอัตราการไหลที่กำหนด
- *อัตราการไหล(flow rate)* ค่าแสดงอัตราการไหลของโมบายเฟสเข้าระบบของ HPLC มีหน่วยเป็น มิลลิลิตรต่อนาที
- *UV-detector* เครื่องตรวจวัดปริมาณสาร โดยอาศัยหลักการ spectroscopy
- *ความยาวคลื่น* ค่าที่กำหนดใน UV-detector เป็นช่วงคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงของสารที่วิเคราะห์ มีหน่วยเป็น นาโนเมตร
- *Lamp* หลอดไฟของ uv-detector โดยทั่วไปมีอายุประมาณ 1,000-2,000 ชั่วโมง
- *Autoinjector* อุปกรณ์ที่ใช้ในการฉีดสารเข้า HPLC โดยอัตโนมัติ
- *Manual injector* อุปกรณ์ที่รองรับใช้ในการฉีดสารเข้า HPLC ด้วยการฉีดผ่าน syringe
- *Data station* อุปกรณ์คอมพิวเตอร์ เป็นจุดรวมข้อมูลการวิเคราะห์และคำสั่งต่างๆ ซึ่งถูกควบคุมผ่านโปรแกรมคอมพิวเตอร์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเตรียมความพร้อม HPLC**	SOP No. 1
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 3 ของ 8 หน้า

- *Integrator* อุปกรณ์แปลสัญญาณของการวิเคราะห์ ในรูปโครมาโตแกรม และค่าต่างๆเช่น พื้นที่ภายใต้พีค เป็นต้น และบันทึกออกมาขณะวิเคราะห์
- ***พื้นที่ภายใต้พีค*** พื้นที่ภายใต้โครมาโตแกรมที่ได้จากการแปลสัญญาณตอบรับของ HPLC

5. แผนภูมิทำงาน

ต่อคอลัมน์เข้ากับ HPLC

↓

เปิด pump

↓

ตรวจสอบการรั่วตามรอยต่อ หลังจากต่อคอลัมน์

↓

เปิดทุกๆส่วนของ HPLC

↓

ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลพร้อมใช้งาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเตรียมความพร้อม HPLC**	SOP No. 1
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 4 ของ 8 หน้า

6. รายละเอียดของขั้นตอนการทำงาน

6.1 ต่อคอลัมน์เข้ากับ HPLC

- ต่อ guard column โดยให้ลูกศรบนคอลัมน์ชี้ไปในทางที่โมบายเฟสไหลเข้าระบบ โดยปลายหนึ่งต่อกับท่อ stainless ที่มาจาก pump และปลายอีกด้านต่อกับท่อที่ต่อกับ HPLC column โดย HPLC column ให้อยู่ในแนวที่ลูกศรชี้ไปในทิศทางการไหลของโมบายเฟส ส่วนปลายอีกด้านของ HPLC column ต่อกับท่อ stainless ที่เชื่อมกับ UV-detector โดยใช้ ferrule[1-2] เป็นตัวต่อเชื่อมแต่ละจุดที่กล่าวมาข้างต้น

6.2 เปิด pump

- ลงบันทึกการใช้ HPLC ในตารางประวัติการใช้ HPLC (เอกสารประกอบ 1)
- เปิด stabilizer หรือ เสียบปลั๊กของ HPLC
- กดปุ่ม power ของ pump[3] และรอจนกว่าเครื่องพร้อมทำงาน

หมายเหตุ

1. ferrule มี 2 ชนิด คือชนิดที่เป็นพลาสติก และ stainless ถ้าใช้ ferrule ชนิด stainless ต้องใช้ประแจช่วยในการหมุน ferrule
2. การต่อ ferrule เข้ากับคอลัมน์ ต้องหมุนเกลียวของ ferrule และคอลัมน์ให้ตรงกันและอยู่ในแนวเดียวกัน จึงทำให้ไม่รั่วตามรอยต่อระหว่าง ferrule และคอลัมน์
3. ถ้าเกิดปัญหา ให้ตรวจสอบความผิดปกติ และแก้ไข HPLC เบื้องต้น(เอกสารประกอบ 9)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเตรียมความพร้อม HPLC**	SOP No. 1
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 5 ของ 8 หน้า

6.3 ตรวจสอบการรั่วตามรอยต่อ หลังจากต่อคอลัมน์

- ค่อยๆเพิ่มอัตราการไหลทีละ 0.1-0.2 มิลลิลิตรต่อนาที จนถึง 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที[3] (วิธีปรับ แล้วแต่เครื่อง HPLC)
- ถ้าต่อคอลัมน์ไม่ดี อาจทำให้เกิดการรั่วซึมของเมธานอลที่รอยต่อ และหากมีการรั่วซึม ให้ลดอัตราการไหลทีละ 0.1-0.2 มิลลิลิตรต่อนาทีจนเป็น 0 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นถอดคอลัมน์ บริเวณที่รั่วออกแล้วต่อใหม่

6.4 เปิดทุกๆส่วนของ HPLC

- กดปุ่ม power ของ HPLC ในทุกๆ ส่วนที่ใช้งาน
- ถ้ามีโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เป็นตัวควบคุมการทำงาน การเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ต้องสั่งงานผ่านโปรแกรมเท่านั้น ซึ่งขึ้นกับคำสั่งของแต่ละโปรแกรม

6.4.1 UV–detector[3]

- หลังจากกดปุ่ม power ของ UV–detector และรอจนพร้อมทำงาน

6.4.2 autoinjector[3] (ถ้าต้องการฉีดสารตัวอย่างด้วย autoinjector)

- หลังจากกดปุ่ม power ของ autoinjector และรอจนพร้อมทำงาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเตรียมความพร้อม HPLC**	SOP No. 1
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 6 ของ 8 หน้า

6.4.3 data station หรือ integrator

6.4.3.1 data station

- ให้เปิด software ในโปรแกรมคอมพิวเตอร์
- กำหนดค่าต่างๆใน software ไม่ว่าการแปลสัญญาณตอบรับในรูปพื้นที่ภายใต้พีค การบันทึก และการพิมพ์โครมาโตแกรม (วิธีปรับ แล้วแต่เครื่อง HPLC)

6.4.3.2 integrator[3]

- หลังจากกดปุ่ม power ของ integrator และรอจนพร้อมทำงาน
- กำหนดค่าต่างๆ ไม่ว่าการแปลสัญญาณตอบรับในรูปพื้นที่ภายใต้พีค การบันทึก และการพิมพ์โครมาโตแกรม (วิธีปรับ แล้วแต่เครื่อง HPLC)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเตรียมความพร้อม HPLC**	SOP No. 1
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 7 ของ 8 หน้า

6.5 ปรับคอลัมน์ให้อยู่ในสภาพสมดุลพร้อมใช้งาน

- ปรับสมดุลของคอลัมน์ด้วยเมธานอล[4] ประมาณ 10-15 นาที หรือจนกว่าสัญญาณนิ่ง[3]
- ค่อยๆลดอัตราการไหลทีละ 0.1-0.2 มิลลิลิตรต่อนาที จนเป็น 0 มิลลิลิตรต่อนาที
- เปลี่ยนเมธานอลเป็นน้ำ[4-6]
- ไล่ฟองอากาศออกจนหมดจาก pump
- ค่อยๆเพิ่มอัตราการไหลทีละ 0.1-0.2 มิลลิลิตรต่อนาที จนเป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- ปรับสมดุลของคอลัมน์ด้วยน้ำประมาณ 15-20 นาที หรือจนกว่าสัญญาณนิ่ง[3]

หมายเหตุ

4. ห้ามใช้สารละลายที่ไม่ใสเป็นโมบายเฟส เป็นอันขาด

5. ก่อนนำน้ำ และโมบายเฟสมาใช้ ให้กรองด้วย nylon membrane filter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรู 0.45 ไมโครเมตร และไล่ฟองอากาศด้วยการ sonicate ประมาณ 20 นาที

6. น้ำที่ใช้กับ HPLC ควรเป็นน้ำที่ deionized นำมาผ่านการกรองด้วย nylon membrane filter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรู 0.45 ไมโครเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเตรียมความพร้อม HPLC**	SOP No. 1
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 8 ของ 8 หน้า

- ลงบันทึกชนิดของโมบายเฟสที่ใช้ และความดันของเครื่อง

ในตารางประวัติการใช้ HPLC (เอกสารประกอบ 1)

- เมื่อทุกส่วนของ HPLC อยู่ในสภาพพร้อมทำงาน จึงเริ่มทำการวิเคราะห์

ตัวอย่างพลาสมา โดยเปลี่ยนน้ำเป็นโมบายเฟส[4-5,7]และปรับสมดุลคอลัมน์ด้วยโมบายเฟส

จนสัญญาณนิ่ง

- ถ้ายังไม่มีตัวอย่างพลาสมาเพื่อวิเคราะห์ อาจสามารถปิดทุกส่วนของ HPLC จนกว่า

จะวิเคราะห์

หมายเหตุ

7. การเตรียมบัฟเฟอร์ และโมบายเฟส อยู่ในการเตรียมสารละลายต่างๆ ใน การวิเคราะห์ (เอกสารประกอบ 12) และลงบันทึกการเตรียมในตารางผลการเตรียม โมบายเฟส (เอกสารประกอบ 3)

7. เอกสารประกอบ

เอกสารประกอบ 1 ตารางประวัติการใช้ HPLC

เอกสารประกอบ 3 ตารางผลการเตรียมโมบายเฟส

เอกสารประกอบ 9 การตรวจสอบความผิดปกติ และแนวทางแก้ไขปัญหา HPLC เบื้องต้น

เอกสารประกอบ 12 การเตรียมสารละลายต่างๆในการวิเคราะห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มาตรฐานวิธีการปฏิบัติ

SOP No. 2

เรื่อง

การสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน

สารบัญ

	หน้า
1. วัตถุประสงค์	1
2. ขอบเขตของงาน	1
3. หน่วยงานที่รับผิดชอบ	1
4. คำอธิบายศัพท์	1
5. แผนภูมิการทำงาน	2
6. รายละเอียดของขั้นตอนการทำงาน	2
7.เอกสารประกอบ	11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน**	SOP No. 2
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 1 ของ 11 หน้า

1. วัตถุประสงค์

เพื่อเป็นวิธีปฏิบัติในการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน เพื่อใช้หาปริมาณธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน เฟนิโทอิน ฟีโนบาร์บิทอล และแวนโคมัยซินในตัวอย่างพลาสมา

2. ขอบเขตของงาน

วิธีปฏิบัตินี้ใช้ในการสร้างกราฟเทียบมาตรฐานของธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน เฟนิโทอิน ฟีโนบาร์บิทอล และแวนโคมัยซินในพลาสมา

3. หน่วยงานที่รับผิดชอบ

หน่วยงานที่รับผิดชอบงานด้านการควบคุม และติดตามระดับยาในสถานพยาบาล

4. คำอธิบายศัพท์

- *กราฟเทียบมาตรฐาน* ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค กับความเข้มข้นของสาร แสดงในรูปสมการ
- *สารมาตรฐานภายใน* สารที่เติมลงไปในพลาสมาที่วิเคราะห์ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพลาสมา เพื่อช่วยลดความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากการวิเคราะห์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน**	SOP No. 2
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 2 ของ 11 หน้า

5. แผนภูมิทำงาน

เตรียมแบลงค์พลาสมา และพลาสมาที่ใช้สร้างกราฟเทียบมาตรฐาน

↓

การแยกพลาสมาโปรตีนของแบลงค์พลาสมา และพลาสมาที่ใช้สร้างกราฟเทียบมาตรฐาน

↓

วิเคราะห์แบลงค์พลาสมา และพลาสมาที่ใช้สร้างกราฟเทียบมาตรฐานด้วย HPLC

↓

สร้างกราฟเทียบมาตรฐานของยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา

6. รายละเอียดของขั้นตอนการทำงาน

6.1 เตรียมแบลงค์พลาสมา และพลาสมาที่ใช้สร้างกราฟเทียบมาตรฐาน

6.1.1 เตรียมแบลงค์พลาสมา[1]

- เติมพลาสมาที่ไม่มีตัวยา หรือแคฟเฟอีนที่ต้องการวิเคราะห์ 100 ไมโครลิตร ใส่ microcentrifuge tube 1 หลอด
- เติมเมธานอล 10 ไมโครลิตร และผสมโดยการวอร์เทก[2]

หมายเหตุ

1. แบลงค์พลาสมา คือ พลาสมาที่นำมาใช้ในการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน ซึ่งต้องไม่มีสารที่ต้องการสร้างกราฟเทียบมาตรฐานอยู่
2. ถ้ามีปัญหาการใช้อุปกรณ์ หรือเครื่องมือใดๆ ให้อ่านคำแนะนำในการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ (เอกสารประกอบ 11)

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน**	SOP No.2
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 3 ของ 11 หน้า

6.1.2 เตรียมพลาสมาที่ใช้สร้างกราฟเทียบมาตรฐาน[3]

- เติมพลาสมาที่ไม่มีตัวยา หรือแคฟเฟอีนที่ต้องการวิเคราะห์ 100 ไมโครลิตร ใส่ microcentrifuge tube 6 หลอด
- เติมสารละลายมาตรฐานของยา หรือแคฟเฟอีนในเมธานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ 10 ไมโครลิตร ในแต่ละหลอด ตามตารางข้างล่าง และผสมโดยการวอร์เทก[2]

ยา หรือ สาร	ความเข้มข้นสารละลาย ใน เมธานอล[4](มคก/มล)	ความเข้มข้นในพลาสมา (มคก/มล)
Theophylline	0[5], 25, 50, 100, 200, 400	0, 2.5, 5, 10, 20, 40
Caffeine	0[5], 25, 50, 100, 200, 400	0, 2.5, 5, 10, 20, 40
Phenytoin	0[5], 25, 50, 100, 200, 400	0, 2.5, 5,10, 20, 40
Phenobarbital	0[5], 50, 100, 200, 400, 1000	0, 5, 10, 20, 40, 100
Vancomycin	0[5], 50, 100, 200, 400, 1000	0, 5, 10, 20, 40, 100

หมายเหตุ

3. กราฟเทียบมาตรฐานต้องมีไว้สำหรับหาค่าความเข้มข้นของยา หรือแคฟเฟอีนในตัวอย่างพลาสมาที่ส่งมาวิเคราะห์ ดังนั้นจำเป็นต้องสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน หากไม่มีกราฟเทียบมาตรฐาน หรือกราฟเทียบมาตรฐานที่จะใช้หมดระยะเวลาในการใช้ตามผลจาก SOP NO. 5

4. วิธีเตรียมสารละลายต่างๆ อยู่ในการเตรียมสารละลายต่างๆในการวิเคราะห์ (เอกสารประกอบ 12) และลงบันทึกในตารางผลการเตรียมสารละลาย(เอกสารประกอบ 8)

5. เติมเมธานอล แทนยา หรือแคฟเฟอีน

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน**	SOP No.2
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 4 ของ 11 หน้า

6.2 การแยกพลาสมาโปรตีนของแบลงค์พลาสมา และพลาสมาที่ใช้สร้างกราฟเทียบมาตรฐาน

- นำหลอดที่มีแบลงค์พลาสมา และพลาสมาที่ใช้สร้างกราฟเทียบมาตรฐาน จากข้อ 6.1 มาแยกพลาสมาโปรตีน ตามแล้วแต่ชนิดของยา หรือสารที่ต้องการวิเคราะห์ ตามตารางข้างล่าง

6.2.1 ธีโอฟิลลีน หรือแคฟเฟอีน

รายการ	แบลงค์พลาสมา	พลาสมาที่ใช้สร้างกราฟเทียบมาตรฐาน
1. ปริมาตรพลาสมาใน microcentrifuge tube(มคล)	110	110
2. เติมซิงค์ ซัลเฟต[4] 10%(น้ำหนักโดยปริมาตร) (มคล)และผสมโดยการวอร์เทก[2]	20	20
3. เติมเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในเมธานอล[4,6] 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	-	150
4. เติมเมธานอล และผสมโดยการวอร์เทก[2]	150	-
5. หมุนเหวี่ยง 15,000 X g ต่อนาที[2,7](นาที)	10	10
6. ดูดสารละลายใสหลังหมุนเหวี่ยงใส่หลอดทันที[8](มคล)	200	200

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย		
เรื่อง การสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน	SOP No. 2	
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....	
	หน้า 5 ของ 11 หน้า	

6.2.2 เฟนิโทอิน

รายการ	แบลงค์พลาสมา	พลาสมาที่ใช้สร้างกราฟเทียบมาตรฐาน
1. ปริมาตรพลาสมาใน microcentrifuge tube(มคล)	110	110
2. เติมฟีโนบาร์บิทอลในเมธานอล[4,6] 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	-	10
3. เติมเมธานอล และผสมโดยการวอร์เทก[2]	10	-
4. เติมอะซีโตไนไตรล์(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	400	400
5. หมุนเหวี่ยง 15,000 X g ต่อนาที[2,7] (นาที)	5	5
6. ดูดสารละลายใสหลังหมุนเหวี่ยงใส่หลอดทันที[8](มคล)	400	400

6.2.3 ฟีโนบาร์บิทอล

รายการ	แบลงค์พลาสมา	พลาสมาที่ใช้สร้างกราฟเทียบมาตรฐาน
1. ปริมาตรพลาสมาใน microcentrifuge tube(มคล)	110	110
2. เติมเฟนิโทอินในเมธานอล[4,6] 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	-	10
3. เติมเมธานอล และผสมโดยการวอร์เทก[2]	10	-
4. เติมอะซีโตไนไตรล์(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	400	400
5. หมุนเหวี่ยง 15,000 X g ต่อนาที[2,7] (นาที)	5	5
6. ดูดสารละลายใสหลังหมุนเหวี่ยงใส่หลอดทันที[8]	400	400

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย		
เรื่อง **การสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน**	SOP No.2	
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....	
	หน้า 6 ของ 11 หน้า	
6.2.5 แวนโคมัยซิน		
รายการ	แบลงค์พลาสมา	พลาสมาที่ใช้สร้างกราฟเทียบมาตรฐาน
1. ปริมาตรพลาสมาใน microcentrifuge tube(มคล)	110	110
2. เติมเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในเมธานอล[4,6] 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	-	10
3. เติมเมธานอล และผสมโดยการวอร์เทก[2]	10	-
4. เติมกรดไตรคลอโรอะซีเตด [4]10% (น้ำหนักต่อปริมาตร)(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	40	40
5. หมุนเหวี่ยง15,000 X g ต่อนาที[2,7] (นาที)	15	15
6. ดูดสารละลายใสหลังหมุนเหวี่ยงใส่หลอดทันที(มคล)	140	140
7. เติมสารละลายไดโปแตสเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1โมลาร์ [4](มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	200	200
8. หมุนเหวี่ยง 15,000 X g ต่อนาที[2,7](นาที)	5	5
9. ดูดสารละลายใสหลังหมุนเหวี่ยงใส่หลอดทันที[8](มคล)	300	300
หมายเหตุ 6. สารมาตรฐานภายใน 7. ถ้าไม่มีเครื่องหมุนเหวี่ยงที่มีแรงหมุนเหวี่ยง 15,000 X g ต่อนาที สามารถใช้เครื่องอื่นได้ โดยเลือกแรงหมุนเหวี่ยง และระยะเวลาหมุนเหวี่ยงเหมาะสม เพื่อให้ได้สารละลายใส 8. กรณีที่ใช้ autoinjector ให้ใช้ insert vial เป็น vial สำหรับใส่สารละลายที่ได้หลังจาก centrifuge เสร็จ แต่ถ้าที่ใช้ manual injector ให้ใช้ microcentrifuge tube แทน		

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน**	SOP No. 2 วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../..... หน้า 7 ของ 11 หน้า

6.3 วิเคราะห์แบลงค์พลาสมา และพลาสมาที่ใช้สร้างกราฟเทียบมาตรฐานด้วย HPLC

6.3.1 กำหนดสภาวะ HPLC ในการวิเคราะห์

- กำหนดสภาวะ HPLC ให้ตรงกับยาและแคฟเฟอีนที่วิเคราะห์ ตามตารางข้างล่าง

ยา หรือสาร	คอลัมน์	โมบายเฟส[9]	อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)
Theophylline	C-18 5 µm, 150X4.6 mm, i.d.	Acetonitrile: Methanol: 0.01 M Acetate buffer pH 3.50 (7: 6: 87 v/v/v)	1.0	272
Caffeine	C-18 5 µm, 150X4.6 mm, i.d	Acetonitrile: Methanol: 0.01 M Acetate buffer pH 3.50 (7: 6: 87 v/v/v)	1.0	272
Phenytoin	C-18 5 µm, 150X4.6 mm, i.d	Acetonitrile: 0.05 M Phosphate buffer pH 6.00 (36: 64 v/v)	1.0	225
Phenobarbital	C-18 5 µm, 150X4.6 mm, i.d	Acetonitrile: 0.05 M Phosphate buffer pH 6.00 (36: 64 v/v)	1.0	225
Vancomycin	C-18 5 µm, 150X4.6 mm, i.d	Acetonitrile: 0.05 M Phosphate buffer pH 4.50 (8: 92 v/v)	1.0	225

หมายเหตุ

9. วิธีเตรียมบัฟเฟอร์ และโมบายเฟส อยู่ในการเตรียมสารละลายต่างๆในการวิเคราะห์ (เอกสารประกอบ 12) และลงบันทึกการเตรียมในตารางผลการเตรียมโมบายเฟส (เอกสารประกอบ 3)

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง การสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน	SOP No. 2
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 8 ของ 11 หน้า

6.3.2 กำหนดค่าต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์

6.3.2.1 กรณีที่ใช้ autoinjector และ data station ให้กำหนด

ปริมาตรของการฉีด 20 ไมโครลิตร

ตำแหน่งหลอด vial สารที่ต้องฉีด

ลงข้อมูลของสารที่ต้องการฉีด

ระยะเวลาในการฉีดแต่ละครั้งของการวิเคราะห์ 15 นาที หรือจนไม่มีสารออกมา (วิธีปรับ แล้วแต่เครื่อง HPLC)

6.3.2.2 กรณีที่ใช้ manual injector[10-11] และ integrator ให้กำหนด

ลงข้อมูลของสารที่ต้องการฉีด

ระยะเวลาในการฉีดแต่ละครั้งของการวิเคราะห์ 15 นาที หรือจนไม่มีสารออกมา

หมายเหตุ

10. manual injector ที่ใช้มีขนาดปริมาตร 20 ไมโครลิตรและ syringeที่ใช้ฉีดสารมีขนาดปริมาตร 100 ไมโครลิตร

11. วิธีการฉีด manual injector มีดังนี้ กลั้วเข็มด้วยสารที่ต้องการฉีดโดยดูดสารตัวอย่างเข้า syringe แล้วปล่อยทิ้ง ทำเช่นนี้ 2-3 ครั้ง ดูดสารที่ต้องการฉีดประมาณ 100 ไมโครลิตร ไม่ให้มีไล่ฟองอากาศ ถ้ามีฟองอากาศให้ดูดใหม่ แทงเข็มในตำแหน่ง load ของ injector จนสุด จากนั้นฉีดสารเข้า injector จนสุด และบิด injector ไปตำแหน่ง inject ถ้าที่ integrator ไม่ทำงานโดยอัตโนมัติหลังจากฉีด ให้กดปุ่ม start หรือ run (แล้วแต่เครื่อง HPLC) พร้อมๆกับบิด injector และเมื่อฉีดสารเสร็จสิ้นในแต่ละครั้ง ต้องล้างเข็มด้วยตัวทำละลายเดียวกันกับที่ใช้ละลายสารที่ใช้ฉีด

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน**	SOP No. 2 วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../..... หน้า 9 ของ 11 หน้า

6.3.3 การวิเคราะห์ด้วย HPLC

6.3.3.1 ฉีดสารละลายมาตรฐานยา หรือแคฟเฟอีนที่วิเคราะห์ และสารมาตรฐานภายในในเมธานอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของสภาวะ HPLC โดยพิจารณาจากลักษณะพีค และ retention time[12]

6.3.3.2 ฉีดสารละลายที่ได้จากการแยกพลาสมาโปรตีนของแบลงค์พลาสมาจากข้อ 6.2[13]

- ตรวจสอบโครมาโตแกรมของแบลงค์พลาสมาว่า ไม่มีพีคใดๆออกที่ตำแหน่งเดียวกันกับพีคยา หรือแคฟเฟอีนที่ต้องการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน ถ้าไม่มี จึงฉีดสารละลายที่ได้จากการแยกพลาสมาโปรตีนของพลาสมาที่ใช้สร้างกราฟเทียบมาตรฐานจากข้อ6.2 ได้ แต่หากมีพีคใดๆออกที่ตำแหน่งเดียวกันกับพีคยา หรือแคฟเฟอีนที่ต้องการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน ให้หาพลาสมาที่ไม่มียา หรือแคฟเฟอีนที่มาสร้างกราฟเทียบมาตรฐานใหม่

6.3.3.3 ฉีดสารละลายที่ได้จากการแยกพลาสมาโปรตีนของพลาสมาที่ใช้สร้างกราฟเทียบมาตรฐานจากข้อ 6.2[13]

หมายเหตุ

12. ถ้าเกิดปัญหา ให้ตรวจสอบความผิดปกติ และแก้ไข HPLC เบื้องต้น (เอกสารประกอบ9)

13. สารละลายที่ฉีดเข้า HPLC ต้องเป็นสารละลายใส ไม่ขุ่น หรือมีตะกอน

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน**	SOP No. 2
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 10 ของ 11 หน้า

6.4 สร้างกราฟเทียบมาตรฐานของยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา

- นำค่าพื้นที่ภายใต้พีคของยา หรือแคฟเฟอีน และสารมาตรฐานภายในของพลาสมาที่ใช้สร้างกราฟเทียบมาตรฐานทั้ง 6 ความเข้มข้น จากการวิเคราะห์ในข้อ 6.3 มาคำนวณหาค่าอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค

$$\text{อัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค} = \frac{\text{พื้นที่ภายใต้พีคของยา หรือแคฟเฟอีน}}{\text{พื้นที่ภายใต้พีคของสารมาตรฐานภายใน}}$$

- คำนวณหาสมการความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค (Y) กับความเข้มข้นของยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา (X) ในกราฟเทียบมาตรฐาน

สมการของกราฟเทียบมาตรฐาน; $Y=aX+b$

เมื่อ Y =อัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค, X = ความเข้มข้นยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา

a ,b = ความชัน และจุดตัดบนแกน X ของสมการกราฟเทียบมาตรฐาน

- ลงบันทึกผลการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน ในตารางผลการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน (เอกสารประกอบ 4) ทั้งนี้การลงบันทึกพื้นที่ภายใต้พีค อัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค และสมการของกราฟเทียบมาตรฐานให้ลงเป็นตัวเลขที่มีเลขนัยสำคัญ 4 หลัก

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน**	SOP No. 2 วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../..... หน้า 11 ของ 11 หน้า

7. เอกสารประกอบ

เอกสารประกอบ 3 ตารางผลการเตรียมโมบายเฟส

เอกสารประกอบ 4 ตารางผลการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน

เอกสารประกอบ 8 ตารางผลการเตรียมสารละลาย

เอกสารประกอบ 9 การตรวจสอบความผิดปกติ และแนวทางแก้ไขปัญหา HPLC เบื้องต้น

เอกสารประกอบ 11 คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

เอกสารประกอบ 12 การเตรียมสารละลายต่างๆในการวิเคราะห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มาตรฐานวิธีการปฏิบัติ

SOP No. 3

เรื่อง

การรับ แบ่งบรรจุ และเก็บรักษาตัวอย่างพลาสมา

สารบัญ

	หน้า
1. วัตถุประสงค์	1
2. ขอบเขตของงาน	1
3. หน่วยงานที่รับผิดชอบ	1
4. คำอธิบายศัพท์	1
5. แผนภูมิการทำงาน	1
6. รายละเอียดของขั้นตอนการทำงาน	2
7. เอกสารประกอบ	4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การรับ แบ่งบรรจุ และเก็บรักษาตัวอย่างพลาสมา**	SOP No. 3
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 1 ของ 4 หน้า

1. วัตถุประสงค์

เพื่อเป็นวิธีปฏิบัติในการรับ แบ่งบรรจุ และเก็บรักษาตัวอย่างพลาสมาให้เหมาะสมกับความคงตัวของตัวอย่างพลาสมา

2. ขอบเขตของงาน

วิธีปฏิบัตินี้ใช้ในการรับตัวอย่างพลาสมา แบ่งบรรจุ และเก็บรักษาตัวอย่างพลาสมา

3. หน่วยงานที่รับผิดชอบ

หน่วยงานที่รับผิดชอบงานด้านการควบคุม และติดตามระดับยาในสถานพยาบาล

4. คำอธิบายศัพท์

- *หมายเลขประจำตัวโรงพยาบาล (Hospital Number ,HN)* เลขประจำตัวของผู้ป่วยแต่ละคนในโรงพยาบาล

5. แผนภูมิทำงาน

รับตัวอย่างพลาสมา

↓

แบ่งบรรจุตัวอย่างพลาสมา

↓

เก็บรักษาตัวอย่างพลาสมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การรับ แบ่งบรรจุ และเก็บรักษาตัวอย่างพลาสมา**	SOP No. 3
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 2 ของ 4 หน้า

6. รายละเอียดของขั้นตอนการทำงาน

6.1 รับตัวอย่างพลาสมา

- ตรวจรับตัวอย่างพลาสมา
- ลงบันทึกหมายเลขประจำตัวโรงพยาบาล (Hospital Number, HN) ชื่อ นามสกุลของผู้ป่วย วัน/เดือน/ปี เวลาที่ได้รับตัวอย่างพลาสมา และประวัติการใช้ยาของผู้ป่วย ในใบรับ และแจ้งผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา (เอกสารประกอบ 6)
- ลงบันทึกหมายเลขประจำตัวโรงพยาบาล ชื่อ นามสกุลของผู้ป่วย วัน/เดือน/ปี ในตารางผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา (เอกสารประกอบ 7)

6.2 แบ่งบรรจุตัวอย่างพลาสมา

- นำตัวอย่างพลาสมา แบ่งบรรจุใน microcentrifuge tube 4 หลอด หลอดละ 100 ไมโครลิตร โดย

หลอดที่ 1-2 นำไปเตรียมตัวอย่างพลาสมา และวิเคราะห์ด้วย HPLC ตาม SOP No. 4 และ 5

หลอดที่ 3-4 นำไปเก็บเพื่อใช้สำหรับตรวจยืนยัน เมื่อต้องการ

- เขียนและติดหมายเลขประจำตัวโรงพยาบาล ชื่อของยา หรือแคฟเฟอีนที่วิเคราะห์ข้างหลอดทั้ง 4 หลอด

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การรับ แบ่งบรรจุ และเก็บรักษาตัวอย่างพลาสมา**	SOP No. 3
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 3 ของ 4 หน้า

6.3 เก็บรักษาตัวอย่างพลาสมา

6.3.1 ตัวอย่างพลาสมาในหลอดที่ 1-2 สามารถรอการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิห้อง ด้วยระยะเวลา ตามตารางข้างล่าง

ยา หรือสาร	ระยะเวลาการเก็บตัวอย่างพลาสมา ที่อุณหภูมิห้อง(25 ±2°C) (ชั่วโมง)
Theophylline	6
Caffeine	6
Phentoin	8
Phenobarbital	6
Vancomycin	4

■ กรณีที่ไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาในหลอดที่ 1-2 ควรรีบเก็บตัวอย่างพลาสมาในช่องแช่แข็งของตู้เย็น โดยจำนวนครั้งของยา หรือแคฟเฟอีนที่สามารถนำไปเก็บในช่องแช่แข็ง และละลายเพื่อไปวิเคราะห์ ตามตารางข้างล่าง

ยา หรือสาร	จำนวนครั้งที่สามารถนำตัวอย่างพลาสมาเข้า และออกในช่องแช่แข็ง
Theophylline	3
Caffeine	3
Phentoin	3
Phenobarbital	2
Vancomycin	3

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การรับ แบ่งบรรจุ และเก็บรักษาตัวอย่างพลาสมา**	SOP No. 3
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 4 ของ 4 หน้า

6.3.2 ตัวอย่างพลาสมาในหลอดที่ 3-4 สามารถเก็บในช่องแช่แข็งของตู้เย็นด้วยระยะเวลา ตามตารางข้างล่าง

ยา หรือสาร	ระยะเวลาการเก็บตัวอย่างพลาสมาในช่องแช่แข็ง (-18±3°C) (วัน)
Theophylline	30
Caffeine	30
Phentoin	5
Phenobarbital	14
Vancomycin	5

7. เอกสารประกอบ

เอกสารประกอบ 6 ใบรับ และแจ้งผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา

เอกสารประกอบ 7 ตารางผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มาตรฐานวิธีการปฏิบัติ

SOP No. 4

เรื่อง

การเตรียมตัวอย่างพลาสมา

สารบัญ

	หน้า
1. วัตถุประสงค์	1
2. ขอบเขตของงาน	1
3. หน่วยงานที่รับผิดชอบ	1
4. คำอธิบายศัพท์	1
5. แผนภูมิการทำงาน	2
6. รายละเอียดของขั้นตอนการทำงาน	3
7. เอกสารประกอบ	8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเตรียมตัวอย่างพลาสมา**	SOP No. 4
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 1 ของ 8 หน้า

1. วัตถุประสงค์

เพื่อเป็นวิธีปฏิบัติในการเตรียมตัวอย่างพลาสมาของธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน เฟนิโทอิน ฟีโนบาร์บิทอล และแวนโคมัยซินในพลาสมา ด้วยการแยกพลาสมาโปรตีนของพลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน และตัวอย่างพลาสมาก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

2. ขอบเขตของงาน

วิธีปฏิบัตินี้ใช้ในการเตรียมตัวอย่างพลาสมาของธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน เฟนิโทอิน ฟีโนบาร์บิทอล และแวนโคมัยซินในพลาสมา ด้วยการแยกพลาสมาโปรตีนของพลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน และตัวอย่างพลาสมา เพื่อให้ได้สารละลายที่สามารถนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

3.หน่วยงานที่รับผิดชอบ

หน่วยงานที่รับผิดชอบงานด้านการควบคุม และติดตามระดับยาในสถานพยาบาล

4.คำอธิบายศัพท์

- *กราฟเทียบมาตรฐาน* ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค กับความเข้มข้นของสารแสดงในรูปสมการ
- *สารมาตรฐานภายใน* สารที่เติมลงไปในพลาสมาที่วิเคราะห์ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพลาสมา เพื่อช่วยลดความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากการวิเคราะห์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเตรียมตัวอย่างพลาสมา**	SOP No. 4
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 2 ของ 8 หน้า

■ *เครื่องหมุนเหวี่ยง* อุปกรณ์แยกสารละลายใสจากตะกอนโดยใช้แรงหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง

5. แผนภูมิทำงาน

เตรียมพลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน

↓

การแยกพลาสมาโปรตีนของพลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน และตัวอย่างพลาสมา

↓

ตรวจสอบสารละลายที่ได้จากการแยกพลาสมาโปรตีนของพลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน และตัวอย่างพลาสมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเตรียมตัวอย่างพลาสมา**	SOP No. 4
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 3 ของ 8 หน้า

6. รายละเอียดของขั้นตอนการทำงาน

6.1 เตรียมพลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน[1]

- เติมพลาสมาที่ไม่มีตัวยา หรือแคฟเฟอีนที่ต้องการวิเคราะห์ 100 ไมโครลิตร ใส่ microcentrifuge tube 2 หลอด
- เติมสารละลายมาตรฐานของยา หรือแคฟเฟอีน ในเมธานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ 10 ไมโครลิตร ในแต่ละหลอด ตามตารางข้างล่าง และผสมโดยการวอร์เทก[2]

ยา หรือ สาร	ความเข้มข้นสารละลายในเมธานอล[3](มคก/มล)	ความเข้มข้นในพลาสมา (มคก/มล)
Theophylline	80, 320	8, 32
Caffeine	80, 320	8, 32
Phenytoin	80, 320	8, 32
Phenobarbital	160, 500	16, 50
Vancomycin	80, 500	8, 50

หมายเหตุ

1. ต้องตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐานทุกครั้งเมื่อมีการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา
2. ถ้ามีปัญหาการใช้อุปกรณ์ หรือเครื่องมือใดๆ ให้อ่านคำแนะนำในการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ (เอกสารประกอบ 11)
3. วิธีเตรียมสารละลายต่างๆ อยู่ในการเตรียมสารละลายต่างๆในการวิเคราะห์ (เอกสารประกอบ 12) และลงบันทึกในตารางผลการเตรียมสารละลาย(เอกสารประกอบ 8)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเตรียมตัวอย่างพลาสมา**	SOP No. 4
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 4 ของ 8 หน้า

6.2 การแยกพลาสมาโปรตีนของพลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน และตัวอย่างพลาสมา

- นำหลอดที่มีพลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐานจากข้อ 6.1 และหลอดที่มีตัวอย่างพลาสมาที่ต้องการวิเคราะห์จาก SOP No. 3 มาแยกพลาสมาโปรตีนตามแล้วแต่ชนิดของยา หรือสารที่ต้องการวิเคราะห์ ตามตารางข้างล่าง

6.2.1 ธีโอฟิลลีน หรือแคฟเฟอีน

รายการ	พลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน	ตัวอย่างพลาสมา
1. ปริมาตรพลาสมาใน microcentrifuge tube(มคล)	110	100
2. เติมเมธานอล(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	-	10
3. เติมซิงค์ ซัลเฟต[3] 10%(น้ำหนักโดยปริมาตร) (มคล)และผสมโดยการวอร์เทก[2]	20	20
4. เติมเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน ในเมธานอล[3-4] 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	150	150
5. หมุนเหวี่ยง 15,000 X g ต่อนาที[2,5](นาที)	10	10
6. ดูดสารละลายใสหลังหมุนเหวี่ยงใส่หลอดทันที[6](มคล)	200	200

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเตรียมตัวอย่างพลาสมา**	SOP No. 4
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 5 ของ 8 หน้า

6.2.3 เฟนิโทอิน

รายการ	พลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน	ตัวอย่างพลาสมา
1. ปริมาตรพลาสมาใน microcentrifuge tube(มคล)	110	100
2. เติมเมธานอล(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	-	10
3. เติมฟีโนบาร์บิทอลในเมธานอล[3-4]100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	10	10
4. เติมอะซีโตไนไตรล์(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	400	400
5. หมุนเหวี่ยง 15,000 X g ต่อนาที[2,5] (นาที)	5	5
6. ดูดสารละลายใสหลังหมุนเหวี่ยงใส่หลอดทันที[6](มคล)	400	400

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเตรียมตัวอย่างพลาสมา**	SOP No. 4
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 6 ของ 8 หน้า

6.2.4 ฟีโนบาร์บิทอล

รายการ	พลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน	ตัวอย่างพลาสมา
1. ปริมาตรพลาสมาใน microcentrifuge tube(มคล)	110	100
2. เติมเมธานอล(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	-	10
3. เติมเฟนิโทอินในเมธานอล[3,4] 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	10	10
3. เติมอะซีโตไนไตรล์(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	400	400
4. หมุนเหวี่ยง 15,000 X g ต่อนาที[5] (นาที)	5	5
5. ดูดสารละลายใสหลังหมุนเหวี่ยงใส่หลอดทันที[6](มคล)	400	400

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย		
เรื่อง **การเตรียมตัวอย่างพลาสมา**	SOP No. 4	
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....	
	หน้า 7 ของ 8 หน้า	
6.2.5 แวนโคมัยซิน		
รายการ	พลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน	ตัวอย่างพลาสมา
1. ปริมาตรพลาสมาใน microcentrifuge tube(มคล)	110	100
2. เติมเมธานอล (มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	-	10
3. เติมเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในเมธานอล[3-4] 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	10	10
4. เติมกรดไตรคลอโรอะซีติด[3]10% (น้ำหนักต่อปริมาตร)(มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	40	40
5. หมุนเหวี่ยง15,000 X g ต่อนาที[2,5] (นาที)	15	15
6. ดูดสารละลายใสหลังหมุนเหวี่ยงใส่หลอดทันที(มคล)	140	140
7. เติมสารละลายไดโปแตสเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1โมลาร์ [3](มคล) และผสมโดยการวอร์เทก[2]	200	200
8. หมุนเหวี่ยง 15,000 X g ต่อนาที[2,5](นาที)	5	5
9. ดูดสารละลายใสหลังหมุนเหวี่ยงใส่หลอดทันที[6](มคล)	300	300

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเตรียมตัวอย่างพลาสมา**	SOP No. 4
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 8 ของ 8 หน้า

6.3 ตรวจสอบสารละลายที่ได้จากการแยกพลาสมาโปรตีนของพลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน และตัวอย่างพลาสมา

- สารละลายที่ได้จากการแยกพลาสมาโปรตีนของพลาสมาทั้ง 2 ต้องเป็นสารละลายใส ไม่ขุ่น และไม่มีตะกอนปนอยู่ จึงนำสารละลายไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ตาม SOP No. 5 ได้
- ถ้ามีสารละลายขุ่น หรือมีตะกอน ต้องนำไปหมุนเหวี่ยงใหม่ให้ได้สารละลายใส ไม่ขุ่น และไม่มีตะกอนปนอยู่ ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ตาม SOP No. 5

หมายเหตุ

4. สารมาตรฐานภายใน
5. ถ้าไม่มีเครื่องหมุนเหวี่ยงที่มีแรงหมุนเหวี่ยง 15,000 X g ต่อนาที สามารถใช้เครื่องอื่นได้ โดยเลือกแรงหมุนเหวี่ยง และระยะเวลาหมุนเหวี่ยงเหมาะสม เพื่อให้ได้สารละลายใส
6. กรณีที่ใช้ autoinjector ให้ใช้ insert vial เป็น vial สำหรับใส่สารละลายที่ได้หลังจาก centrifugeเสร็จ แต่ถ้าที่ใช้ manual injector ให้ใช้ microcentrifuge tube แทน

7. เอกสารประกอบ

เอกสารประกอบ 8 ตารางผลการเตรียมสารละลาย

เอกสารประกอบ 11 คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

เอกสารประกอบ 12 การเตรียมสารละลายต่างๆในการวิเคราะห์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มาตรฐานวิธีการปฏิบัติ

SOP No. 5

เรื่อง

การวิเคราะห์ด้วย HPLC

สารบัญ

	หน้า
1. วัตถุประสงค์	1
2. ขอบเขตของงาน	1
3. หน่วยงานที่รับผิดชอบ	1
4. คำอธิบายศัพท์	1
5. แผนภูมิการทำงาน	3
6. รายละเอียดของขั้นตอนการทำงาน	4
7. เอกสารประกอบ	10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การวิเคราะห์ด้วย HPLC**	SOP No. 5
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 1 ของ 10 หน้า

1. วัตถุประสงค์

เพื่อเป็นวิธีปฏิบัติในการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน เฟนิโทอิน ฟีโนบาร์บิทอล และแวนโคมัยซิน ด้วย HPLC

2. ขอบเขตของงาน

วิธีปฏิบัตินี้ใช้ในการตั้งสภาวะ HPLC การฉีดสารต่างๆเข้า HPLC ตลอดจนการเตรียมพร้อมกับการวิเคราะห์ครั้งต่อไปของธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน เฟนิโทอิน ฟีโนบาร์บิทอล และแวนโคมัยซิน

3. หน่วยงานที่รับผิดชอบ

หน่วยงานที่รับผิดชอบงานด้านการควบคุม และติดตามระดับยาในสถานพยาบาล

4. คำอธิบายศัพท์

- *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* เทคนิคใช้แยกสารและตรวจวัดปริมาณสาร โดยเมื่อฉีดสารเข้า HPLC สารถูกแยกโดยหลักการแยกสารทาง chromatography ซึ่งใช้ คอลัมน์ ที่มีขนาดอนุภาคภายในเล็กทำหน้าที่เป็นสารหน่วงเหนี่ยงการผ่านสารตัวอย่าง มีโมบายเฟส เป็นตัวพา และชะสารให้เคลื่อนที่ผ่านไปด้วยความดันสูงจาก pump และหลังจากสารต่างๆถูกแยกออกจากกันแล้วสารจะถูกวัดปริมาณด้วย detector
- *โมบายเฟส* ส่วนผสมของสารละลายใช้เป็นตัวพา และชะสารให้ออกจากคอลัมน์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การวิเคราะห์ด้วย HPLC**	SOP No. 5
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 2 ของ 10 หน้า

- *อัตราการไหล(flow rate)* ค่าแสดงอัตราการไหลของโมบายเฟสเข้าระบบของ HPLC มีหน่วยเป็น มิลลิลิตรต่อนาที
- *UV-detector* เครื่องตรวจวัดปริมาณสาร โดยอาศัยหลักการ spectroscopy
- *ความยาวคลื่น* ค่าที่กำหนดใน UV-detector เป็นช่วงคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงของสารที่วิเคราะห์ มีหน่วยเป็น นาโนเมตร
- *Lamp* หลอดไฟของ UV-detector โดยทั่วไปมีอายุประมาณ 1,000-2,000 ชั่วโมง
- *Autoinjector* อุปกรณ์ที่ใช้ในการฉีดสารเข้า HPLC โดยอัตโนมัติ
- *Manual injector* อุปกรณ์ที่รองรับการฉีดสารเข้า HPLC ด้วยการฉีดด้วย syringe
- *Data station* อุปกรณ์คอมพิวเตอร์ เป็นจุดรวมข้อมูลการวิเคราะห์และคำสั่งต่างๆ ซึ่งถูกควบคุมผ่านโปรแกรมคอมพิวเตอร์
- *Integrator* อุปกรณ์แปลสัญญาณของการวิเคราะห์ ในรูปโครมาโตแกรม และค่าต่างๆเช่น พื้นที่ภายใต้พีค เป็นต้น และบันทึกออกมาขณะวิเคราะห์
- *Retention time* เวลาที่สารถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์ มีหน่วยเป็น นาที
- *สารมาตรฐานภายใน* สารที่เติมลงไปในพลาสมาที่วิเคราะห์ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพลาสมา เพื่อช่วยลดความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากการวิเคราะห์
- *โครมาโตแกรม* บันทึกที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC มีลักษณะเป็นกราฟความสัมพันธ์ของสัญญาณตอบรับ (response signal) กับเวลา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การวิเคราะห์ด้วย HPLC**	SOP No. 5
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 3 ของ 10 หน้า

5. แผนภูมิทำงาน

กำหนดสภาวะ HPLC ในการวิเคราะห์

↓

กำหนดค่าต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์

↓

วิเคราะห์ด้วย HPLC

↓

เตรียมพร้อมในการวิเคราะห์ครั้งต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง	SOP No. 5
การวิเคราะห์ด้วย HPLC	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 4 ของ 10 หน้า

6. รายละเอียดของขั้นตอนการทำงาน

6.1 กำหนดสภาวะ HPLC ในการวิเคราะห์

- กำหนดสภาวะ HPLC ให้ตรงกับยา และแคฟเฟอีนที่วิเคราะห์ ตามตารางข้างล่าง

ยา หรือสาร	คอลัมน์	โมบายเฟส[1]	อัตราการไหล (มิลลิลิตร/นาที)	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)
Theophylline	C-18 5 µm, 150X4.6 mm,i.d.	Acetonitrile: Methanol: 0.01 M Acetate buffer pH 3.50 (7: 6: 87 v/v/v)	1.0	272
Caffeine	C-18 5 µm, 150X4.6 mm,i.d	Acetonitrile: Methanol: 0.01 M Acetate buffer pH 3.50 (7: 6: 87 v/v/v)	1.0	272
Phenytoin	C-18 5 µm, 150X4.6 mm,i.d	Acetonitrile: 0.05 M Phosphate buffer pH 6.00 (36: 64 v/v)	1.0	225
Phenobarbital	C-18 5 µm, 150X4.6 mm,i.d	Acetonitrile: 0.05 M Phosphate buffer pH 6.00 (36: 64 v/v)	1.0	225
Vancomycin	C-18 5 µm, 150X4.6 mm,i.d	Acetonitrile: 0.05 M Phosphate buffer pH 4.50 (8: 92 v/v)	1.0	225

หมายเหตุ

1.วิธีเตรียมบัฟเฟอร์ และโมบายเฟส อยู่ในการเตรียมสารละลายต่างๆในการวิเคราะห์ (เอกสารประกอบ 12) และลงบันทึกการเตรียมในตารางผลการเตรียมโมบายเฟส (เอกสารประกอบ 3)

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การวิเคราะห์ด้วย HPLC**	SOP No. 5
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 5 ของ 10 หน้า

6.2 กำหนดค่าต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์

6.2.1 กรณีที่ใช้ autoinjector และ data station ให้กำหนด

ปริมาตรของการฉีด 20 ไมโครลิตร

ตำแหน่งหลอด vial สารที่ต้องฉีด

ลงข้อมูลของสารที่ต้องการฉีด

ระยะเวลาในการฉีดแต่ละครั้งของการวิเคราะห์ 15 นาที หรือจนไม่มีสารออกมา (วิธีปรับ แล้วแต่เครื่อง HPLC)

6.2.2 กรณีที่ใช้ manual injector[2-3] และ integrator ให้กำหนด

ลงข้อมูลของสารที่ต้องการฉีด

ระยะเวลาในการฉีดแต่ละครั้งของการวิเคราะห์ 15 นาที หรือจนไม่มีสารออกมา

หมายเหตุ

2. manual injector ที่ใช้มีขนาดปริมาตร 20 ไมโครลิตรและ syringe ที่ใช้ฉีดสารมีขนาดปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3. วิธีการฉีด manual injector มีดังนี้ กลั้วเข็มด้วยสารที่ต้องการฉีดโดยดูดสารตัวอย่างเข้า syringe แล้วปล่อยทิ้ง ทำเช่นนี้ 2-3 ครั้ง ดูดสารที่ต้องการฉีดประมาณ 100 ไมโครลิตร ไม่ให้มีไล่ฟองอากาศ ถ้ามีฟองอากาศให้ดูดใหม่ แทงเข็มในตำแหน่ง load ของ injector จนสุด จากนั้นฉีดสารเข้า injector จนสุด และบิด injector ไปตำแหน่ง inject ถ้าที่ integrator ไม่ทำงานโดยอัตโนมัติหลังจากฉีด ให้กดปุ่ม start หรือ run (แล้วแต่เครื่อง HPLC) พร้อมๆ กับบิด injector และเมื่อฉีดสารเสร็จสิ้นในแต่ละครั้ง ต้องล้างเข็มด้วยตัวทำละลายเดียวกันกับที่ใช้ละลายสารที่ใช้ฉีด

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การวิเคราะห์ด้วย HPLC**	SOP No. 5
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 6 ของ 10 หน้า

6.3 การวิเคราะห์ด้วย HPLC

6.3.1 ฉีดสารละลายมาตรฐานยา หรือแคฟเฟอีนที่วิเคราะห์ และสารมาตรฐานภายในในเมธานอล 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของสภาวะ HPLC โดยพิจารณาจากลักษณะพีค และ retention time[4]

6.3.2 ฉีดสารละลายที่ได้จากการแยกพลาสมาโปรตีนของพลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐานจาก SOP No. 4

6.3.3 ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐานของยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา

- หลังจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC แล้วให้นำข้อมูลที่ได้ในแต่ละโครมาโตแกรมไปคำนวณหาความเข้มข้นยา หรือแคฟเฟอีนของพลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐานทั้ง 2 ความเข้มข้น
- นำค่าพื้นที่ภายใต้พีคของยา หรือแคฟเฟอีน และสารมาตรฐานภายในของพลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐานทั้ง 2 ความเข้มข้นมาคำนวณหาค่าอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค

$$\text{อัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค} = \frac{\text{พื้นที่ภายใต้พีคของยา หรือแคฟเฟอีน}}{\text{พื้นที่ภายใต้พีคของสารมาตรฐานภายใน}}$$

หมายเหตุ

4. ถ้าเกิดปัญหา ให้ตรวจสอบความผิดปกติ และแก้ไข HPLCเบื้องต้น (เอกสารประกอบ 9)

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การวิเคราะห์ด้วย HPLC**	SOP No. 5
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 7 ของ 10 หน้า

■ คำนวณหาความเข้มข้นยา หรือแคฟเฟอีน (X) ของพลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐานทั้ง 2 ความเข้มข้น โดยแทนค่าอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค (Y) ในสมการของกราฟเทียบมาตรฐานของยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมาที่ต้องการตรวจสอบประสิทธิภาพ

สมการของกราฟเทียบมาตรฐาน; $Y=aX+b$

เมื่อ Y =อัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค, X = ความเข้มข้นยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา

a ,b = ความชัน และจุดตัดบนแกน X ของสมการกราฟเทียบมาตรฐาน

■ นำค่าความเข้มข้นของยา หรือแคฟเฟอีนที่วิเคราะห์ได้ทั้ง 2 ความเข้มข้น มาเปรียบเทียบกับช่วงความเข้มข้นในพลาสมาทั้ง 2 ความเข้มข้น ตามตารางข้างล่าง

ยา หรือสาร	ช่วงความเข้มข้นในพลาสมา (มคก/มล)	
	ความเข้มข้นต่ำ	ความเข้มข้นสูง
Theophylline	6.80-9.20	27.20-36.80
Caffeine	6.80-9.20	27.20-36.80
Phenytoin	6.80-9.20	27.20-36.80
Phenobarbital	13.60-18.40	42.50-57.50
Vancomycin	6.80-9.20	42.50-57.50

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การวิเคราะห์ด้วย HPLC**	SOP No. 5
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 8 ของ 10 หน้า

■ ถ้าความเข้มข้นของยา หรือแคฟเฟอีนที่วิเคราะห์ได้ทั้ง 2 ความเข้มข้น อยู่ในช่วงความเข้มข้นในพลาสมาข้างต้น ถือว่ากราฟเทียบมาตรฐานที่ตรวจสอบยังมีประสิทธิภาพอยู่ และสามารถนำกราฟเทียบมาตรฐานไปใช้คำนวณหาปริมาณยา หรือแคฟเฟอีนในตัวอย่างพลาสมาได้ จึงฉีดสารละลายที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างพลาสมาของตัวอย่างพลาสมาที่วิเคราะห์ตาม SOP No. 4 ได้

■ ถ้าความเข้มข้นความเข้มข้นใดความเข้มข้นหนึ่ง หรือทั้ง 2 ความเข้มข้นอยู่นอกช่วงความเข้มข้นในพลาสมาข้างต้น ให้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐานใหม่อีกครั้ง หากตรวจสอบแล้วความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ยังอยู่นอกช่วงที่กำหนด จึงให้สร้างกราฟเทียบมาตรฐานใหม่ หรือสร้างกราฟเทียบมาตรฐานใหม่หลังหมดระยะเวลาการใช้กราฟเทียบมาตรฐานได้มากที่สุด

■ ระยะเวลาการใช้กราฟเทียบมาตรฐานได้มากที่สุด ตามตารางข้างล่าง

ยา และสาร	ระยะเวลาในการใช้กราฟเทียบมาตรฐานได้ (วัน)
Theophylline	30
Caffeine	30
Phenytoin	18
Phenobarbital	30
Vancomycin	5

■ ลงบันทึกผลการตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน ในตารางผลการตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน (เอกสารประกอบ 5) ทั้งนี้การลงบันทึก พื้นที่ภายใต้พีค และอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค ให้ลงเป็นตัวเลขมีเลขนัยสำคัญ 4 หลัก ส่วนความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ให้ลงเป็นตัวเลขที่มีทศนิยม 2 หลัก

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การวิเคราะห์ด้วย HPLC**	SOP No. 5
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 9 ของ 10 หน้า

6.3.3 ฉีดสารละลายที่ได้จากการแยกพลาสมาโปรตีนของตัวอย่างพลาสมาที่วิเคราะห์ จาก SOP No. 4

- หลังจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC แล้ว ให้นำข้อมูลที่ได้ในแต่ละโครมาโตแกรมไปหาปริมาณยา หรือแคฟเฟอีนในตัวอย่างพลาสมา โดยใช้กราฟเทียบมาตรฐานที่ผ่านการตรวจสอบประสิทธิภาพแล้วในการคำนวณ ตาม SOP No. 6

6.4 เตรียมพร้อมในการวิเคราะห์ครั้งต่อไป[5]

6.4.1 กรณีที่การวิเคราะห์ครั้งต่อไปใช้โมบายเฟสชนิดเดียวกับการวิเคราะห์ครั้งก่อน สามารถวิเคราะห์ต่อไปได้

6.4.2 กรณีที่การวิเคราะห์ครั้งต่อไปใช้โมบายเฟสคนละชนิดกับการวิเคราะห์ครั้งก่อน

- ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำประมาณ 15-20 นาที หรือจนกว่าสัญญาณนิ่ง
- ปรับสมดุลของคอลัมน์ด้วยโมบายเฟส จนกว่าสัญญาณนิ่ง

จึงวิเคราะห์ครั้งต่อไปได้

หมายเหตุ

5. ในกรณีที่ใช้ manual injector เมื่อสิ้นสุดการวิเคราะห์ในแต่ละครั้ง ให้ล้าง syringe ให้สะอาดด้วยน้ำและเมธานอล ก่อนนำไปใช้วิเคราะห์ครั้งต่อไป และหากไม่มีการวิเคราะห์อีกต่อไปให้เก็บ syringe ในกล่องที่มีฟองน้ำรองกันกระแทก

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การวิเคราะห์ด้วย HPLC**	SOP No. 5
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 10 ของ 10 หน้า

6.4.3 กรณีที่ไม่มีตัวอย่างพลาสมาให้วิเคราะห์

- ล้างทำความสะอาดคอลัมน์ด้วยน้ำประมาณ 15-20 นาที หรือจนกว่าสัญญาณนิ่ง อาจปิดทุกส่วนของ HPLC และรอการวิเคราะห์ครั้งต่อไป

7. เอกสารประกอบ

เอกสารประกอบ 3 ตารางผลการเตรียมโมบายเฟส

เอกสารประกอบ 5 ตารางผลการตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน

เอกสารประกอบ 9 การตรวจสอบความผิดปกติ และแนวทางแก้ไขปัญหา HPLC เบื้องต้น

เอกสารประกอบ 12 การเตรียมสารละลายต่างๆในการวิเคราะห์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มาตรฐานวิธีการปฏิบัติ

SOP No. 6

เรื่อง

การหาปริมาณยา หรือแคฟเฟอีนในตัวอย่างพลาสมา

สารบัญ

	หน้า
1. วัตถุประสงค์	1
2. ขอบเขตของงาน	1
3. หน่วยงานที่รับผิดชอบ	1
4. คำอธิบายศัพท์	1
5. แผนภูมิการทำงาน	2
6. รายละเอียดของขั้นตอนการทำงาน	2
7. เอกสารประกอบ	4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การหาปริมาณยา หรือแคฟเฟอีน ในตัวอย่างพลาสมา**	SOP No. 6
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 1 ของ 4 หน้า

1. วัตถุประสงค์

เพื่อเป็นวิธีปฏิบัติในการหาปริมาณธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน เฟนิโทอิน ฟีโนบาร์บิทอล และแวนโคมัยซิน ในตัวอย่างพลาสมา

2. ขอบเขตของงาน

วิธีปฏิบัตินี้ใช้ในการหาปริมาณธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน เฟนิโทอิน ฟีโนบาร์บิทอล และแวนโคมัยซินในตัวอย่างพลาสมา ด้วยกราฟเทียบมาตรฐานที่ผ่านการตรวจประสิทธิภาพแล้ว ตลอดจนแจ้งผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาแก่หน่วยงานที่ส่งตัวอย่างพลาสมามาวิเคราะห์

3. หน่วยงานที่รับผิดชอบ

หน่วยงานที่รับผิดชอบงานด้านการควบคุม และติดตามระดับยาในสถานพยาบาล

4. คำอธิบายศัพท์

- *สารมาตรฐานภายใน* สารที่เติมลงไปในพลาสมาที่วิเคราะห์ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพลาสมา เพื่อช่วยลดความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากการวิเคราะห์
- *กราฟเทียบมาตรฐาน* ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค กับความเข้มข้นของสาร แสดงในรูปสมการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การหาปริมาณยา หรือแคฟเฟอีน ในตัวอย่างพลาสมา**	SOP No. 6
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 2 ของ 4 หน้า

5. แผนภูมิทำงาน

คำนวณปริมาณยา หรือแคฟเฟอีน ในตัวอย่างพลาสมา จากผลวิเคราะห์ด้วย HPLC

↓

แจ้งค่าความเข้มข้นของยา หรือแคฟเฟอีน ในตัวอย่างพลาสมา

6. รายละเอียดของขั้นตอนการทำงาน

6.1 คำนวณปริมาณยา หรือแคฟเฟอีนในตัวอย่างพลาสมา จากผลวิเคราะห์ด้วย HPLC

- นำค่าพื้นที่ภายใต้พีคของยา หรือแคฟเฟอีน และสารมาตรฐานภายในของตัวอย่างพลาสมาทั้ง 2 หลอดในโครมาโตแกรม จากการวิเคราะห์ตาม SOP No. 5 มาคำนวณหาค่าอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค

$$\text{อัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค} = \frac{\text{พื้นที่ภายใต้พีคของยา หรือแคฟเฟอีน}}{\text{พื้นที่ภายใต้พีคของสารมาตรฐานภายใน}}$$

- คำนวณหาความเข้มข้นยา หรือแคฟเฟอีน (X) ของตัวอย่างพลาสมาทั้ง 2 หลอด โดยแทนค่าอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค (Y) ในสมการของกราฟเทียบมาตรฐานของยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมาที่ผ่านการตรวจสอบประสิทธิภาพแล้ว

สมการของกราฟเทียบมาตรฐาน; $Y=aX+b$

เมื่อ Y =อัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค, X = ความเข้มข้นยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา

a ,b = ความชัน และจุดตัดบนแกน X ของสมการกราฟเทียบมาตรฐาน

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การหาปริมาณยา หรือแคฟเฟอีน ในตัวอย่างพลาสมา**	SOP No. 6 วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../..... หน้า 3 ของ 4 หน้า

- คำนวณหาความเข้มข้นเฉลี่ยของตัวอย่างพลาสมา
- ลงบันทึกผลการวิเคราะห์ ในตารางผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา (เอกสารประกอบ 7) ทั้งนี้การลงบันทึกพื้นที่ภายใต้พีค และอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค ให้ลงเป็นตัวเลขที่มีเลขนัยสำคัญ 4 หลัก ส่วนความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ให้ลงเป็นตัวเลขที่มีทศนิยม 2 หลัก

6.2 แจ้งค่าความเข้มข้นของยา หรือแคฟเฟอีนในตัวอย่างพลาสมา

- ลงบันทึกผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นเฉลี่ย และระยะเวลาที่สามารถยืนยันผลการวิเคราะห์ใหม่ ในใบรับ และแจ้งผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา (เอกสารประกอบ 6)
- ระยะเวลาที่สามารถยืนยันผลการวิเคราะห์ใหม่ของยา หรือแคฟเฟอีนในตัวอย่างพลาสมา นับจากวันที่ส่งตัวอย่างพลาสมามาวิเคราะห์ ภายในระยะเวลาตามตารางข้างล่าง

ยา หรือสาร	ระยะเวลาที่สามารถยืนยันผลการวิเคราะห์ใหม่ (วัน)
Theophylline	30
Caffeine	30
Phentoin	5
Phenobarbital	14
Vancomycin	5

- หากมีปัญหาจนทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาได้ ควรแจ้งในใบรับ และแจ้งผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา(เอกสารประกอบ 6)
- ส่งผลการวิเคราะห์แก่ผู้ส่งตัวอย่างพลาสมามาตรวจ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การหาปริมาณยา หรือแคฟเฟอีน ในตัวอย่างพลาสมา**	SOP No.6
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 4 ของ 4 หน้า

7. เอกสารประกอบ

เอกสารประกอบ 6 ใบรับ และแจ้งผลการการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา

เอกสารประกอบ 7 ตารางผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มาตรฐานวิธีการปฏิบัติ

SOP No. 7

เรื่อง

การเก็บรักษา HPLC

สารบัญ

	หน้า
1. วัตถุประสงค์	1
2. ขอบเขตของงาน	1
3. หน่วยงานที่รับผิดชอบ	1
4. คำอธิบายศัพท์	1
5. แผนภูมิการทำงาน	3
6. รายละเอียดของขั้นตอนการทำงาน	3
7. เอกสารประกอบ	5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง การเก็บรักษา HPLC	SOP No. 7
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 1 ของ 5 หน้า

1. วัตถุประสงค์

เพื่อเป็นวิธีปฏิบัติในการเก็บรักษา HPLC เมื่อสิ้นสุดการวิเคราะห์ในแต่ละวัน

2. ขอบเขตของงาน

วิธีปฏิบัตินี้ใช้ในการทำความสะอาดคอลัมน์ ตลอดจนปิดทุกส่วนของ HPLC เมื่อสิ้นสุดการวิเคราะห์

3. หน่วยงานที่รับผิดชอบ

หน่วยงานที่รับผิดชอบงานด้านการควบคุม และติดตามระดับยาในสถานพยาบาล

4. คำอธิบายศัพท์

- *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* เทคนิคใช้แยกสารและตรวจวัดปริมาณสาร โดยเมื่อฉีดสารเข้า HPLC สารถูกแยกโดยหลักการแยกสารทาง chromatography ซึ่งใช้คอลัมน์ที่มีขนาดอนุภาคภายในเล็กทำหน้าที่เป็นสารหน่วงเหนี่ยวการผ่านของสารตัวอย่าง มีโมบายเฟสเป็นตัวพา และชะสารให้เคลื่อนที่ผ่านไปด้วยความดันสูงจาก pump และหลังจากสารต่างๆถูกแยกออกจากกันแล้วสารจะถูกวัดปริมาณด้วย detector
- *โมบายเฟส* ส่วนผสมของสารละลายใช้เป็นตัวพา และชะสารให้ออกจากคอลัมน์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง การเก็บรักษา HPLC	SOP No. 7
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 2 ของ 5 หน้า

- *HPLC column* คอลัมน์ที่ใช้แยกสาร มีลักษณะเป็นแท่งยาว ขนาด 15 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร มักทำด้วย stainless steel ภายในประกอบด้วยสารอนุภาคเล็กๆ ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 5 ไมโครเมตร ซึ่งอนุภาคเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นสารหน่วงเหนี่ยวการผ่านของสารตัวอย่าง ทำให้เกิดการแยกของสารเกิดขึ้น
- *Guard column* คอลัมน์ขนาด 0.5 เซนติเมตร ภายในบรรจุด้วยสารอนุภาคเล็ก และชนิดเช่นเดียวกับ HPLC column ทำหน้าที่ปกป้องคอลัมน์ จากสิ่งที่อาจมีในตัวอย่างที่วิเคราะห์ และมีผลเสียต่อคอลัมน์
- *Pump* อุปกรณ์เพิ่มแรงดัน เพื่อให้เกิดการไหลของโมบายเฟสผ่านคอลัมน์ตามอัตราการไหลที่กำหนด
- *อัตราการไหล(flow rate)* ค่าแสดงอัตราการไหลของโมบายเฟสเข้าระบบของ HPLC มีหน่วยเป็น มิลลิลิตรต่อนาที
- *UV-detector* เครื่องตรวจวัดปริมาณสาร โดยอาศัยหลักการ spectroscopy
- *Lamp* หลอดไฟของ UV-detector โดยทั่วไปมีอายุประมาณ 1,000-2,000 ชั่วโมง
- *Autoinjector* อุปกรณ์ที่ใช้ในการฉีดสารเข้า HPLC โดยอัตโนมัติ
- *Manual injector* อุปกรณ์ที่รองรับใช้ในการฉีดสารเข้า HPLC ด้วยการฉีดผ่าน syringe
- *Data station* อุปกรณ์คอมพิวเตอร์ เป็นจุดรวมข้อมูลการวิเคราะห์และคำสั่งต่างๆ ซึ่งถูกควบคุมผ่านโปรแกรมคอมพิวเตอร์
- *Integrator* อุปกรณ์แปลสัญญาณของการวิเคราะห์ ในรูปโครมาโตแกรม และค่าต่างๆเช่น พื้นที่ภายใต้พีค เป็นต้น และบันทึกออกมาขณะวิเคราะห์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเก็บรักษา HPLC**	SOP No. 7 วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../..... หน้า 3 ของ 5 หน้า

5. แผนภูมิทำงาน

ทำความสะอาดคอลัมน์

↓

ปิดทุกส่วนของ HPLC

6. รายละเอียดของขั้นตอนการทำงาน

6.1 ทำความสะอาดคอลัมน์

- เมื่อเสร็จสิ้นการวิเคราะห์ ให้ค่อยๆ ลดอัตราการไหลของโมบายเฟส

ทีละ 0.1-0.2 มิลลิลิตรต่อนาที จนเป็น 0 มิลลิลิตรต่อนาที (วิธีปรับ แล้วแต่เครื่อง HPLC)

- เปลี่ยนโมบายเฟสเป็นน้ำ
- ไล่ฟองอากาศออกจนหมดจาก pump
- ค่อยๆเพิ่มอัตราการไหลทีละ 0.1-0.2 มิลลิลิตรต่อนาที จนถึง 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำประมาณ 15-20 นาที หรือจนกว่าสัญญาณนิ่ง[1]
- ค่อยๆลดอัตราการไหลทีละ 0.1-0.2 มิลลิลิตรต่อนาที จนเป็น 0 มิลลิลิตรต่อนาที
- เปลี่ยนน้ำเป็นเมธานอล
- ไล่ฟองอากาศออกจนหมดจาก pump
- ค่อยๆเพิ่มอัตราการไหลทีละ 0.1-0.2 มิลลิลิตรต่อนาทีจนถึง 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- ล้างคอลัมน์ด้วยเมธานอลประมาณ 10-15 นาที หรือจนกว่าสัญญาณนิ่ง[1]
- ค่อยๆลดอัตราการไหลทีละ 0.1-0.2 มิลลิลิตรต่อนาที จนเป็น 0 มิลลิลิตรต่อนาที

หมายเหตุ

1. ถ้าเกิดปัญหา ให้ตรวจสอบความผิดปกติ และแก้ไข HPLC เบื้องต้น

(เอกสารประกอบ 9)

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง การเก็บรักษา HPLC	SOP No. 7 วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../..... หน้า 4 ของ 5 หน้า

6.2 ปิดทุกส่วนของ HPLC

6.2.1 autoinjector[1]

- กดปุ่ม power ของ autoinjector

6.2.2 pump[1]

- กดปุ่ม power ของ pump

6.2.3 UV- detector[1]

- กดปุ่ม power ของ UV- detector

6.2.4 data station หรือ integrator[1]

6.2.4.1 data station (วิธีปรับ แล้วแต่เครื่อง HPLC)

- ปิด software ในโปรแกรมคอมพิวเตอร์

6.2.4.2 integrator

- กดปุ่ม power ของ integrator

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	
เรื่อง **การเก็บรักษา HPLC**	SOP No. 7
	วันที่มีผลบังคับใช้ จาก...../...../..... ถึง ...../...../.....
	หน้า 5 ของ 5 หน้า

6.2.5 ปิด HPLC

- ถ้ามีโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ให้ปิดโปรแกรมคอมพิวเตอร์
- กดปุ่ม power ของ stabilizer หรือปลดปลั๊ก HPLC
- ลงบันทึกอายุของ lamp ของ UV-detector และความดันของเครื่องในตารางประวัติการใช้ HPLC (เอกสารประกอบ 1)
- กรณีที่ต้องการถอดคอลัมน์ออก ให้ถอด guard column และ HPLC column ออกจากเครื่อง HPLC จากนั้นใช้จุกปิดหัวและท้ายของทั้ง 2 คอลัมน์ และเก็บในกล่องที่มีฟองน้ำรองกันกระแทก

7. เอกสารประกอบ

เอกสารประกอบ 1 ตารางประวัติการใช้ HPLC

เอกสารประกอบ 9 การตรวจสอบความผิดปกติ และแนวทางแก้ไขปัญหา HPLC เบื้องต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารประกอบ 1

เรื่อง ตารางประวัติการใช้ HPLC

ตารางประวัติการใช้ HPLC.....

วัน/เดือน/ปี	สภาวะ HPLC			ความดัน			อายุ lampของ UV-detector (ชั่วโมง)	ผู้วิเคราะห์	หมายเหตุ
	คอลัมน์	โมบายเฟส	อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)	เมธานอล	น้ำ	โมบายเฟส			

เอกสารประกอบ 2

เรื่อง ตารางประวัติประสิทธิภาพคอลัมน์

ตารางประวัติประสิทธิภาพคอลัมน์.....				
วัน/เดือน/ปี	Number of theoretical plates	Asymmetry factor	ผู้วิเคราะห์	หมายเหตุ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารประกอบ 3

เรื่อง ตารางผลการเตรียมโมบายเฟส

วัน/เดือน/ปี	บัฟเฟอร์				โมบายเฟส				ผู้วิเคราะห์	หมายเหตุ
	สาร	ปริมาณ (กรัม)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	pH	ชนิด/อัตราส่วน	ปริมาตร(มิลลิลิตร)				
						อะซีโตไนไตรล์	เมธานอล	บัฟเฟอร์		

เอกสารประกอบ 4

เรื่อง ตารางผลการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน

ตารางผลการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน.....

วัน/เดือน/ปี.....

ผู้วิเคราะห์.....

ความเข้มข้น(มคก/มล)							หมายเหตุ
พื้นที่ภายใต้พีคของยา หรือสาร.....							
พื้นที่ภายใต้พีคของสารมาตรฐานภายใน							
อัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค							

สมการของกราฟเทียบมาตรฐาน; Y =.....X +.....

โดย Y =อัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค

X = ความเข้มข้นของยา หรือสาร (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารประกอบ 5

เรื่อง ตารางผลการตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน

ตารางผลการตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน.....

วัน/เดือน/ปี.....

ผู้วิเคราะห์.....

สมการของกราฟเทียบมาตรฐานที่ตรวจสอบประสิทธิภาพ;

Y=.....X +.....

โดย Y =อัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค

X = ความเข้มข้นของยา หรือสาร (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

การตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน

วัน/เดือน/ปี								
ความเข้มข้น(มคก/มล)								
พื้นที่ภายใต้พีคของยา หรือสาร								
พื้นที่ภายใต้พีคของสารมาตรฐานภายใน								
อัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค								
ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้								
ผล(ผ่าน/ ไม่ผ่าน)								

เอกสารประกอบ 6

เรื่อง ใบรับ และแจ้งผลการการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา

ใบรับ และแจ้งผลการการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา
หมายเลขประจำตัวของผู้ป่วย.....ชื่อ/นามสกุล..... ประวัติการใช้ยา ....
1. ส่งวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา วัน/เดือน/ปี.....เวลา..... ❑ ธีโอฟิลลีน ❑ แคฟเฟอีน ❑ เฟนิโทอิน ❑ ฟีโนบาร์บิทอล ❑ แวนโคมัยซิน 2. ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา วัน/เดือน/ปี..... เวลา..... ความเข้มข้นจากการวิเคราะห์.....ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 3. ถ้าต้องการยืนยันผลการวิเคราะห์ใหม่ ต้องแจ้งภายใน วัน/เดือน/ปี..... 4. แจ้งสาเหตุเมื่อไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาได้..... ..... ผู้วิเคราะห์.....

เอกสารประกอบ 7

เรื่อง ตารางผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา

ตารางผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของยา หรือสาร..... วัน/เดือน/ปี.....

ผู้วิเคราะห์.....

กราฟเทียบมาตรฐาน; อัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค=.....ความเข้มข้น(มคก/มล) +.....

ลำดับที่	HN	ชื่อ นามสกุล	ครั้งที่	พื้นที่ภายใต้พีคยาหรือสาร	พื้นที่ภายใต้พีคสารมาตรฐานภายใน	อัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (มคก/มล)	ความเข้มข้นเฉลี่ย (มคก/มล)	หมายเหตุ
			1						
			2						
			1						
			2						
			1						
			2						

เอกสารประกอบ 8

เรื่อง ตารางผลการเตรียมสารละลาย

ตารางผลการเตรียมสารละลาย				
วัน/เดือน/ปี	สาร	ปริมาณ(กรัม)	ผู้เตรียม	หมายเหตุ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารประกอบ 9

เรื่อง การตรวจสอบความผิดปกติ และแนวทางแก้ไขปัญหา HPLC เบื้องต้น

ปัญหา	สาเหตุ	แนวทางแก้ไข
1.ความดันสูงอย่างรวดเร็ว	1. HPLC column เสีย	1. เปลี่ยน HPLC column ใหม่
2. ความดันสูงขึ้นอย่างช้าๆ	1. guard column หรือ HPLC column อุดตัน	1. ถอด guard column ออก ให้เหลือแต่ HPLC column สังเกตความดัน ถ้าความดันลดลง แสดงว่า guard column อุดตัน ควรเปลี่ยน guard column ใหม่ ถ้าความดันไม่ลด แสดงว่า HPLC column อุดตัน ให้เปลี่ยน frit ของ HPLC column อันใหม่ แต่หากไม่มี frit ให้เปลี่ยน ให้กลับหัว HPLC column แล้วล้างด้วยเมธานอล, น้ำ และกลับไปที่เมธานอล ตามลำดับ โดยแต่ละโมบายเฟสที่ใช้ล้าง ต้องล้างจนสัญญาณนิ่ง สังเกตโครมาโตแกรมว่ามีสารใดออกไหม ตลอดจนความดันเปลี่ยนแปลงหรือไม่ หลังจากนั้นหาประสิทธิภาพ HPLC column ถ้าประสิทธิภาพ HPLC column ยังดีอยู่ แสดงว่า HPLC column ยังสามารถใช้ต่อไป แต่หากประสิทธิภาพ HPLC column ไม่ดี ควรเปลี่ยนคอลัมน์ใหม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัญหา	สาเหตุ	แนวทางแก้ไข
3. ความดันต่ำหรือไม่มีความดัน	1. รั่วที่ pump หรือรอยต่อตรง column	1. หาบริเวณที่รั่ว 2. ถ้าเป็นที่ pump ที่ pump จะเปียก หรือมีคราบเกลือติดอยู่ แสดงว่า รั่วที่ pump ควรแจ้งให้ช่างซ่อม 3. ถ้าเป็นที่รอยต่อตรงคอลัมน์ ที่รอยต่อคอลัมน์ จะเปียก ให้ถอด และต่อคอลัมน์ใหม่
	2. การไหลโมบายเฟสมีปัญหา	1. ตรวจสอบระดับโมบายเฟสในขวดว่าหมดหรือไม่ ถ้าใกล้หมดให้เปลี่ยนโมบายเฟสทันที 2. สังเกตการไหล และอัตราการไหลของโมบายเฟสผิดปกติไหม ถ้ามีความผิดปกติ ควรอ่านคู่มือของเครื่อง HPLC และแจ้งให้ช่างซ่อม
4. ความดันแกว่ง	1. มีฟองอากาศค้างที่หัว pump หรือสายส่งโมบายเฟส	1. ไล่ฟองอากาศออกจากหัว pump และสายส่งโมบายเฟส
5. มีสัญญาณรบกวนในโครมาโตแกรม	1. lamp ของ detector หมดอายุ	1. ตรวจสอบอายุของ lamp และถ้าหมดอายุ ควรแจ้งให้ช่างเปลี่ยน lamp ใหม่
	2. คอลัมน์ยังไม่อยู่ในสภาวะสมดุล	1. รอจนกว่าคอลัมน์อยู่ในสภาวะสมดุล
	3. โมบายเฟสเตรียมผิด หรือมีสารปนเปื้อน	1. ตรวจสอบการเตรียมโมบายเฟส และเตรียมโมบายเฟสใหม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัญหา	สาเหตุ	แนวทางแก้ไข
6. เวลาที่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์เปลี่ยนแปลงจากเดิม	1. คอลัมน์ยังไม่อยู่ในสภาวะสมดุล	1. รอจนกว่าคอลัมน์อยู่ในสภาวะสมดุล
	2. โมบายเฟสเตรียมผิด	1. ตรวจสอบการเตรียมโมบายเฟสและเตรียมโมบายเฟสใหม่
	3. รั่วที่ pump หรือรอยต่อตรงคอลัมน์	1. หาบริเวณที่รั่ว 2. ถ้าเป็นที่ pump ที่ pump จะเปียก หรือมีคราบเกลือติดอยู่ แสดงว่า รั่วที่ pump ควรแจ้งให้ช่างซ่อม 3. ถ้าเป็นที่รอยต่อตรงคอลัมน์ที่รอยต่อคอลัมน์ จะเปียก ให้ถอดและต่อคอลัมน์ใหม่
	4. อัตราการไหลตั้งผิด หรือค่าไม่ตรงกับที่ต้องตั้ง	1. ตั้งอัตราการไหลให้ถูกต้อง 2. ตรวจสอบอัตราการไหลของโมบายเฟสที่ไหลตรงกับค่าที่ตั้งไหม 3. ถ้าอัตราการไหลของโมบายเฟสที่ไหลไม่ตรงกับค่าที่ตั้ง ควรแจ้งให้ช่างซ่อม
7. พีคหาย/เล็กลง	1. สารที่ฉีดเสื่อมสภาพ	1. ตรวจสอบวิธีเก็บ และระยะเวลาเก็บสารดังกล่าว
	2. ตั้งความยาวคลื่นในการวิเคราะห์ผิด	1. ตั้งความยาวคลื่นให้ถูกต้อง
	3. lamp ของ detector หมดอายุ	1. ตรวจสอบอายุของ lamp และถ้าหมดอายุ ควรแจ้งให้ช่างเปลี่ยน lamp ใหม่
	4. เกิดปัญหาที่ autoinjector	1. ถ้าปริมาตรที่ดูดไม่ถูกต้อง ให้ไล่ฟองอากาศออกจากเข็มและท่อของ autoinjector ถ้ายังไม่ดีขึ้น ควรแจ้งให้ช่างซ่อม

ปัญหา	สาเหตุ	แนวทางแก้ไข
8. พีคมีไหล่ หรือแตกเป็น 2 พีค	1. autoinjector สั่งฉีด 2 จังหวะ	1. ตรวจสอบว่าเข็มตันไหม ถ้าเข็มตัน ควรแจ้งให้ช่างซ่อม ถ้าไม่ตัน ให้สั่งฉีดสารใหม่ ตรวจสอบขั้นตอนการฉีดเมื่อเข็มอยู่ ณ ตำแหน่งต่างๆ และสังเกตความดันว่าเปลี่ยนแปลงหรือไม่ในขณะฉีดสาร 2. ถ้าเครื่องสั่งฉีด 2 จังหวะ ควรแจ้งให้ช่างซ่อม
	2. HPLC column หรือ guard column สกปรก	1. ถอด guard column ออกจากเครื่อง และสั่งฉีดสารใหม่ ถ้าพีคไม่มีไหล่ หรือแตกเป็น 2 พีค แสดงว่า guard column สกปรก ให้เปลี่ยน guard column ใหม่ ถ้าพีคมีไหล่ หรือแตกเป็น 2 พีค แสดงว่า HPLC column สกปรก ให้หาประสิทธิภาพ HPLC column ตลอดทั้งสังเกตรูปร่างของพีค และเวลาที่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ เปรียบเทียบประสิทธิภาพ HPLC column ครั้งใหม่กับครั้งเก่า ถ้าประสิทธิภาพ HPLC column เปลี่ยนแปลงไม่มาก ให้ล้างด้วยเมธานอล และน้ำ จน HPLC column สะอาด แต่หากประสิทธิภาพ HPLC column เปลี่ยนแปลงมาก ให้เปลี่ยน HPLC columnใหม่
9. ประสิทธิภาพการแยกของคอลัมน์ลดลง	1. โมบายเฟสเตรียมผิด	1. ตรวจสอบการเตรียมโมบายเฟส และเตรียมโมบายเฟสใหม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัญหา	สาเหตุ	แนวทางแก้ไข
9. ประสิทธิภาพการแยกของคอลัมน์ลดลง	2. HPLC column สกปรก	1. หาประสิทธิภาพ HPLC column และเปรียบเทียบประสิทธิภาพ HPLC column ครั้งใหม่กับครั้งเก่า ถ้าประสิทธิภาพ HPLC column เปลี่ยนแปลงไม่มาก ให้ล้างด้วยเมธานอล และน้ำ จน HPLC column สะอาด แต่หากประสิทธิภาพ HPLC column เปลี่ยนแปลงมาก ให้เปลี่ยน HPLC column ใหม่
10. ไม่แสดงโครมาโตแกรมที่ data station หรือ integrator	1. สัญญาณจาก detector ไม่เข้าที่คอมพิวเตอร์ หรือ integrator	1. ตรวจสอบปลั๊กระหว่าง detector กับคอมพิวเตอร์ หรือ integrator ถ้าไม่ดีขึ้น ควรปรึกษาช่างซ่อม
11. เครื่องHPLC ไฟฟ้าไม่ติด	1. ไฟฟ้าไม่เข้า	1. ลองขยับปลั๊กของเครื่อง HPLC 2. stabilizer เสีย แจ้งให้ช่างซ่อม 3. ฟิลว์ขาด แจ้งให้ช่างซ่อม
12. อาการอื่นๆ	1. อ่านคู่มือของเครื่อง HPLC หรือหนังสือที่เกี่ยวข้องกับ HPLC ในส่วน Troubleshooting 2. ปรึกษาช่างซ่อม	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารประกอบ 10

เรื่อง การหาประสิทธิภาพคอลัมน์

การหาประสิทธิภาพคอลัมน์ มีขั้นตอนการทำ ดังนี้

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานอะเซเนฟทรีนในอะซีโตไนตรล์ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
2. เตรียมโมบายเฟส; อะซีโตไนไตรล์: น้ำ (70:30 อัตราส่วนโดยปริมาตร)
3. ตั้งสภาวะทาง HPLC ดังนี้

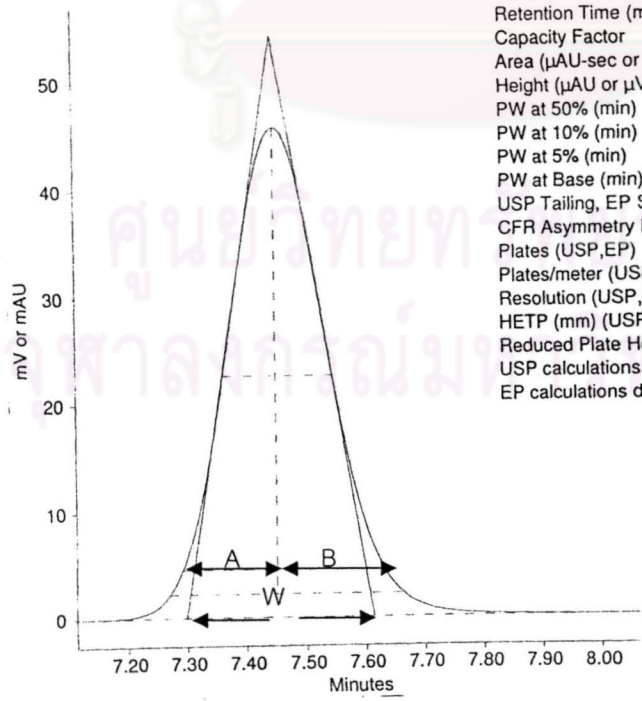
   คอลัมน์; คอลัมน์ที่ต้องการตรวจสอบ

   โมบายเฟส; อะซีโตไนไตรล์: น้ำ (70:30 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

   อัตราการไหล; 1 มิลลิลิตรต่อนาที

   ความยาวคลื่น; 254 นาโนเมตร

4. ฉีดสารละลายมาตรฐานอะเซเนฟทรีน ในอะซีโตไนตรล์ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เข้า HPLC 3 ครั้ง
5. คำนวณหาค่า number of theoretical plates (N), asymmetry factor (As) ทั้ง 3 โครมาโตแกรม จากเครื่อง HPLC หรือคำนวณด้วยตนเอง



Name	acenapthene
Retention Time (min)	7.452
Capacity Factor	N/A
Area (µAU-sec or µV-sec)	538730
Height (µAU or µV)	45718
PW at 50% (min)	0.182
PW at 10% (min)	0.339
PW at 5% (min)	0.392
PW at Base (min)	0.315
USP Tailing, EP Symmetry Factor	1.0870, 1.0870
CFR Asymmetry Factor (10%)	1.0674
Plates (USP,EP)	8947, 9324
Plates/meter (USP,EP)	35787, 37296
Resolution (USP,EP)	2.12, 2.19
HETP (mm) (USP,EP)	0.0279, 0.0268
Reduced Plate Height (USP,EP)	2.79, 2.68

USP calculations done by tangent method
EP calculations done by halfwidth method

number of theoretical plates = $16(tr/W)^2$

asymmetry factor = B/A ทั้ง 2 ค่าไม่มีหน่วย

โดยที่ tr = เวลาที่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ของอะเซเนฟทรีน

W = ความกว้างของฐานพีคที่ตำแหน่งของความสูงที่กำหนด

B = ความกว้างที่แท้จริงของฐานพีคด้านขวา ที่ 10 %ของความสูงของพีค

A = ความกว้างที่แท้จริงของฐานพีคด้านซ้าย ที่ 10 %ของความสูงของพีค

6. ลงบันทึกค่า number of theoretical plates และ asymmetry factor ในตาราง ประวัติประสิทธิภาพคอลัมน์ (เอกสารประกอบ 2)

7. เปรียบเทียบค่า number of theoretical plates ที่หาได้กับค่าที่ได้รับจากใบรับรองของบริษัท หรือเปรียบเทียบกับค่าที่หาได้ในครั้งก่อน

8. ประเมินค่า asymmetry factor ที่หาได้ โดย asymmetry factor ควรอยู่ในช่วง 0.95- 1.10 ซึ่งถือเป็นช่วงที่พีคสมมาตร และถ้าค่าดังกล่าวออกนอกช่วงนี้ แสดงถึงพีคไม่สมมาตร อาจมีการเอียงของพีคทางด้านขวา หรือซ้ายเกิดขึ้น

9. ในกรณีที่บริษัทหาค่า number of theoretical plates และ asymmetry factor จากสารมาตรฐาน หรือสภาวะทาง HPLC ที่แตกต่างจากขั้นตอนการทำนี้ ควรทำตามขั้นตอนของบริษัท เพื่อสามารถเปรียบเทียบค่าทั้ง 2 ว่าตรงกับที่บริษัทแจ้งหรือไม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารประกอบ 11

เรื่อง คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ

อุปกรณ์ /เครื่องมือ	คำแนะนำ
Autopipet	1. เลือกใช้ชนิด และขนาดให้เหมาะสมกับปริมาตรที่ต้องการดูด 2. autopipet ที่ใช้ ต้องผ่านสอบเทียบแล้ว และควรสอบเทียบด้วยน้ำเป็นระยะๆ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาตรที่ปิเปตได้กับน้ำหนักที่ชั่งได้ของน้ำ ถ้ามีความแตกต่างกัน ควรส่งให้ช่างซ่อม เพื่อแก้ไข และสอบเทียบใหม่ 3. ถ้ามีความผิดปกติใดๆ ควรปรึกษาช่างซ่อม
pH-meter	1. ก่อนใช้ pH-meter ทุกครั้งต้องสอบเทียบทุกครั้ง 2. สารละลายมาตรฐานที่ใช้สอบเทียบ ต้องหายเย็นก่อนนำมาใช้ 3. ก่อนใช้ pH-meter ต้องตรวจสอบสารละลายอิเล็คโตรไลท์ ภายใน eletrode ว่ามีปริมาตรเพียงพอหรือไม่ ถ้าไม่เพียงพอ ให้เติมสารละลายอิเล็คโตรไลท์ลงไป 4. ถ้าเครื่องสอบเทียบไม่ผ่าน ควรอ่านคู่มือการใช้เครื่อง และปรึกษาช่างซ่อม
Microcentrifuge /Centrifuge	1. การวางหลอดในตัวเครื่อง ต้องคำนึงถึงความสมดุลของเครื่อง โดยวางหลอดที่มีน้ำหนักเท่ากัน ตรงข้ามกัน 2. ถ้าเครื่องไม่ทำงาน ควรตรวจสอบความสมดุลของเครื่องเป็นสิ่งแรก แต่ถ้ามีความผิดปกติเนื่องจากสาเหตุอื่นๆ ควรอ่านคู่มือการใช้เครื่อง และปรึกษาช่างซ่อม
เครื่องชั่ง	1. ต้องตรวจสอบความสมดุลของเครื่องชั่งก่อนใช้ ถ้าไม่สมดุล ต้องปรับให้เครื่องชั่งอยู่ในสภาวะสมดุลก่อนชั่ง 2. ก่อน และหลังชั่ง ควรทำความสะอาดเครื่องชั่งเสมอ 3. ถ้าเครื่องชั่งมีปัญหา ควรอ่านคู่มือการใช้เครื่อง และปรึกษาช่างซ่อม
Vortex-mixer	1. ถ้าเครื่องไม่ทำงานมักเกิดจากไฟฟ้าไม่เข้า ควรลองขยับปลั๊กดู ถ้าไม่ดีขึ้น ควรส่งช่างตรวจสอบ

เอกสารประกอบ 12

เรื่อง การเตรียมสารละลายต่างๆในการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1.1 สารละลายมาตรฐานที่ใช้เป็นสต็อก (ธีโอฟิลลีน, แคฟเฟอีน, เฟนิโทอิน, ฟีโนบาร์บิทอล, แวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน)
ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- วิธีเตรียม ชั่งยา หรือสาร 10.00 มิลลิกรัม ใส่ฟลาสค์วัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเมธานอลไปเล็กน้อย เขย่าจนละลายหมด ปรับปริมาตรด้วยเมธานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร ปิดจุกและเขย่าให้สารละลายเข้ากัน
- สารละลายธีโอฟิลลีน, แคฟเฟอีน, เฟนิโทอิน, ฟีโนบาร์บิทอล, แวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในเมธานอล ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถคงตัวในช่องแช่แข็งของตู้เย็น (-18±3°C) ได้ 90, 90, 90, 90, 40 และ 60 วัน ตามลำดับ

1.2 สารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ (ธีโอฟิลลีน, แคฟเฟอีน, เฟนิโทอิน, ฟีโนบาร์บิทอล, แวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน) ความเข้มข้น 10, 25, 50, 80, 100, 160, 200, 320, 400และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2.1 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- วิธีเตรียม นำสารละลายยา หรือสารในเมธานอล 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าจนสารละลายเข้ากัน ปิเปต 5 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสค์วัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมธานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร ปิดจุกและเขย่าให้สารละลายเข้ากัน

1.2.2 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- วิธีเตรียม นำสารละลายยา หรือสารในเมธานอล 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าจนสารละลายเข้ากัน ปิเปต 4 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสค์วัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมธานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร ปิดจุกและเขย่าให้สารละลายเข้ากัน

1.2.3 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 320 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- วิธีเตรียม นำสารละลายยา หรือสารในเมธานอล 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าจนสารละลายเข้ากัน ปิเปต 4 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสค์วัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมธานอลจนครบ 5 มิลลิลิตร ปิดจุกและเขย่าให้สารละลายเข้ากัน

1.2.4 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- วิธีเตรียม นำสารละลายยา หรือสารในเมธานอล 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าจนสารละลายเข้ากัน ปิเปต 5 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสค์วัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมธานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร ปิดจุกและเขย่าให้สารละลายเข้ากัน

1.2.5 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- วิธีเตรียม นำสารละลายยา หรือสารในเมธานอล 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าจนสารละลายเข้ากัน ปิเปต 4 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสค์วัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมธานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร ปิดจุกและเขย่าให้สารละลายเข้ากัน

1.2.6 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- วิธีเตรียม นำสารละลายยา หรือสารในเมธานอล 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าจนสารละลายเข้ากัน ปิเปต 5 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสค์วัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมธานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร ปิดจุกและเขย่าให้สารละลายเข้ากัน

1.2.7 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- วิธีเตรียม นำสารละลายยา หรือสารในเมธานอล 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าจนสารละลายเข้ากัน ปิเปต 4 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสค์วัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมธานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร ปิดจุกและเขย่าให้สารละลายเข้ากัน

1.2.8 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- วิธีเตรียม นำสารละลายยา หรือสารในเมธานอล 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าจนสารละลายเข้ากัน ปิเปต 5 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสค์วัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมธานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร ปิดจุกและเขย่าให้สารละลายเข้ากัน

1.2.9 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- วิธีเตรียม นำสารละลายยา หรือสารในเมธานอล 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าจนสารละลายเข้ากัน ปิเปต 5 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสค์วัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมธานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร ปิดจุกและเขย่าให้สารละลายเข้ากัน

1.2.10 สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

- วิธีเตรียม นำสารละลายยา หรือสารในเมธานอล 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าจนสารละลายเข้ากัน ปิเปต 1 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสค์วัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมธานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร ปิดจุกและเขย่าให้สารละลายเข้ากัน
- สารละลายธีโอฟิลลีน, แคฟเฟอีน, เฟนิโทอิน, ฟีโนบาร์บิทอล, แวนโคมัยซิน และเบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีนในเมธานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ใช้ในการวิเคราะห์ สามารถคงตัวในช่องแช่แข็งของตู้เย็น (-18±3°C)ได้ 90, 90, 60, 60, 90 และ 60 วัน ตามลำดับ

2. การเตรียมโมบายเฟส

2.1 โมบายเฟสของการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา

2.1.1 อะซีเตด บัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ pH 3.50

- วิธีเตรียม ซั่งโซเดียม อะซีเตด 0.8204 กรัม ละลายในน้ำในปริมาตร 990 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วยกรดอะซีติด จนได้ pH 3.50 และปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

2.1.2 โมบายเฟส; อะซีโตไนไตรล์: เมธานอล: อะซีเตด บัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ pH 3.50 (7:6:87 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

- วิธีเตรียม ตวงอะซีเตด บัฟเฟอร์ 0.01 M pH 3.50 ที่ปริมาตร 870 มิลลิลิตร, อะซีโตไนไตรล์ที่ปริมาตร 70 มิลลิลิตร และเมธานอลที่ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสค์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปกรองด้วย nylon membrane filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรู 0.45 ไมโครเมตร และไล่ฟองอากาศด้วยการ sonicate 20 นาที

2.2 โมบายเฟสของการวิเคราะห์เฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอลในพลาสมา

2.2.1 ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 6.00

- วิธีเตรียม ซั่งโปแตสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต 5.9403 กรัม และไดโปแตสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต 1.0888 กรัม ละลายในน้ำและปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1,000 มิลลิลิตร และปรับ pH ด้วยโปแตสเซียม ไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล จนได้ pH 6.00

2.2.2 โมบายเฟส ; อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 6.00 (36:64 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

- วิธีเตรียม ตวงฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 6.00 ที่ปริมาตร 640 มิลลิลิตร และอะซีโตไนไตรล์ที่ปริมาตร 360 มิลลิลิตร ใส่ฟลาสค์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย nylon membrane filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรู 0.45 ไมโครเมตร และไล่ฟองอากาศด้วยการ sonicate 20 นาที

2.3 โมบายเฟสของการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา

2.3.1 ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.50

- วิธีเตรียม ซั่งโปแตสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต 6.8050 กรัม ละลายในน้ำ ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1,000 มิลลิลิตร และปรับ pH ด้วยโปแตสเซียม ไฮดรอกไซด์ 1นอร์มอล จนได้ pH 4.50

2.3.2 โมบายเฟส; อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.50 (8:92 อัตราส่วนโดยปริมาตร)

- วิธีเตรียม ตวงฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.50 ที่ปริมาตร 920 มิลลิลิตร และอะซีโตไนไตรล์ที่ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ใส่ฟลาลค์ 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองด้วย nylon membrane filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรู 0.45 ไมโครเมตร และไล่ฟองอากาศด้วยการ sonicate 20 นาที
- ข้อควรระวังในการเตรียมโมบายเฟสของการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา คือ ขณะตวงฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.50 ต้องรอให้ฟองอากาศหมดก่อน จึงปรับปริมาตรที่ตวงให้ถูกต้อง

3. การเตรียมสารละลายต่างๆในการวิเคราะห์

3.1 สารละลายซิงค์ ซัลเฟตในน้ำ 10%(น้ำหนักต่อปริมาตร)

- วิธีเตรียม ชั่งซิงค์ ซัลเฟต 5 กรัม ละลายในน้ำและปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 50 มิลลิลิตร

3.2 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติดในน้ำ 10%(น้ำหนักต่อปริมาตร)

- วิธีเตรียม ตักกรดไตรคลอโรอะซีติด ด้วยช้อนที่ทำด้วย stainless 10 กรัมใน บีกเกอร์ ค่อยๆเติมน้ำไปละลายกรดจนหมด และปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 10 มิลลิลิตร

3.3 ไดโปแตสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟตในน้ำ 0.1 โมลาร์

- วิธีเตรียม ชั่งไดโปแตสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต 0.8709 กรัม ละลายในน้ำ และปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 50 มิลลิลิตร

3.4 สารละลายโปแตสเซียม ไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล

- วิธีเตรียม ชั่งโปแตสเซียม ไฮดรอกไซด์ 5.6 กรัม ละลายในน้ำและปรับปริมาตร ด้วยน้ำจนครบ 100 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารประกอบ 13

เรื่อง ลำดับกระบวนการวิเคราะห์ในแต่ละวันด้วย HPLC

ลำดับกระบวนการวิเคราะห์ในแต่ละวันด้วย HPLC มีดังนี้

เตรียม HPLC ให้พร้อมในการปฏิบัติงานในแต่ละวันตาม SOP No.1

↓

ตรวจสอบกราฟเทียบมาตรฐานของยาแต่ละตัว และแคฟเฟอีนในพลาสมาว่ามีหรือไม่
และหากมีกราฟเทียบมาตรฐานดังกล่าวให้ตรวจสอบว่าหมดระยะเวลาในการใช้งานหรือไม่

↓

หากไม่มีกราฟเทียบมาตรฐาน หรือหมดระยะเวลาในการใช้งาน
ให้สร้างกราฟเทียบมาตรฐานใหม่ตาม SOP No.2

↓

เมื่อมีตัวอย่างพลาสมาส่งมาวิเคราะห์

↓

ให้รอรับ แบ่งบรรจุ และเก็บรักษาตัวอย่างพลาสมาให้เหมาะสมตาม SOP No.3

↓

เตรียมตัวอย่างพลาสมาของพลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน
และตัวอย่างพลาสมาตาม SOP No.4

↓

วิเคราะห์พลาสมาที่ใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน
และตัวอย่างพลาสมาด้วย HPLC ตาม SOP No.5

↓

หาปริมาณยา หรือแคฟเฟอีนในตัวอย่างพลาสมา และแจ้งผลการวิเคราะห์
ตัวอย่างพลาสมาแก่ผู้ส่งตัวอย่างพลาสมาตาม SOP No.6

↓

รอการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาในครั้งต่อไป

↓

แต่ถ้าไม่มีตัวอย่างพลาสมาส่งมาวิเคราะห์ และ
เมื่อสิ้นสุดการปฏิบัติงานในแต่ละวัน ให้เก็บรักษา HPLC ตาม SOP No.7

3. **การทดลองปฏิบัติตามมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ**

เมื่อให้บุคคล 2 คนที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการศึกษานี้ มาลองปฏิบัติตามมาตรฐานวิธีการปฏิบัติที่สร้างขึ้น เพื่อประเมินการใช้มาตรฐานวิธีการปฏิบัติดังกล่าว โดยผู้ประเมินทั้ง 2 คน มีคุณสมบัติเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด คือ มีความรู้ความเข้าใจในการวิเคราะห์ทั่วไป และสามารถใช้เครื่อง HPLC ได้ สำหรับผู้ประเมินคนแรก เป็นคนที่มีประสบการณ์การวิเคราะห์งานในด้านนี้มากกว่า 6 เดือน ส่วนผู้ประเมินคนที่ 2 เป็นคนที่มีประสบการณ์การวิเคราะห์งานในด้านนี้น้อยกว่า 1 เดือน จนอาจถือว่าไม่มีประสบการณ์

จากการทดลองปฏิบัติตาม ผลปรากฏว่า ทั้ง 2 คน ล้วนแต่สามารถปฏิบัติตามมาตรฐานวิธีการปฏิบัติดังกล่าวได้ ดังแสดงในตารางที่ 70 และ 71 ตามลำดับ นอกจากนี้ทั้ง 2 คนยังสามารถวิเคราะห์ยาแต่ละตัว รวมทั้งแคฟเฟอีนในแบลงค์พลาสมาได้ถูกต้อง โดยค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ของทั้ง 2 คน มีค่า %bias อยู่ในช่วง $\pm$15% ดังแสดงในตารางที่ 72

จากผลการทดลองปฏิบัติ ได้แสดงให้เห็นว่า บุคคลที่มีความรู้ความเข้าใจในการวิเคราะห์ทั่วไป โดยเฉพาะบุคคลที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ ที่สถานพยาบาล น่าจะนำมาตรฐานวิธีการปฏิบัติที่จัดทำขึ้นนี้ไปใช้ได้ ตลอดทั้งวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาได้ถูกต้อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 70 ผลการประเมินการปฏิบัติตามมาตรฐานวิธีการปฏิบัติในการวิเคราะห์ยา และแคฟเฟอีนในพลาสมา ของผู้ประเมินที่มีประสบการณ์ในการวิเคราะห์สารต่างๆในพลาสมา

ผลการประเมินการปฏิบัติตามมาตรฐานวิธีการปฏิบัติในการวิเคราะห์ ผู้ประเมิน นางสาวแคทลียา นิรังสรรค์			
หัวข้อประเมิน	ใช้ได้	ควรปรับปรุง	ใช้ไม่ได้
SOP No.1 การเตรียมความพร้อม HPLC	✓		
SOP No.2 การสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน	✓		
SOP No.3 การรับ แบ่งบรรจุ และเก็บรักษาตัวอย่างพลาสมา	✓		
SOP No.4 การเตรียมตัวอย่างพลาสมา	✓		
SOP No.5 การวิเคราะห์ด้วย HPLC	✓		
SOP No.6 การหาปริมาณยา หรือแคฟเฟอีนในตัวอย่างพลาสมา	✓		
SOP No.7 การเก็บรักษา HPLC	✓		
เอกสารประกอบ 1 ตารางประวัติการใช้ HPLC	✓		
เอกสารประกอบ 2 ตารางประวัติประสิทธิภาพคอลัมน์	✓		
เอกสารประกอบ 3 ตารางผลการเตรียมโมบายเฟส	✓		
เอกสารประกอบ 4 ตารางผลการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน	✓		
เอกสารประกอบ 5 ตารางผลการตรวจสอบประสิทธิกราฟเทียบมาตรฐาน	✓		
เอกสารประกอบ 6 ใบรับ และแจ้งผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา	✓		
เอกสารประกอบ 7 ตารางผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา	✓		
เอกสารประกอบ 8 ตารางผลการเตรียมสารละลาย	✓		
เอกสารประกอบ 9 การตรวจสอบความผิดปกติ และแนวทางแก้ไขปัญหา HPLCเบื้องต้น	✓		
เอกสารประกอบ 10 การหาประสิทธิภาพคอลัมน์	✓		
เอกสารประกอบ 11 คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ	✓		
เอกสารประกอบ 12 การเตรียมสารละลายต่างๆในการวิเคราะห์	✓		
เอกสารประกอบ 13 ลำดับกระบวนการวิเคราะห์ด้วย HPLC ในแต่ละวัน	✓		
ข้อเสนอแนะ ควรระบุจำนวนทศนิยมที่ใช้ในการวิเคราะห์ให้ชัดเจน ทั้งในการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน และการคำนวณหาความเข้มข้นของยา หรือสารในตัวอย่างพลาสมา			

ตารางที่ 71 ผลการประเมินการปฏิบัติตามมาตรฐานวิธีการปฏิบัติในการวิเคราะห์ยา และแคฟเฟอีนในพลาสมา ของผู้ประเมินที่ไม่มีประสบการณ์ในการวิเคราะห์สารต่างๆในพลาสมา

ผลการประเมินการปฏิบัติตามมาตรฐานวิธีการปฏิบัติในการวิเคราะห์ ผู้ประเมิน นางสาววรรณา ธนลาภนนท์			
หัวข้อประเมิน	ใช้ได้	ควรปรับปรุง	ใช้ไม่ได้
SOP No.1 การเตรียมความพร้อม HPLC	✓		
SOP No.2 การสร้าง และตรวจสอบประสิทธิภาพกราฟเทียบมาตรฐาน	✓		
SOP No.3 การรับ แบ่งบรรจุ และเก็บรักษาตัวอย่างพลาสมา	✓		
SOP No.4 การเตรียมตัวอย่างพลาสมา	✓		
SOP No.5 การวิเคราะห์ด้วย HPLC	✓		
SOP No.6 การหาปริมาณยา หรือแคฟเฟอีนในตัวอย่างพลาสมา	✓		
SOP No.7 การเก็บรักษา HPLC	✓		
เอกสารประกอบ 1 ตารางประวัติการใช้ HPLC	✓		
เอกสารประกอบ 2 ตารางประวัติประสิทธิภาพคอลัมน์	✓		
เอกสารประกอบ 3 ตารางผลการเตรียมโมบายเฟส	✓		
เอกสารประกอบ 4 ตารางผลการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน	✓		
เอกสารประกอบ 5 ตารางผลการตรวจสอบประสิทธิกราฟเทียบมาตรฐาน	✓		
เอกสารประกอบ 6 ใบรับ และแจ้งผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา		✓	
เอกสารประกอบ 7 ตารางผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา	✓		
เอกสารประกอบ 8 ตารางผลการเตรียมสารละลาย	✓		
เอกสารประกอบ 9 การตรวจสอบความผิดปกติ และแนวทางแก้ไขปัญหา HPLCเบื้องต้น	✓		
เอกสารประกอบ 10 การหาประสิทธิภาพคอลัมน์	✓		
เอกสารประกอบ 11 คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ	✓		
เอกสารประกอบ 12 การเตรียมสารละลายต่างๆในการวิเคราะห์	✓		
เอกสารประกอบ 13 ลำดับกระบวนการวิเคราะห์ด้วย HPLC ในแต่ละวัน	✓		
ข้อเสนอแนะ ในเอกสารประกอบ 6 ใบรับ และแจ้งผลการการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา ควรเพิ่มช่องหมายเหตุ เพื่อให้ผู้ส่งตัวอย่างพลาสมามาวิเคราะห์ ทราบถึงปัญหา ในกรณีที่ไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมานั้นได้			

ตารางที่ 72 ผลการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน เฟนิโทอิน ฟีโนบาร์บิทอล และแวนโคมัยซิน ในแบลงค์พลาสมา ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ยาและสาร	ผู้ประเมินที่มีประสบการณ์		ผู้ประเมินที่ไม่มีประสบการณ์	
	ความเข้มข้นเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)	%bias	ความเข้มข้นเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ (มคก/มล)	%bias
Theophylline	8.57	-14.28	10.56	+5.54
Caffeine	10.01	+0.13	11.39	+13.92
Phenytoin	8.66	-13.35	9.39	-6.10
Phenobarbital	9.59	-4.15	10.61	+6.15
Vancomycin	11.24	+12.39	11.08	+10.80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย