บทที่ 3

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาจะแสดงตามลำดับตัวอักษร โดยไม่คำนึงถึงระดับการจับกับพลาสมาโปรตีน และจะประมวลผลการศึกษาของยาทั้งหมดอีกครั้งหนึ่ง

สำหรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีในการวิเคราะห์ยาแต่ละตัวแสดงในตารางที่ 3 (ภาคผนวก)

อะมิโลไรด์

1. สภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์

สำหรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีที่นำมาจากวิธีวิเคราะห์ของรานิทิดีนในพลาสมาในครั้งนี้สามารถให้พีคยาที่มีรูปร่างที่เหมาะสม มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ (retention time) เหมาะสม เมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐานและสภาวะที่นำมานี้สามารถแยกพีคยาออกจาก endogenous substance ได้ดีเมื่อทดสอบกับพลาสมาที่แยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนแล้ว

2. ผลการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน

2.1 การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนละเอียดสีขาว รวมตัวกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใส

สะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร มีฐานพีคแคบ สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้ดี มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 4.89 นาทีถึง 4.92 นาที ดังแสดงในรูปที่ 1

ง. **ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน** เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการคืนกลับพบว่าค่าที่ได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา แต่มีความแปรปรวนสูง คือมีช่วงของค่าร้อยละของการคืนกลับที่กว้าง แม้ว่าค่าเฉลี่ยจะยอมรับได้ตามเกณฑ์การประเมิน ดังแสดงในตารางที่ 4

จากเหตุผลของความแปรปรวนของค่าร้อยละของการคืนกลับสูงจึงไม่ใช้เมธานอลในการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลไรด์ในพลาสมา และได้ทดสอบแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ต่อไป

สำหรับข้อสังเกตในการใช้เมธานอลในการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์อะมิโลไรด์นี้พบว่า เมื่อตั้งตัวอย่างพลาสมาที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงแล้วไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ได้แยกส่วนของสารละลายเหนือตะกอนออกเป็นเวลาประมาณ 10 นาที จะมีการฟุ้งกระจายของตะกอนพลาสมาเกิดขึ้น

2.2 <u>การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์</u>

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนเหนียว สีเหลืองอ่อน รวมตัวกันที่ก้นหลอดทดลอง ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่าหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใส

ค. ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร มีฐานพีคแคบ สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้ดี มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 7.44 นาทีถึง 7.52 นาที ดังแสดงในรูปที่ 2

ง. ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการคืนกลับพบว่าค่าที่ได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา และมีค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย 94.10 (%CV =1.93 %) ดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งผ่านเกณฑ์การประเมินผล

ดังนั้นจึงสามารถใช้อะซีโตไนไตรล์ในการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์อะมิโลไรด์ในพลาสมาได้เหมาะสมกว่าการใช้เมธานอล เนื่องจากมีค่าร้อยละของการคืนกลับในการแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสมกว่า จึงทำการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลไรด์ในพลาสมาโดยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ต่อไป

3. <u>ผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์</u>

3.1 <u>ประสิทธิภาพการวิเคราะห์</u> แสดงในรูปค่าร้อยละของการคืนกลับตามรายละเอียดในข้อ 2.2 ง.

3.2 <u>ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างค่าความสูงพีคยากับความเข้มข้นในพลาสมา</u> มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 1.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร โดยสมการเส้นตรงจาก linear regression คือ $Y = 429.69 X - 4.95$ ($r^2 = 0.9977$) เมื่อ Y เป็นความสูงพีคยา (มิลลิเมตร) และ X เป็นค่าความเข้มข้นของอะมิโลไรด์อะมิโลไรด์ในพลาสมา (ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร) ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 20 และตารางที่ 6 ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวครอบคลุมระดับความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบในร่างกาย

3.3 <u>ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์</u> เมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรม ดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าค่าเวลาที่อะมิโลไรด์ถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ในสารละลายมาตรฐาน (รูป ก.) และในพลาสมา (รูป ค.) มีค่าใกล้เคียงกัน และไม่มีการรบกวนของ endogenous substance ในพลาสมาต่อพีคยา ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้จึงมีความจำเพาะเจาะจง

3.4 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถตรวจพบพีคยา</u> จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำสุดของอะมิโลไรด์ในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2 : 1 คือ 0.0125 ไมโครกรัม ต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร (S/N ratio = 3.89 ± 0.27 ; %CV =6.93 %) ดังแสดงในตารางที่ 7

3.5 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้</u> จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในหนึ่งวันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา ค่าความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.025 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า %CV =6.04 และ 5.89 % ตามลำดับ ซึ่งถือเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของอะมิโลไรด์ในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้

3.6 <u>ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์</u> เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณที่ผ่านการประเมินจนถึงข้อ 3.5 มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา ที่มีความเข้มข้นของอะมิโลไรด์ 0.05, 0.10 และ 1.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตรความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ค่าร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 8 ซึ่งจะพบว่ามีค่าร้อยละของการคืนกลับของความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตรมีค่าสูงและยังไม่สามารถอธิบายถึงสาเหตุดังกล่าวได้ จึงไม่นำค่านี้มาคิดค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการคืนกลับ สำหรับค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยในการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ คือ 92.13 ± 3.18 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้โดยพิจารณาร่วมกับค่าร้อยละของการคืนกลับเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์

3.7 <u>ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์</u>

ก. **ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวัน** ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวันของการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลไรด์ในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.025 ถึง 1.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV อยู่ระหว่าง 0.81 ถึง 6.04 ดังแสดงในตารางที่ 9

ข. **ความเที่ยงตรงระหว่างวัน** ความเที่ยงตรงระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลไรด์ในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.025 ถึง 1.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV ของความสูงพีคอยู่ระหว่าง 1.94 ถึง 6.54 ดังแสดงในตารางที่10

ซึ่งจากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนในการวิเคราะห์มีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

จากผลการวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน และการวิเคราะห์ผลการvalidate วิธีวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลไรด์ในพลาสมา พบว่าสามารถนำหลักการแยกพลาสมาโปรตีนมาวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลไรด์ในพลาสมาได้อย่างเหมาะสม ซึ่งยังไม่พบรายงานการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลไรด์ในพลาสมาด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนมาก่อน ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้อาจเป็นวิธีการหนึ่งที่สะดวก และมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์อะมิโลไรด์ในพลาสมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อะมิทริปทัยลิน

1. สภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์

สำหรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของ Segatti และคณะ (Segatti , M.P. และคณะ, 1991) สามารถให้พีคยาที่มีรูปร่างที่เหมาะสม มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ (retention time) เหมาะสม เมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน และสภาวะที่ปรับปรุงขึ้นสามารถแยกพีคยาออก

จากendogenous substance ได้ดีเมื่อทดสอบกับพลาสมาที่แยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนแล้ว

2. ผลการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน

2.1 การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนละเอียด สีขาว รวมตัวกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใส สะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร มีฐานพีคแคบ สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้ดี มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 5.10 นาทีถึง 5.20 นาที ดังแสดงในรูปที่ 3

ง. **ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน** เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการคืนกลับพบว่าค่าที่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา จึงไม่ผ่านเกณฑ์การประเมิน ดังแสดงในตารางที่ 11

จากเหตุผลของค่าร้อยละของการคืนกลับที่ขึ้นกับความเข้มข้นของอะมิทริปทัยลินในพลาสมาเมื่อใช้เมธานอลในการแยกพลาสมาโปรตีน ทำให้ไม่สามารถใช้เมธานอลในการแยกพลาสมาโปรตีนได้ จึงได้ทดสอบแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ต่อไป

สำหรับข้อสังเกตในการใช้เมธานอลในการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์อะมิทริปทัยลินนี้พบว่า เมื่อตั้งตัวอย่างพลาสมาที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงแล้วไว้ที่

อุณหภูมิห้องโดยไม่ได้แยกส่วนของสารละลายเหนือตะกอนออกเป็นเวลาประมาณ 10 นาที จะมีการฟุ้งกระจายของตะกอนพลาสมาเกิดขึ้นเช่นเดียวกับอะมิโลไรด์

2.2 <u>การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์</u>

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนเหนียว สีเหลืองอ่อน รวมตัวกันที่ก้นหลอดทดลอง ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่าหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใส สะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 3 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร มีฐานพีคแคบ สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้ดี มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 5.10 นาทีถึง 5.20 นาที ดังแสดงในรูปที่ 4

ง. **ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน** เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการคืนกลับพบว่าค่าที่ได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา และมีค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย 91.93 (%CV = 6.10 %) ดังแสดงในตารางที่ 12 ซึ่งผ่านเกณฑ์การประเมินผล

ดังนั้นจึงสามารถใช้อะซีโตไนไตรล์ในการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์อะมิทริปทัยลินในพลาสมาได้เหมาะสมกว่าการใช้เมธานอล เนื่องจากมีค่าร้อยละของการคืนกลับในการแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสมกว่า จึงทำการ validate วิธีวิเคราะห์ต่อไป

3. <u>ผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์</u>

3.1 <u>ประสิทธิภาพการวิเคราะห์</u> แสดงในรูปค่าร้อยละของการคืนกลับตามรายละเอียดในข้อ 2.2 ง.

3.2 <u>ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างค่าความสูงพีคยากับความเข้มข้นในพลาสมา</u> มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 0.5 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร โดยสมการเส้นตรงจาก linear regression คือ $Y = 335.96 - 0.05$ ($r^2 = 0.9999$) เมื่อ Y เป็นความสูงพีคยา (มิลลิเมตร) และ X เป็นค่าความเข้มข้นของอะมิทริปทัยลินในพลาสมา (ไมโครกรัมต่อ พลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร) ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 21 และตารางที่ 13 ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวครอบคลุมระดับความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบในร่างกาย

3.3 <u>ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์</u> เมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรม ดังแสดงในรูปที่ 4 พบว่าค่าเวลาที่อะมิทริปทัยลินถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ในสารละลายมาตรฐาน (รูป ก.) และในพลาสมา (รูป ค.) มีค่าใกล้เคียงกัน และไม่มีการรบกวนของ endogenous substance ในพลาสมาต่อพีคยา ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้จึงมีความจำเพาะเจาะจง

3.4 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถตรวจพบพีคยา</u> จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำสุดของอะมิทริปทัยลินในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2 : 1 คือ 0.0125 ไมโครกรัม ต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร (S/N ratio = 2.24 ± 0.17 ; %CV =7.61 %) ดังแสดงในตารางที่ 14

3.5 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้</u> จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในหนึ่งวันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา ค่าความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.025 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า %CV ของความสูงพีค = 4.80 และ 5.86 % ตามลำดับ ซึ่งถือเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของอะมิทริปทัยลินในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้

3.6 <u>ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์</u> เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณที่ผ่านการประเมินจนถึงข้อ 3.5 มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา ที่มีความเข้มข้นของอะมิทริปทัยลิน 0.05, 0.10 และ 0.50 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตรความเข้มข้น

ละ 3 ตัวอย่าง ค่าร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 15 โดยมีค่าเฉลี่ยของร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์เท่ากับ 98.94 ± 1.41 ซึ่งแสดงถึงความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

3.7 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ก. **ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวัน** ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวันของการวิเคราะห์ปริมาณอะมิทริปทัยลินในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.025 ถึง 1.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV อยู่ระหว่าง 1.82 ถึง 5.61 ดังแสดงในตารางที่ 16

ข. **ความเที่ยงตรงระหว่างวัน** ความเที่ยงตรงระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณอะมิทริปทัยลินในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.025 ถึง 1.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV ของความสูงพีคอยู่ระหว่าง 1.79 ถึง 5.86 ดังแสดงในตารางที่ 17

ซึ่งจากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนในการวิเคราะห์มีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

จากผลการวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน และการวิเคราะห์ผลการvalidate วิธีวิเคราะห์ปริมาณอะมิทริปทัยลินในพลาสมา พบว่าสามารถนำหลักการแยกพลาสมาโปรตีนมาวิเคราะห์ปริมาณอะมิทริปทัยลินในพลาสมาได้อย่างเหมาะสม ซึ่งยังไม่พบรายงานการวิเคราะห์ปริมาณอะมิทริปทัยลินในพลาสมาด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนมาก่อน ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้อาจเป็นวิธีการหนึ่งที่สะดวก และมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์อะมิทริปทัยลิน

ไซเมทิดีน

1. สภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์

สำหรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของ Strong และ Spino (Strong ,H.A. และ Spino , M . 1987) ในครั้งนี้สามารถให้พีคยาที่มีรูปร่างที่เหมาะสม มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ (retention time) เหมาะสม เมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน และสภาวะที่ปรับปรุงขึ้นสามารถแยกพีคยาออกจาก endogenous substance ได้ดีเมื่อทดสอบกับพลาสมาเปล่าที่แยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนแล้ว

2. ผลการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน

2.1 การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนละเอียดสีขาว รวมตัวกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใสสะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร มีฐานพีคแคบ สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้ดี มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 6.00 นาทีถึง 6.03 นาที ดังแสดงในรูปที่ 5

ง. **ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน** เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการคืนกลับพบว่าค่าที่ได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของ

ยาในพลาสมา และมีค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย 89.60 (%CV = 4.53) ดังแสดงในตารางที่ 18 ซึ่งผ่านเกณฑ์การประเมิน

จากผลการแยกพลาสมาโปรตีนดังกล่าวพบว่าสามารถใช้เพียงเมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณไซเมทิดีนได้ จึงทำการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณไซเมทิดีนในพลาสมาด้วยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอลต่อไป

2. ผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล

2.1 ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ แสดงในรูปค่าร้อยละของการคืนกลับตามรายละเอียดในข้อ 1.2 ง.

2.2 ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างค่าความสูงพีคยากับความเข้มข้นในพลาสมา มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 3.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร โดยสมการเส้นตรงจาก linear regression คือ $Y = 15.99 X - 0.58$ ($r^2 = 0.9937$) เมื่อ Y เป็นความสูงพีคยา (มิลลิเมตร) และ X เป็นค่าความเข้มข้นของไซเมทิดีนในพลาสมา (ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร) ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 22 และตารางที่ 19 ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวครอบคลุมระดับความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบในร่างกาย

2.3 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ เมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรม ดังแสดงในรูปที่ 5 พบว่าค่าเวลาที่ไซเมทิดีนถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ในสารละลายมาตรฐาน (รูป ก.) และในพลาสมา (รูป ค.) มีค่าใกล้เคียงกัน และไม่มีการรบกวนของ endogenous substance ในพลาสมาต่อพีคยา ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้จึงมีความจำเพาะเจาะจง

2.4 ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถตรวจพบ

พึงยา จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำสุดของไซเมทิดีนในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2 : 1 คือ 0.20 ไมโครกรัม ต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร (S/N ratio = 3.04 ± 0.26 ; %CV = 8.43 %) ดังแสดงในตารางที่ 20

2.5 ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในหนึ่งวันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา ค่าความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.50 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า %CV =6.64 และ 6.78 % ตามลำดับ ซึ่งถือเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของไซเมทิดีนในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้

2.6 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณที่ผ่านการประเมินจนถึงข้อ 2.5 มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา ที่มีความเข้มข้นของอะมิโลไรด์ 0.50, 2.00 และ3.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตรความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ค่าร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 21 สำหรับค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยในการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ คือ 100.9 ± 5.74 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

2.7 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ก. **ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวัน** ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวันของการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลไรด์ในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.50 ถึง 3.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV อยู่ระหว่าง 4.25 ถึง 7.44 ดังแสดงในตารางที่ 22

ข. **ความเที่ยงตรงระหว่างวัน** ความเที่ยงตรงระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลไรด์ในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.50 ถึง 3.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV ของความสูงพีคอยู่ระหว่าง 2.95 ถึง 7.50 ดังแสดงในตารางที่ 23

ซึ่งจากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนในการวิเคราะห์มีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

จากการพิจารณาผลการแยกพลาสมาโปรตีน และผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณไซเมทิดีนด้วยการใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน พบว่าสามารถใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณไซเมทิดีนในพลาสมาได้อย่างเหมาะสม

ในการวิเคราะห์ปริมาณไซเมทิดีนในพลาสมาที่มีรายงานการศึกษานั้น ส่วนใหญ่เป็นการวิเคราะห์ที่ใช้การสกัดด้วยเฟสของแข็ง หรือตัวทำละลายอินทรีย์ในการเตรียมตัวอย่างพลาสมา (Bartlett, J.M. และ Segelman , A.B. ,1983 ; Fleitman , J. , Torosium ,G. และ Perrin , J.H. ,1982 ; Gamita , Y. และคณะ ,1989 ; Guay, D.R.P., Bockbrader ,H.N. และ Matshe ,G.R. ,1982 ; Kozma ,M. และ Verecskey ,L. ,1983 ; Larsen , N , Hesselfeldt ,P. และ Rune ,S.T. ,1979 ; Lee ,R.M. และ Osborne ,P.M. ,1978 ; Nitsche ,V. และ ascherH. ,1983 ; Strong , H. A. และ Spino , M. ,1987) ซึ่งวิธีการดังกล่าวใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างค่อนข้างมาก

สำหรับรายงานการวิเคราะห์ปริมาณไซเมทิดีนด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนนั้นมีการใช้อะซีโตไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน(Kuntani , M.G. และคณะ ,1981) โดยมีการเพิ่มขั้นตอนการทำให้สารละลายตัวอย่างมีความเข้มข้นขึ้นโดยใช้โมบายเฟสเป็นตัวทำละลาย ในการฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโตกราฟีแทนอะซีโตไนไตรล์ ทำให้ลดปัญหาของความไม่เข้ากันของโมบายเฟสกับตัวทำละลาย สำหรับการใช้เมธานอลร่วมกับสารละลายซิงค์ ซัลเฟตในการแยกพลาสมาโปรตีน (Rustu, A.M. และHoffman, N.E.,1988) พบว่ามีประสิทธิภาพดี แต่รายงานการศึกษานี้ระบุว่าการใช้เมธานอลเพียงสารเดียวในการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนจะให้ค่าร้อยละของการคืนกลับที่ค่อนข้างต่ำ (ร้อยละ 68 ถึง 76) อย่างไรก็ตามจากการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณไซเมทิดีนโดยใช้กระบวนการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของยากลุ่มกรดที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูงในครั้งนี้ พบว่าการใช้เมธานอลเพียงสารเดียวในการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนสามารถให้ค่าร้อยละของการคืนกลับสูง สามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณไซเมทิดีนในพลาสมาได้ ซึ่งวิธีการที่ได้จากการศึกษาเป็นวิธีที่สะดวก มีขั้นตอนน้อยกว่ารายงานการวิเคราะห์ข้างต้น

ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณไซเมทิดีนโดยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอลจึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างเหมาะสม

ไดอะซีแพม

1. สภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์

สำหรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของ Mahai และ Binder (Marhai , M. และ Binder , S.R.)สามารถให้พีคยาที่มีรูปร่างที่เหมาะสม มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ (retention time) เหมาะสม เมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน และสภาวะที่ปรับปรุงขึ้นสามารถแยกพีคยาออกจาก endogenous substance ได้ดีเมื่อทดสอบกับพลาสมาที่แยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนแล้ว

2. ผลการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน

2.1 การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนละเอียดสีขาว รวมตัวกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใสสะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร มีฐานพีคแคบ สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้ดี

มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 4.89 นาทีถึง 4.92 นาที ดังแสดงในรูปที่ 6

ง. **ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน** เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการคืนกลับพบว่าค่าที่ได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา และมีค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย 90.99 (%CV = 7.23) ดังแสดงในตารางที่ 24 ซึ่งผ่านเกณฑ์การประเมิน

จากผลการแยกพลาสมาโปรตีนดังกล่าวพบว่าสามารถใช้เพียงเมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณไดอะซีแพมได้ จึงทำการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณไดอะซีแพมในพลาสมาด้วยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอลต่อไป

2. ผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล

2.1 ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ แสดงในรูปค่าร้อยละของการคืนกลับตามรายละเอียดในข้อ 1.2 ง.

2.2 ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างค่าความสูงพีคยากับความเข้มข้นในพลาสมา มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 4.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร โดยสมการเส้นตรงจาก linear regression คือ $Y = 19.47 X + 0.63$ ($r^2 = 0.9989$) เมื่อ Y เป็นความสูงพีคยา (มิลลิเมตร) และ X เป็นค่าความเข้มข้นของไดอะซีแพมในพลาสมา (ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร) ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 23 และตารางที่ 25 ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวครอบคลุมระดับความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบในร่างกาย

2.3 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ เมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรม ดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่าค่าเวลาที่ไดอะซีแพมถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ใน

สารละลายมาตรฐาน (รูป ก.) และในพลาสมา (รูป ค.) มีค่าใกล้เคียงกัน และไม่มีการรบกวนของ endogenous substance ในพลาสมาต่อพีคยา ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้จึงมีความจำเพาะเจาะจง

2.4 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถตรวจพบพีคยา</u> จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำสุดของไดอะซีแพมในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2 : 1 คือ 0.05 ไมโครกรัม ต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร (S/N ratio = 2.61 ± 0.16 ; %CV = 5.95 %) ดังแสดงในตารางที่ 26

2.5 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้</u> จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในหนึ่งวันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา ค่าความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.10 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า %CV = 4.05 และ 7.42 % ตามลำดับ ซึ่งถือเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของไดอะซีแพมในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้

2.6 <u>ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์</u> เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณที่ผ่านการประเมินจนถึงข้อ 2.5 มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา ที่มีความเข้มข้นของอะมิโลไรด์ 0.10, 0.50 และ 4.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตรความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ค่าร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 27 สำหรับค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยในการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ คือ 89.70 ± 8.10 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

2.7 **<u>ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์</u>**

ก. **ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวัน** ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวันของการวิเคราะห์ปริมาณไดอะซีแพมในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.10 ถึง 4.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV อยู่ระหว่าง 3.05 ถึง 7.44 ดังแสดงในตารางที่ 28

ข. **ความเที่ยงตรงระหว่างวัน** ความเที่ยงตรงระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลไรด์ในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.10 ถึง 3.00

ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV ของความสูงพีคอยู่ระหว่าง 4.05 ถึง 7.42 ดังแสดงในตารางที่ 29

ซึ่งจากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนในการวิเคราะห์มีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

จากการพิจารณาผลการแยกพลาสมาโปรตีน และผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณไดอะซีแพมด้วยการใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน พบว่าสามารถใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ได้อย่างเหมาะสม

การวิเคราะห์ปริมาณไดอะซีแพมในพลาสมาเท่าที่มีรายงานการศึกษา (Klockowski ,P.M. และ Levy, G., 1987 ; Lau, C.E., Dolan, S. และ Tang , M.1987 ; Mazhar,M. และBinder,S.R.,1987 ; Pierre,M.V.และPang ,K.S.,1987 ; Rao,S.N. และคณะ,1982 ; Stebler,T. และ Geuntert, T.W.,1991 ; Sioufi,A. และ Dubois,J.P.,1990) เป็นการใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างพลาสมาด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และการสกัดด้วยเฟสของแข็งที่ซับซ้อน และมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไดอะซีแพมด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนนั้น ไม่มีปรากฏในรายงานการศึกษา แต่มีการใช้ในการแยกพลาสมาโปรตีนร่วมกับการใช้การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Gaitande,C.และPathak,P.,1990) ซึ่งสารแยกพลาสมาโปรตีนที่ใช้เป็นสารละลายกรด

ดังนั้นผลการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการแสดงให้เห็นถึงวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไดอะซีแพมในพลาสมาอีกวิธีการหนึ่งโดยการใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีนซึ่งมีความสะดวก รวดเร็ว

ไดเฟนไฮดรามีน

1. สภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์

สำหรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของ Webb และ Elder (Webb, C . L. และ Elder , M.A. , 1991)สามารถให้พีคยาที่มีรูปร่างที่เหมาะสม มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ (retention time) เหมาะสม เมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน และสภาวะที่ปรับปรุงขึ้นสามารถแยกพีคยาออกจาก endogenous substance ได้ดีเมื่อทดสอบกับพลาสมาที่แยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนแล้ว

2. ผลการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน

2.1 การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนละเอียดสีขาว รวมตัวกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใสสะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร มีฐานพีคแคบ สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้ดี มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 4.80 นาทีถึง 4.90 นาที ดังแสดงในรูปที่ 7

ง. **ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน** เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการคืนกลับพบว่าค่าที่ได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16696618

ยาในพลาสมา และมีค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย 92.33 (%CV =) ดังแสดงในตารางที่ 30 ซึ่งผ่านเกณฑ์การประเมิน

จากผลการแยกพลาสมาโปรตีนดังกล่าวพบว่าสามารถใช้เพียงเมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณไดเฟนไฮดรามีนได้ จึงทำการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณไดเฟนไฮดรามีนในพลาสมาด้วยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอลต่อไป

2. ผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล

2.1 ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ แสดงในรูปค่าร้อยละของการคืนกลับตามรายละเอียดในข้อ 1.2 ง.

2.2 ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างค่าความสูงพีคยากับความเข้มข้นในพลาสมา มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 1.50 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร โดยสมการเส้นตรงจาก linear regression คือ $Y = 55.69 X - 0.41$ ($r^2 = 0.9985$) เมื่อ Y เป็นความสูงพีคยา (มิลลิเมตร) และ X เป็นค่าความเข้มข้นของไดเฟนไฮดรามีนในพลาสมา (ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร) ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 24 และตารางที่ 31 ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวครอบคลุมระดับความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบในร่างกาย

2.3 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ เมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรม ดังแสดงในรูปที่ 7 พบว่าค่าเวลาที่ไดเฟนไฮดรามีนถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ในสารละลายมาตรฐาน (รูป ก.) และในพลาสมา (รูป ค.) มีค่าใกล้เคียงกัน และไม่มีการรบกวนของ endogenous substance ในพลาสมาต่อพีคยา ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้จึงมีความจำเพาะเจาะจง

2.4 ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถตรวจพบ

<u>พึงยา</u> จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำสุดของไดเฟนไฮดรามีนในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2 : 1 คือ 0.075 ไมโครกรัม ต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร (S/N ratio = 2.99 ± 0.23 ; %CV = 7.67 %) ดังแสดงในตารางที่ 32

2.5 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้</u> จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในหนึ่งวันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา ค่าความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.10 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า %CV =5.50 และ 8.80 % ตามลำดับ ซึ่งถือเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของไดเฟนไฮดรามีนในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้

2.6 <u>ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์</u> เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณที่ผ่านการประเมินจนถึงข้อ 2.5 มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา ที่มีความเข้มข้นของไดเฟนไฮดรามีน 0.25, 0.50 และ1.50 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตรความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ค่าร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 33 สำหรับค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยในการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ คือ 97.85 ± 3.95 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

2.7 <u>ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์</u>

ก. **ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวัน** ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวันของการวิเคราะห์ปริมาณไดเฟนไฮดรามีนในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.10 ถึง 1.50 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV อยู่ระหว่าง 5.50 ถึง 8.03 ดังแสดงในตารางที่ 34

ข. **ความเที่ยงตรงระหว่างวัน** ความเที่ยงตรงระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณไดเฟนไฮดรามีนในนพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.10 ถึง 1.50 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV ของความสูงพีคอยู่ระหว่าง 4.62 ถึง 8.80 ดังแสดงในตารางที่ 35 ซึ่งจากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนในการวิเคราะห์มีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

จากการพิจารณาผลการแยกพลาสมาโปรตีน และผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณไดเฟนไฮดรามีนด้วยการใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน พบว่าสามารถใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณไดเฟนไฮดรามีนในพลาสมาได้อย่างเหมาะสม

อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษารายงานการวิเคราะห์ปริมาณไดเฟนไฮดรามีนที่ปรากฏ (Selinger ,K.,Prerost ,J. และ Hill, H. M. ,1990; Walters - Thompson,K.M. และMason ,W.D. ,1992 ; Webb , C. L. และ Elden,M.A.,1991) พบว่าไม่มีรายงานการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณเลย รายงานทั้งหมดมีวิธีการเตรียมตัวอย่างพลาสมาด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และการสกัดด้วยเฟสของแข็ง ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ปริมาณไดเฟนไฮดรามีนด้วยการใช้เมธานอลเป็นสารตกตะกอนพลาสมาโปรตีน จึงอาจถือเป็นวิธีใหม่อีกวิธีหนึ่งในการวิเคราะห์ปริมาณไดเฟนไฮดรามีนในพลาสมาได้

ฟาโมทิดีน

1. สภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์

สำหรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของ Vinceck (Vinceck , W. C. ,1985) สามารถให้พีคยาที่มีรูปร่างที่เหมาะสม มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ (retention time) เหมาะสม เมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน และสภาวะที่ปรับปรุงขึ้นสามารถแยกพีคยาออกจาก endogenous substance ได้เมื่อทดสอบกับพลาสมาเปล่าที่แยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนแล้ว

2. ผลการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน

2.1 การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนละเอียด สีขาว รวมตัวกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใส สะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร มีฐานพีคแคบ สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้ มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 4.90 นาทีถึง 4.98 นาที ดังแสดงในรูปที่ 8

ง. **ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน** เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการคืนกลับพบว่าค่าที่ได้ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา และมีค่าต่ำดังแสดงในตารางที่ 36

จากเหตุผลของค่าร้อยละของการคืนกลับขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมาจึงไม่ใช้เมธานอลในการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณฟาโมทิดีนในพลาสมา

สำหรับการทดสอบแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์นั้นพบว่าพีคยามีรูปร่างที่ไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ คือมีฐานพีคกว้าง และมีลักษณะของ fronting เกิดขึ้น จึงไม่ได้ประเมินผลการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยการใช้อะซีโตไนไตรล์ โดยได้ใช้สารละลายซิงค์ ซัลเฟตร่วมกับเมธานอลในการแยกพลาสมาโปรตีนต่อไป

2.2 <u>การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ ซัลเฟต และเมธานอล</u>

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนละเอียด สีขาว รวมตัวกันที่ก้นหลอดทดลอง ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่าหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใส สะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 2 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้แต่ไม่ดีนัก มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 4.90 นาทีถึง 4.98 นาที ดังแสดงในรูปที่ 9

ง. ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการคืนกลับพบว่าค่าที่ได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา และมีค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย 71.32 (%CV = 1.90 %) ดังแสดงในตารางที่ 37 ซึ่งไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินผลเนื่องจากมีค่าต่ำกว่าร้อยละ 75

ดังนั้นการใช้สารละลายซิงค์ ซัลเฟตร่วมกับเมธานอลในการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณฟาโมทิดีนจึงไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินผลการแยกพลาสมาโปรตีน

สำหรับการใช้สารละลายซิงค์ ซัลเฟตร่วมกับอะซีโตไนไตรล์นั้นให้พีคยาทีมีรูปร่างเช่นเดียวกับการใช้อะซีโตไนไตรล์จึงปฏิเสธการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนดังกล่าว และจะทดสอบการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เป็นกรดต่อไป

2.3 <u>การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายกรดเปอร์คลอริค</u>

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนหยาบสีขาว รวมตัวกันที่ก้นหลอดทดลอง มีปริมาตรไม่มากนัก

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใส

สะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 2 .5 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 1 และได้ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ก่อนฉีดเข้าระบบโครมาโตกราฟี

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้แต่ไม่ดีนัก มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 4.90 นาทีถึง 4.98 นาที ดังแสดงในรูปที่ 10

ง. **ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน** เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการคืนกลับพบว่าค่าที่ได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา และมีค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย 91.01 (%CV = 4.45 %) ดังแสดงในตารางที่ 38 ซึ่งผ่านเกณฑ์การประเมินผล

ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายกรดเปอร์คลอริคในการแยกพลาสมาโปรตีนและจะทำการ validate วิธีการวิเคราะห์ต่อไป

3. <u>ผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์</u>

3.1 <u>ประสิทธิภาพการวิเคราะห์</u> แสดงในรูปค่าร้อยละของการคืนกลับตามรายละเอียดในข้อ 2.3 ง.

3.2 <u>ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างค่าความสูงพีคยากับความเข้มข้นในพลาสมา</u> มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 1.50 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร โดยสมการเส้นตรงจาก linear regression คือ $Y = 47.05 X - 2.23$ ($r^2 = 0.9971$) เมื่อ Y เป็นความสูงพีคยา (มิลลิเมตร) และ X เป็นค่าความเข้มข้นของฟาโมทิดีนในพลาสมา (ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร) ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 25 และตารางที่ 39 ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวครอบคลุมระดับความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบในร่างกาย

3.3 <u>ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์</u> เมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรม ดังแสดงในรูปที่ 10 พบว่าค่าเวลาที่ฟาโมทิดีนถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ในสารละลายมาตรฐาน (รูป ก.) และในพลาสมา (รูป ค.) มีค่าใกล้เคียงกัน และไม่มีการรบกวนของ endogenous substance ในพลาสมาต่อพีคยา ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้จึงมีความจำเพาะเจาะจง

3.4 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถตรวจพบพีคยา</u> จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำสุดของอะมิโลไรด์ในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2 : 1 คือ 0.08 ไมโครกรัม ต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร (S/N ratio = 2.34 ± 0.13 ; %CV =5.64 %) ดังแสดงในตารางที่ 40

อย่างไรก็ตามค่าความเข้มข้นดังกล่าวยังเป็นค่าที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับระดับยาที่พบจริงในพลาสมา

3.5 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้</u> จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในหนึ่งวันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา ค่าความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.25 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า %CV = 3.89 และ 5.18 % ตามลำดับ ซึ่งถือเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของฟาโมทิดีนในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ อย่างไรก็ตามความเข้มข้นดังกล่าวยังมีค่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับระดับยาที่พบในร่างกาย

3.6 <u>ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์</u> เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณที่ผ่านการประเมินจนถึงข้อ 3.5 มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา ที่มีความเข้มข้นของอะมิโลไรด์ 0.25, 0.50 และ1.50 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตรความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ค่าร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 41 และมีค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยเท่ากับ 100.9 ± 3.85 ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

3.7 <u>ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์</u>

ก. **ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวัน** ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวันของการวิเคราะห์ปริมาณฟาโมทิดีนในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.25 ถึง 1.50 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV อยู่ระหว่าง 2.14 ถึง 5.18 ดังแสดงในตารางที่ 42

ข. **ความเที่ยงตรงระหว่างวัน** ความเที่ยงตรงระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณฟาโมทิดีนในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.25 ถึง 1.50 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV ของความสูงพีคอยู่ระหว่าง 1.94 ถึง 6.54 ดังแสดงในตารางที่ 43

ซึ่งจากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนในการวิเคราะห์มีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

จากผลการวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน พบว่าไม่สามารถใช้เมธานอลในการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ได้เนื่องจากค่าร้อยละของการคืนกลับมีค่าขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา และการใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมธานอลจะให้ค่าร้อยละของการคืนกลับที่ต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนด แต่สามารถใช้สารละลายกรดเปอร์คลอริคในการแยกพลาสมาโปรตีน ในการวิเคราะห์ปริมาณฟาโมทิดีนในพลาสมาได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการละลายของฟาโมทิดีนมีข้อจำกัด กล่าวคือ ฟาโมทิดีนละลายได้ดีเฉพาะสารละลายกรดเท่านั้น และละลายได้น้อยมากในตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ รวมทั้งเมธานอล และอะซีโตไนไตรล์ เมื่อใช้เมธานอลในการแยกพลาสมาโปรตีนอาจทำให้ฟาโมทิดีนติดไปกับตะกอนพลาสมาโปรตีนได้ ส่วนการใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตอาจช่วยแทนที่ฟาโมทิดีนที่จับกับพลาสมาโปรตีนด้วยพันธะไอออนิค ทำให้ค่าร้อยละของการคืนกลับเพิ่มขึ้นแต่ยังมีข้อจำกัดของการละลายในเมธานอลอยู่

อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ใช้สารละลายซิงค์ ซัลเฟตเพียงสารเดียวในการแยกพลาสมาโปรตีนเนื่องจากเป็นการทำตามกระสวนการวิเคราะห์ตัวอย่าง

พลาสมาเดิม นอกจากนั้นมีการปฏิเสธการใช้อะซีโตไนไตรล์เนื่องจากให้พีคยาที่มีรูปร่างที่ไม่เหมาะสมเมื่อใช้สภาวะทางโครมาโตกราฟีนี้ ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้แน่นอนว่าสารละลายกรดเปอร์คลอริคเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสมที่สุดในการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ฟาโมทิดีนในพลาสมาได้

และจากผลการ validate วิธีวิเคราะห์พบว่าช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยวิธีการแยกพลาสมาโปรตีนนี้ยังไม่ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นจริงในพลาสมา ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงการปรับการตรวจวัดให้มีความไวในการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น

อย่างไรก็ตามจากรายงานการวิเคราะห์ปริมาณฟาโมทิดีนในพลาสมาที่ปรากฏ (Vince , W.C. , 1985 ; Wanvimonruk , S. และคณะ, 1991) เป็นวิธีที่ใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และการสกัดด้วยเฟสของแข็งในการวิเคราะห์ ซึ่งมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ซับซ้อน ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ปริมาณฟาโมทิดีนในพลาสมาด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จึงมีศักยภาพในการเป็นวิธีวิเคราะห์ที่สะดวก และรวดเร็ว หากมีการปรับปรุงความไวในการวิเคราะห์ให้สูงขึ้น

<u>อิมมิพรามีน</u>

1. <u>สภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์</u>

สำหรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ใช้เป็นสภาวะเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณอะมิทริปทัยลินซึ่งให้พีคยาที่มีรูปร่างที่เหมาะสม มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ (retention time) เหมาะสม เมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐานและสภาวะที่ปรับปรุงขึ้นสามารถแยกพีคยาออกจาก endogenous substance ได้ดีเมื่อทดสอบกับพลาสมาที่แยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนแล้ว

2. <u>ผลการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน</u>

2.1 การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนละเอียด สีขาว รวมตัวกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใส สะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร มีฐานพีคแคบ สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้ดี มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 7.02 นาทีถึง 7.23 นาที ดังแสดงในรูปที่ 11

ง. **ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน** เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการคืนกลับพบว่าค่าที่ได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา แต่มีค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยที่เกินเกณฑ์ที่กำหนดคือมีค่าร้อยละ 101.3 (%CV = 6.50) ดังแสดงในตารางที่ 44

จากเหตุผลของค่าร้อยละของการคืนกลับที่สูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนดจึงปฏิเสธการใช้เมธานอลในการแยกพลาสมาโปรตีนและได้ทดสอบแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ต่อไป

สำหรับข้อสังเกตในการใช้เมธานอลในการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์อิมมิพรามีนนี้พบว่า เมื่อตั้งตัวอย่างพลาสมาที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงแล้วไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ได้แยกส่วนของสารละลายเหนือตะกอนออกเป็นเวลาประมาณ 10 นาที จะมีการฟุ้งกระจายของตะกอนพลาสมาเกิดขึ้น

2.2 การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนเหนียว สีเหลืองอ่อน รวมตัวกันที่ก้นหลอดทดลอง ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่าหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใส สะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 3 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร มีฐานพีคแคบ สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้ดี มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 7.18 นาทีถึง 7.22 นาที ดังแสดงในรูปที่ 12

ง. **ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน** เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการคืนกลับพบว่าค่าที่ได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา และมีค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย 96.69 (%CV = 2.00 %) ดังแสดงในตารางที่ 45 ซึ่งผ่านเกณฑ์การประเมินผล

ดังนั้นจึงสามารถใช้อะซีโตไนไตรล์ในการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์อิมมิพรามีนในพลาสมาได้เหมาะสมกว่าการใช้เมธานอล เนื่องจากมีค่าร้อยละของการคืนกลับในการแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสมกว่า จึงทำการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณอิมมิพรามีนในพลาสมาโดยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ต่อไป

3. <u>ผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์</u>

3.1 <u>ประสิทธิภาพการวิเคราะห์</u> แสดงในรูปค่าร้อยละของการคืนกลับตามรายละเอียดในข้อ 2.2 ง.

3.2 <u>ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างค่าความสูงพีคยากับความเข้มข้นในพลาสมา</u> มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง

1.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร โดยสมการเส้นตรงจาก linear regression คือ $Y = 278.90 X - 096$ ($r^2 = 0.9998$) เมื่อ Y เป็นความสูงพีคยา (มิลลิเมตร) และ X เป็นค่าความเข้มข้นของอิมมิพรามีนในพลาสมา (ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร) ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 26 และตารางที่ 46 ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวครอบคลุมระดับความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบในร่างกาย

3.3 <u>ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์</u> เมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรม ดังแสดงในรูปที่ 12 พบว่าค่าเวลาที่อิมมิพรามีนถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ในสารละลายมาตรฐาน (รูป ก.) และในพลาสมา (รูป ค.) มีค่าใกล้เคียงกัน และไม่มีการรบกวนของ endogenous substance ในพลาสมาต่อพีคยา ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้จึงมีความจำเพาะเจาะจง

3.4 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถตรวจพบพีคยา</u> จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำสุดของอิมมิพรามีนในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2 : 1 คือ 0.025 ไมโครกรัม ต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร (S/N ratio = 2.45 ± 0.15 ; %CV = 5.84 %) ดังแสดงในตารางที่ 47

3.5 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้</u> จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในหนึ่งวันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา ค่าความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.05 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า %CV = 4.95 และ 3.41 % ตามลำดับ ซึ่งถือเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของอิมมิพรามีนในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้

3.6 <u>ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์</u> เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณที่ผ่านการประเมินจนถึงข้อ 3.5 มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา ที่มีความเข้มข้นของอิมมิพรามีน 0.05, 0.10 และ 0.50 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตรความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ค่าร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 48 ซึ่งจะพบว่ามีค่าร้อยละของการคืนกลับของความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตรมีค่าสูง และยังไม่สามารถอธิบายถึงสาเหตุดังกล่าวได้ จึงไม่นำค่านี้มาคิดค่า

เฉลี่ยของค่าร้อยละของการคืนกลับ สำหรับค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยในการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ คือ 96.53 ± 3.91 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้โดยพิจารณาร่วมกับค่าร้อยละของการคืนกลับเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์

3.7 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ก. **ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวัน** ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวันของการวิเคราะห์ปริมาณอิมมิพรามีนในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.05 ถึง 1.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV อยู่ระหว่าง 1.70 ถึง 4.95 ดังแสดงในตารางที่ 49

ข. **ความเที่ยงตรงระหว่างวัน** ความเที่ยงตรงระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณอิมมิพรามีนในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.05 ถึง 1.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV ของความสูงพีคอยู่ระหว่าง 2.48 ถึง 3.69 ดังแสดงในตารางที่ 50

ซึ่งจากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนในการวิเคราะห์มีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

จากผลการวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน และการวิเคราะห์ผลการvalidate วิธีวิเคราะห์ปริมาณอิมมิพรามีนในพลาสมา พบว่าสามารถนำหลักการแยกพลาสมาโปรตีนมาวิเคราะห์ปริมาณอิมมิพรามีนในพลาสมาได้อย่างเหมาะสม ซึ่งยังไม่พบรายงานการวิเคราะห์ปริมาณอิมมิพรามีนในพลาสมาด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนมาก่อน ดังนั้นวิธีวิเคราะห์นี้อาจเป็นวิธีการหนึ่งที่สะดวก และมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์อิมมิพรามีนในพลาสมา

คีโตโคนาโซล

1. สภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์

สำหรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถให้พีคยาที่มีรูปร่างที่เหมาะสม มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ (retention time) เหมาะสม เมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน และสภาวะที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกพีคยาออกจาก endogenous substance ได้ดีเมื่อทดสอบกับพลาสมาเปล่าที่แยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนแล้ว

2. ผลการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน

2.1 การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนละเอียดสีขาว รวมตัวกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใสสะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร มีฐานพีคแคบ แต่มีการรบกวนของ endogenous substance ต่อพีคยาแม้ว่ามีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 5.60 นาทีถึง 5.65 นาที ดังแสดงในรูปที่ 13

จากการรบกวนของ endogenous substance ต่อพีคยานั้นอาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณได้ วิธีการแก้ไขวิธีการหนึ่งคือการปรับสภาวะทางโครมาโตกราฟี แต่

การปรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีมีขั้นตอนที่ซับซ้อน ดังนั้นจึงทดลองแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ก่อน

2.2 การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนเหนียว สีเหลืองอ่อน รวมตัวกันที่ก้นหลอดทดลอง ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่าหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใส สะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 3 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร มีฐานพีคแคบ สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้ดี มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 5.60 นาทีถึง 5.65 นาที ดังแสดงในรูปที่ 14

จากผลการใช้อะซีโตไนไตรล์ในการแยกพลาสมาโปรตีนพบว่าการรบกวนที่เกิดขึ้นจากการใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนนั้นถูกกำจัดไป ดังนั้นจึงทดสอบค่าร้อยละของการคืนกลับในการแยกพลาสมาโปรตีนต่อไป

ง. **ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน** เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการคืนกลับพบว่าค่าที่ได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา และมีค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย 97.02 (%CV = 4.01 %) เมื่อคำนวณจากความสูงพีค และมีค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย 97.50 (%CV = 2.89%) เมื่อคำนวณจากพื้นที่พีค ดังแสดงในตารางที่ 51 และ 52 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การประเมินผล

ดังนั้นจึงสามารถใช้อะซีโตไนไตรล์ในการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์คีโตโคนาโซลในพลาสมาได้เหมาะสมกว่าการใช้เมธานอล เนื่องจากมีค่าร้อยละของการคืนกลับในการแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสมกว่า จึงทำการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณคีโตโคนาโซลในพลาสมาโดยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์ต่อไป

3. ผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์

3.1 ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ แสดงในรูปค่าร้อยละของการคืนกลับตามรายละเอียดในข้อ 2.2 ง.

3.2 ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างค่าความสูงพีคยากับความเข้มข้นในพลาสมา มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 15.0 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร โดยสมการเส้นตรงจาก linear regression คือ $Y = 6.67 + 0.69$ ($r^2 = 0.9980$) เมื่อ Y เป็นความสูงพีคยา (มิลลิเมตร) และ X เป็นค่าความเข้มข้นของคีโตโคนาโซลในพลาสมา (ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร) ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 27 และ ตารางที่ 53 ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวครอบคลุมระดับความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบในร่างกาย

3.3 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ เมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรม ดังแสดงในรูปที่ 14 พบว่าค่าเวลาที่คีโตโคนาโซลถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ในสารละลายมาตรฐาน (รูป ก.) และในพลาสมา (รูป ค.) มีค่าใกล้เคียงกัน และไม่มีการรบกวนของ endogenous substance ในพลาสมาต่อพีคยา ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้จึงมีความจำเพาะเจาะจง

3.4 ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถตรวจพบพีคยา จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำสุดของคีโตโคนาโซลในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2 : 1 คือ 0.30 ไมโครกรัม ต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร (S/N ratio = 2.89 ± 0.12 ; %CV =4.15 %) ดังแสดงในตารางที่ 54

3.5 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้</u> จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในหนึ่งวันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา ค่าความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.30 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า %CV ของค่าความสูงพีคอยู่ระหว่าง 6.04 และ 16.13 % และมีค่า %CV ของค่าพื้นที่พีคอยู่ระหว่าง 10.48 และ 25.10 % ซึ่งความแปรปรวนดังกล่าวมีค่าสูงจึงกำหนดความเข้มข้นของคีโตโคนาโซลในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ที่ 1.0 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร ซึ่งมีค่า %CV ของค่าความสูงพีคอยู่ระหว่าง 3.07 และ 10.58 % และมีค่า %CV ของค่าพื้นที่พีคอยู่ระหว่าง 2.39 และ 4.30 % ซึ่งถือเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของอะมิโลไรด์ในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้

3.6 <u>ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์</u> เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณที่ผ่านการประเมินจนถึงข้อ 3.5 มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา ที่มีความเข้มข้นของคีโตโคนาโซล 1.00, 5.00 และ 10.0 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตรความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ค่าร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 55 สำหรับค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยในการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ คือ 97.86 ± 2.43 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

3.7 <u>ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์</u>

ก. **ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวัน** ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวันของการวิเคราะห์ปริมาณคีโตโคนาโซลในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.30 ถึง 15.0 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV ของความสูงพีคอยู่ระหว่าง 2.00 ถึง 11.64 และมีค่า % CV ของพื้นที่พีคอยู่ระหว่าง 0.58 ถึง 10.48 ดังแสดงในตารางที่ 56 และ 57 ตามลำดับ

ข. **ความเที่ยงตรงระหว่างวัน** ความเที่ยงตรงระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณคีโตโคนาโซลในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.30 ถึง 15.0 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV ของความสูงพีคอยู่

ระหว่าง 4.01 ถึง 16.13 และมีค่า % CV ของพื้นที่พีคอยู่ระหว่าง 4.30 ถึง 25.10 ดังแสดงในตารางที่ 58 และ 59 ตามลำดับ

ซึ่งจากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนในการวิเคราะห์ระหว่างวันมีค่าสูงในความเข้มข้น 0.3 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร

สำหรับการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ค่าความสูงพีคในการทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของยาในพลาสมาที่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับสัญญาณการตรวจวัด และใช้คำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ เนื่องจากค่าความสูงพีคมีความแปรปรวนน้อยกว่าพื้นที่พีค

จากผลการวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน และการวิเคราะห์ผลการvalidate วิธีวิเคราะห์ปริมาณคีโตโคนาโซลในพลาสมา พบว่าสามารถนำหลักการแยกพลาสมาโปรตีนมาวิเคราะห์ปริมาณคีโตโคนาโซลในพลาสมาได้อย่างเหมาะสม

พัยราซินาไมด์

1. สภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์

สำหรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของ Woo และคณะ (Woo , J. และคณะ , 1987) สามารถให้พีคยาที่มีรูปร่างที่เหมาะสม มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ (retention time) เหมาะสม เมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน และสภาวะที่ปรับปรุงขึ้นสามารถแยกพีคยาออกจาก endogenous substance ได้ดีเมื่อทดสอบกับพลาสมาที่แยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนแล้ว

2. ผลการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน

2.1 การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนละเอียด สีขาว รวมตัวกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใส สะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร มีฐานพีคค่อนข้างกว้าง สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้ดี มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 5.15 นาทีถึง 5.18 นาที ดังแสดงในรูปที่ 15

ง. **ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน** เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการคืนกลับพบว่าค่าที่ได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา และมีค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย 97.73 (%CV = 2.05) เมื่อคำนวณจากความสูงพีค และมีค่า 98.66 (% CV = 1.93) เมื่อคำนวณจากพื้นที่พีค ดังแสดงในตารางที่ 60 และ 61 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การประเมิน

จากผลการแยกพลาสมาโปรตีนดังกล่าวพบว่าสามารถใช้เพียงเมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณพัยราซินาไมด์ได้ จึงทำการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณพัยราซินาไมด์ในพลาสมาด้วยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอลต่อไป

2. ผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล

2.1 ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ แสดงในรูปค่าร้อยละของการคืนกลับตามรายละเอียดในข้อ 1.2 ง.

2.2 <u>ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่พีคยากับความเข้มข้นในพลาสมา</u> มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 100.0 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร โดยสมการเส้นตรงจาก linear regression คือ $Y = 7045.6 X + 3706.9$ ($r^2 = 0.9999$) เมื่อ Y เป็นพื้นที่พีคยา และ X เป็นค่าความเข้มข้นของพัยราซินาไมด์ในพลาสมา (ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร) ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 28 และตารางที่ 62 ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวครอบคลุมระดับความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบในร่างกาย

2.3 <u>ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์</u> เมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรม ดังแสดงในรูปที่ 15 พบว่าค่าเวลาที่พัยราซินาไมด์ถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ในสารละลายมาตรฐาน (รูป ก.) และในพลาสมา (รูป ค.) มีค่าใกล้เคียงกัน และไม่มีการรบกวนของ endogenous substance ในพลาสมาต่อพีคยา ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้จึงมีความจำเพาะเจาะจง

2.4 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถตรวจพบพีคยา</u> จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำสุดของพัยราซินาไมด์ในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2 : 1 คือ 0.50 ไมโครกรัม ต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร (S/N ratio = 3.20 ± 0.24 ; %CV = 7.50 %) ดังแสดงในตารางที่ 63

2.5 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้</u> จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในหนึ่งวันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา ค่าความเข้มข้นต่ำสุด คือ 2.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า %CV =8.83 และ 9.61 % ตามลำดับ ซึ่งถือเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของพัยราซินาไมด์ในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้

2.6 <u>ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์</u> เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณที่ผ่านการประเมินจนถึงข้อ 2.5 มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา ที่มีความเข้มข้นของพัยราซินาไมด์ 10.0 40.0 และ 100.0 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตรความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ค่าร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 64

สำหรับค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยในการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ คือ 98.42 ± 1.36 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

2.7 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ก. **ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวัน** ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวันของการวิเคราะห์ปริมาณพัยราซินาไมด์ในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 2.00 ถึง 100.0 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV อยู่ระหว่าง 1.04 ถึง 8.83 เมื่อคำนวณจากความสูงพีค และมีค่า % CV อยู่ระหว่าง 0.92 ถึง 5.71 เมื่อคำนวณจากพื้นที่พีค ดังแสดงในตารางที่ 65 และ 66 ตามลำดับ

ข. **ความเที่ยงตรงระหว่างวัน** ความเที่ยงตรงระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณพัยราซินาไมด์ในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 2.00 ถึง 100.0 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV ของความสูงพีคอยู่ระหว่าง 3.72 ถึง 9.61 และ และมีค่า % CV อยู่ระหว่าง 5.72 ถึง 16.35 เมื่อคำนวณจากพื้นที่พีค ดังแสดงในตารางที่ 67 และ 68 ตามลำดับ

ซึ่งจากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนในการวิเคราะห์มีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

สำหรับในการวิเคราะห์ครั้งนี้ใช้ค่าพื้นที่พีคในการหาความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างสัญญาณในการตรวจวัดกับความเข้มข้นในพลาสมา และคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ เนื่องจากมีความแปรปรวนที่น้อยกว่าค่าความสูงพีค

จากการพิจารณาผลการแยกพลาสมาโปรตีน และผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณพัยราซินาไมด์ด้วยการใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน พบว่าสามารถใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณพัยราซินาไมด์ในพลาสมาได้อย่างเหมาะสม

เมื่อพิจารณารายงานการวิเคราะห์ปริมาณพัยราซินามัยด์พบว่ามีรายงานการ

วิเคราะห์ปริมาณที่ใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีน กล่าวคือ มีการใช้สารละลายกรดเปอร์คลอริคในการตกตะกอนพลาสมาโปรตีน (Yamamoto และคณะ, 1987) และมีการใช้เมธานอลในการตกตะกอนพลาสมาโปรตีน ก่อนการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (WooJ. และคณะ, 1987) นอกจากนั้นเป็นรายงานการวิเคราะห์ที่ใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ในการเตรียมตัวอย่างพลาสมาซึ่งมีขั้นตอนที่ซับซ้อน ใช้เวลา และค่าใช้จ่ายสูง แม้ว่าผลการวิเคราะห์จะมีผลที่ดีก็ตาม

อย่างไรก็ตามจากการทดลอง จะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์ปริมาณพัยราซินามัยด์ในพลาสมา สามารถใช้การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งเป็นขั้นตอนที่สะดวก ใช้เวลาและค่าใช้จ่ายต่ำ จึงอาจถือว่าการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอลในการวิเคราะห์ปริมาณพัยราซินามัยด์ในพลาสมา อาจเป็นวิธีวิเคราะห์อีกวิธีหนึ่งได้ในการวิเคราะห์ปริมาณพัยราซินามัยด์ในพลาสมา

รานิทีดีน

1. สภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์

สำหรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของไซเมทิดีนเนื่องจากมีสมบัติทางเคมีคล้ายคลึงกันนั้นสามารถให้พีคยาที่มีรูปร่างที่เหมาะสม มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ (retention time) เหมาะสม เมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน และสภาวะที่ปรับปรุงขึ้นสามารถแยกพีคยาออกจาก endogenous substance ได้ดีเมื่อทดสอบกับพลาสมาที่แยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนแล้ว

2. ผลการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน

2.1 การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนละเอียด สีขาว รวมตัวกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใส สะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร มีฐานพีคค่อนข้างกว้าง สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้ดี มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 5.80 นาทีถึง 5.88 นาที ดังแสดงในรูปที่ 16

ง. **ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน** เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการคืนกลับพบว่าค่าที่ได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา และมีค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย 92.83 (%CV = 2.76) ดังแสดงในตารางที่ 69 ซึ่งผ่านเกณฑ์การประเมิน

จากผลการแยกพลาสมาโปรตีนดังกล่าวพบว่าสามารถใช้เพียงเมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณรานิทิดีนได้ จึงทำการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณรานิทิดีนในพลาสมาด้วยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอลต่อไป

2. <u>ผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล</u>

2.1 <u>ประสิทธิภาพการวิเคราะห์</u> แสดงในรูปค่าร้อยละของการคืนกลับตามรายละเอียดในข้อ 1.2 ง.

2.2 <u>ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างค่าความสูงพีคยากับความเข้มข้นในพลาสมา</u> มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 3.0 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร โดยสมการเส้นตรงจาก linear regression คือ

$Y = 48.68 X - 2.65$ ($r^2 = 0.9935$) เมื่อ Y เป็นพื้นที่พีคยา และ X เป็นค่าความเข้มข้นของรานิทิดีนในพลาสมา (ไมโครกรัมต่อ พลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร) ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 29 และตารางที่ 70 ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวครอบคลุมระดับความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบในร่างกาย

2.3 <u>ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์</u> เมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรม ดังแสดงในรูปที่ 16 พบว่าค่าเวลาที่รานิทิดีนถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ในสารละลายมาตรฐาน (รูป ก.) และในพลาสมา (รูป ค.) มีค่าใกล้เคียงกัน และไม่มีการรบกวนของ endogenous substance ในพลาสมาต่อพีคยา ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้จึงมีความจำเพาะเจาะจง

2.4 **<u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถตรวจพบพีคยา</u>** จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำสุดของรานิทิดีนในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2 : 1 คือ 0.10 ไมโครกรัม ต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร (S/N ratio = 2.79 ± 0.27 ; %CV = 9.59 %) ดังแสดงในตารางที่ 71

2.5 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้</u> จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในหนึ่งวันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา ค่าความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.25 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า %CV = 2.52 และ 3.51 % ตามลำดับ ซึ่งถือเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของรานิทิดีนในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้

2.6 <u>ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์</u> เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณที่ผ่านการประเมินจนถึงข้อ 2.5 มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา ที่มีความเข้มข้นของรานิทิดีน 0.25 1.00 และ 3.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตรความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ค่าร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 72 สำหรับค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยในการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ คือ 98.19 ± 3.51 ซึ่งแสดงว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้องอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

2.7 <u>ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์</u>

ก. **ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวัน** ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวันของการวิเคราะห์ปริมาณรานิทิดีนในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.25 ถึง 3.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV อยู่ระหว่าง 2.52 ถึง 7.18 ดังแสดงในตารางที่ 73

ข. **ความเที่ยงตรงระหว่างวัน** ความเที่ยงตรงระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณรานิทิดีนในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.25 ถึง 3.00 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV อยู่ระหว่าง 2.36 ถึง 6.60 ดังแสดงในตารางที่ 74

ซึ่งจากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนในการวิเคราะห์มีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

จากการพิจารณาผลการแยกพลาสมาโปรตีน และผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณรานิทิดีนด้วยการใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน พบว่าสามารถใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณรานิทิดีนในพลาสมาได้อย่างเหมาะสม ซึ่งยังไม่มีรายงานการวิเคราะห์รานิทิดีนด้วยการแยกพลาสมาโปรตีนมาก่อน ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ปริมาณรานิทิดีนนี้อาจเป็นวิธีการวิเคราะห์ใหม่อีกวิธีหนึ่งได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไทรเมโธพริม

1. สภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์

สำหรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของWeber และ OPheim (Weber , A. และ Opheim , K.E. ,1983) พบว่าแม้จะให้ค่าเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์เหมาะสม เมื่อทดสอบกับสารละลายมาตรฐาน

และสภาวะที่ปรับปรุงขึ้นสามารถแยกพีคยาออกจาก endogenous substance ได้ เมื่อทดสอบกับพลาสมาเปล่าที่แยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนแล้วก็ตาม พีคยาที่ได้จากการใช้เมธานอล และอะซีโตไนไตรล์ในการแยกพลาสมาโปรตีนจะมีรูปร่างที่ไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ คือมีฐานพีคกว้าง และมีลักษณะของ fronting เกิดขึ้นโดยปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นกับสารละลายมาตรฐานที่ผ่านกระบวนการเหมือนการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล และอะซีโตไนไตรล์ด้วย เมื่อทดลองปรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีพบว่าไม่สามารถกำจัดปัญหาดังกล่าวนี้ได้ จึงได้ใช้สภาวะทางโครมาโตกราฟีเริ่มต้นนี้ในการวิเคราะห์

2. ผลการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน

2.1 การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนละเอียดสีขาว รวมตัวกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใสสะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างไม่สมมาตร มีฐานพีคกว้าง แต่สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้ มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 8.30 นาทีถึง 8.40 นาที ดังแสดงในรูปที่ 17

2.2 การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนเหนียว

สีเหลืองอ่อน รวมตัวกันที่ก้นหลอดทดลอง

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใส สะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างไม่สมมาตร มีฐานพีคกว้าง แต่สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้ มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 8.30 นาทีถึง 8.40 นาที ดังแสดงในรูปที่ 18

จากผลการแยกพลาสมาโปรตีนที่ได้จะปฏิเสธการใช้เมธานอล และอะซีโตไนไตรล์ในการแยกพลาสมาโปรตีนเนื่องจากรูปร่างพีคที่ไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์

สำหรับการใช้สารละลายซิงค์ ซัลเฟตร่วมกับเมธานอล หรืออะซีโตไนไตรล์นั้นให้พีคยาที่มีรูปร่างเช่นเดียวกับการใช้เมธานอล หรืออะซีโตไนไตรล์จึงปฏิเสธการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนดังกล่าว และจะทดสอบการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เป็นกรดต่อไป

2.3 <u>การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายกรดไทรคลอโรอะซีติก</u>

ก. **ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน** เป็นตะกอนหยาบ สีขาว รวมตัวกันที่ก้นหลอดทดลอง มีปริมาตรไม่มากนัก

ข. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** เป็นสารละลายใส สะอาด สีเหลืองอ่อน มีปริมาตรประมาณ 2 .5 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 1 และได้ปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ก่อนฉีดเข้าระบบโครมาโตกราฟี

ค. **ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรม** พีคยาที่ได้มีรูปร่างสมมาตร สามารถถูกแยกออกจาก endogenous substance ได้ มีเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์เหมาะสม คือ ระหว่าง 8.60 นาทีถึง 8.75 นาที ดังแสดงในรูปที่ 19

ง. **ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน** เมื่อพิจารณาค่าร้อยละของการคืนกลับพบว่าค่าที่ได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา และมีค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ย 78.55 (%CV = 12.60 %) เมื่อคำนวณจากพื้นที่พีค และมีค่า 82.08 (%CV = 6.66 %) เมื่อคำนวณจากความสูงพีค ดังแสดงในตารางที่ 75 และ 76 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์การประเมินผล

ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายกรดไทรคลอโรอะซีติคในการแยกพลาสมาโปรตีนและจะทำการ validate วิธีการวิเคราะห์ต่อไป

3. ผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณเมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยอะซีโตไนไตรล์

3.1 ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ แสดงในรูปค่าร้อยละของการคืนกลับตามรายละเอียดในข้อ 2.3 ง.

3.2 ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างค่าความสูงพีคยากับความเข้มข้นในพลาสมา มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 10.0 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร โดยสมการเส้นตรงจาก linear regression คือ $Y = 16.95 X - 1.89$ ($r^2 = 0.9974$) เมื่อ Y เป็นความสูงพีคยา (มิลลิเมตร) และ X เป็นค่าความเข้มข้นของไทรเมโธพริมในพลาสมา (ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร) ดังแสดงรายละเอียดในรูปที่ 77 และตารางที่ 30 ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวครอบคลุมระดับความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบในร่างกาย

3.3 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ เมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรม ดังแสดงในรูปที่ 19 พบว่าค่าเวลาที่ไทรเมโธพริมถูกหน่วงเหนี่ยวไว้ใน

คอลัมน์ในสารละลายมาตรฐาน (รูป ก.) และในพลาสมา (รูป ค.) มีค่าใกล้เคียงกัน และไม่มีการรบกวนของ endogenous substance ในพลาสมาต่อพีคยา ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้จึงมีความจำเพาะเจาะจง

3.4 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถตรวจพบพีคยา</u> จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำสุดของอะมิโลไรด์ในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2 : 1 คือ 0.25 ไมโครกรัม ต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร (S/N ratio = 3.27 ± 0.36 ; %CV = 9.84 %) ดังแสดงในตารางที่ 78

3.5 <u>ขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้</u> จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในหนึ่งวันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา ค่าความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.50 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า %CV = 8.08 และ 4.71 % ตามลำดับ

3.6 <u>ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์</u> เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ปริมาณที่ผ่านการประเมินจนถึงข้อ 3.5 มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมา ที่มีความเข้มข้นของไทรเมโธพริม 1.00 4.00 และ 10.0 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตรความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ค่าร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 79 และมีค่าร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยเท่ากับ 99.82 ± 8.07 ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

3.7 <u>ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์</u>

ก. **ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวัน** ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวันของการวิเคราะห์ปริมาณไทรเมโธพริมในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.50 ถึง 10.0 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV อยู่ระหว่าง 0.76 ถึง 9.20 เมื่อคำนวณจากความสูงพีค และมีค่า % CV อยู่ระหว่าง 1.93 ถึง 22.62 เมื่อคำนวณจากพื้นที่พีค ดังแสดงในตารางที่ 80 และ 81 ตามลำดับ

3.5.2 **ความเที่ยงตรงระหว่างวัน** ความเที่ยงตรงระหว่างวันของการวิเคราะห์ปริมาณไทรเมโธพริมในพลาสมาในช่วงความเข้มข้น 0.50 ถึง 10.0 ไมโครกรัมต่อพลาสมาหนึ่งมิลลิลิตร มีค่า % CV ของความสูงพีคอยู่ระหว่าง

1.91 ถึง 9.17 เมื่อคำนวณจากความสูงพีค และมีค่า % CV อยู่ระหว่าง 4.06 ถึง 8.75 เมื่อคำนวณจากพื้นที่พีค ดังแสดงในตารางที่ 82 และ 83 ตามลำดับ

ซึ่งจากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนในการวิเคราะห์มีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้แต่การใช้ค่าความสูงพีคจะให้ค่าที่มีความแปรปรวนน้อยกว่าจึงใช้ค่าความสูงพีคในการวิเคราะห์ปริมาณ

จากผลการวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน และการวิเคราะห์ผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณไทรเมโธพริมในพลาสมาพบว่าสามารถใช้กรดไทรคลอโรอะซีติคในการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณไทรเมโธพริมในพลาสมาได้

จากการศึกษารายงานการวิเคราะห์ปริมาณไทรเมโธพริมในพลาสมาพบ ว่ามีการใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณด้วย กล่าวคือ มีการใช้อะซีโตไนไตรล์ในการตกตะกอนพลาสมาโปรตีน (Weber , A. และ Ophrim , K.E., 1983; Kanfer, R.G.,Goehin ,R. และ Haigh,J.M.,1981) แต่ในการศึกษาของ Weber และ Ophrim นั้น สัดส่วนของสารตกตะกอนพลาสมาโปรตีนที่ใช้ต่อปริมาตรพลาสมานั้นต่ำ ไม่เพียงพอต่อการตกตะกอนพลาสมาโปรตีน อย่างสมบูรณ์ ส่วนปัญหาเรื่องรูปร่างพีคนั้นไม่เกิดขึ้น สันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการที่สัดส่วนของอะซีโตไนไตรล์ในสารตัวอย่างมีปริมาณน้อย และมีน้ำจากพลาสมาปริมาณมาก ทำให้ไม่เกิดความไม่เข้ากันกับโมบายเฟสซึ่งคล้ายคลึงกับโมบายเฟสในการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตามแม้ว่าการวิเคราะห์ตามรายงานของ Kanfer,Goehin และ Haigh จะใช้สัดส่วนของอะซีโตไนไตรล์ต่อพลาสมาเหมาะสมก็ตาม วิธีการข้างต้นยังมีขั้นตอนที่ซับซ้อนอยู่ เช่นการระเหยตัวทำละลายเพื่อเพิ่มความเข้มข้น และลดปัญหาความไม่เข้ากันของโมบายเฟส

สำหรับการใช้การแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายกรดไทรคลอโรอะซีติคเป็นวิธีการที่สะดวก ประหยัด และมีประสิทธิภาพเท่ากับวิธีการดังกล่าว ดังนั้น

วิธีการวิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไทรเมโธพริมในพลาสมามากกว่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการศึกษาการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของยากลุ่มด่างที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนในระดับต่าง ๆ โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนตามแนวกระสวนการวิเคราะห์ซึ่งสร้างจากยากลุ่มกรดที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูงนั้น พอที่จะสรุปความเป็นไปได้ในการนำกระสวนการวิเคราะห์ ฯ มาใช้กับยากลุ่มด่างได้ดังนี้

ก. ยาที่มีระดับการจับกับพลาสมาโปรตีนต่ำ ใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนที่แตกต่างกันดังนี้ คือ

อะมิโลไรด์ ใช้อะซีโตไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ไซเมทิดีน ใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ฟาโมทิดีน ใช้สารละลายกรดเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

สำหรับยากลุ่มด่างที่มีระดับการจับกับพลาสมาโปรตีนต่ำใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะการจับกับพลาสมาโปรตีนที่แตกต่างกัน โดยเมื่อพิจารณาจากกระสวน ฯ เดิมจะเห็นว่ายาที่มีตำแหน่งการจับกับพลาสมาโปรตีน (binding site) แตกต่างกันจะใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนที่แตกต่างกัน (กนกวรรณ , 2536) ดังนั้นการจับกับพลาสมาโปรตีนที่แตกต่างกันของยาทั้งสามในลักษณะใดลักษณะหนึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้ใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามยากลุ่มด่างมีลักษณะการจับกับพลาสมาโปรตีนที่แตกต่างจากยากลุ่มกรด และยังไม่มีข้อมูลรายละเอียดของการจับกับพลาสมาโปรตีนของยากลุ่มด่างเพียงพอ จึงยังไม่สามารถสรุปสาเหตุที่แน่ชัดลงไปได้

ข. ยาที่มีระดับการจับกับพลาสมาโปรตีนปานกลาง ใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนดังนี้

พัยราซินาไมด์ ใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รานิทิดีน ใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ไทรเมโธพริม ใช้สารละลายกรดเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

สำหรับยาในกลุ่มนี้สามารถใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนได้เหมือนกันแม้ว่าระดับความเป็นด่างจะแตกต่างกันมาก กล่าวคือ พัยราซินามัยด์เป็นด่างอ่อนมาก และรานิทิดีนเป็นด่างค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงอาจตั้งข้อสังเกตได้ว่าระดับความเป็นด่างไม่มีผล

ต่อการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน

สำหรับไทรเมโธพริมนั้นไม่สามารถใช้เมธานอล หรืออะซีโตไนไตรล์ในการแยกพลาสมาโปรตีนได้เนื่องจากเกิดความไม่เข้ากันของสารแยกพลาสมาโปรตีนกับสภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งหากมีการปรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีให้เหมาะสมอาจทำให้สามารถใช้เมธานอล และ/ หรืออะซีโตไนไตรล์ในการแยกพลาสมาโปรตีนได้

ค. สำหรับยาที่มีระดับการจับกับพลาสมาโปรตีนสูง ซึ่งเป็นยากลุ่มที่คาดว่าอาจมีปัญหาในการแยกพลาสมาโปรตีนมากที่สุดนั้นพบว่าสามารถวิเคราะห์โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนได้โดยใช้เพียงเมธานอล หรืออะซีโตไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ดังนี้

อะมิทริปทัยลิน ใช้อะซีโตไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
อิมมิพรามีน ใช้อะซีโตไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
ไดอะซีแพม ใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
ไดเฟนไฮดรามีน ใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
คีโตโคนาโซล ใช้อะซีโตไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ซึ่งสำหรับคีโตคอนาโซลนั้นหากมีการปรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีให้เหมาะสมแล้วอาจขจัดปัญหาของการรบกวนเมื่อใช้เมธานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนได้ ดังนั้นในกรณีนี้จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าไม่สามารถใช้เมธานอลในการแยกพลาสมาโปรตีนสำหรับคีโตโคนาโซลได้

จากการพิจารณาข้อมูลดังกล่าวจะสังเกตได้ว่าข้อจำกัดหนึ่งของการเลือกใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนคือสภาวะทางโครมาโตกราฟีที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ยาแต่ละตัวในพลาสมา

สำหรับการใช้กระสวนการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของยากลุ่มกรดที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูงกับยากลุ่มด่างนั้นพบว่ามีข้อสังเกตดังนี้

ก. ยาที่ไม่สามารถใช้เมธานอลในการแยกพลาสมาโปรตีนได้ แต่สามารถใช้อะซีโตไนไตรล์ในการแยกพลาสมาโปรตีนได้นั้นมีสาเหตุจากการมีความแปรปรวน

ของค่าร้อยละของการคืนกลับสูง มีค่าร้อยละของการคืนกลับที่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา และมีค่าร้อยละของการคืนกลับที่เกินเกณฑ์ที่กำหนด คือเกินร้อยละ 100 ซึ่งยาเหล่านี้คือ อะมิโลไรด์ อะมิทริปทัยลิน และอิมมิพรามีนนั้น จะมีข้อสังเกตร่วมกันของตะกอนพลาสมาโปรตีนที่ฟุ้งกระจายได้ง่าย เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมธานอล และตั้งตัวอย่างพลาสมานั้นทิ้งไว้โดยไม่ได้แยกตะกอนพลาสมาโปรตีนออกจากสารละลายส่วนใสเหนือตะกอน ดังนั้นจากข้อสังเกตร่วมกันนี้อาจใช้เป็นข้อบ่งชี้ของการเลือกใช้อะซีโตไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนลำดับถัดไป โดยไม่ต้องทดสอบค่าร้อยละของการคืนกลับกับเมธานอล

ข. ยาที่ไม่สามารถใช้เมธานอล และอะซีโตไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนได้ แต่สามารถใช้สารละลายกรดในการแยกพลาสมาโปรตีนได้นั้นพิจารณาเหตุผลได้สองกรณีคือ

1. เมื่อมีความไม่เหมาะสมของสภาวะทางโครมาโตกราฟีที่ใช้ต่อสารแยกพลาสมาโปรตีน ตัวอย่างเช่น การแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ฟาโมทิดีนด้วย อะซีโตไนไตรล์ และการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ปริมาณไทรเมโธพริมด้วยเมธานอล และอะซีโตไนไตรล์

ดังนั้นหากการปรับสภาวะทางโครมาโตกราฟีไม่สามารถทำได้ หรือทำได้ยากการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนในกลุ่มกรดอาจเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งสำหรับยากลุ่มด่างได้

2. เมื่อค่าร้อยละของการคืนกลับที่ต่ำเมื่อใช้เมธานอล และสารละลายซิงค์ ซัลเฟตร่วมกับเมธานอล ตัวอย่างเช่นการวิเคราะห์ปริมาณฟาโมทิดีน

แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบร้อยละของการคืนกลับด้วยเมธานอลแล้ว ไม่ได้ทดสอบด้วยการใช้อะซีโตไนไตรล์หรือการใช้สารละลายซิงค์ ซัลเฟตร่วมกับอะซีโตไนไตรล์ต่อ เนื่องจากรูปร่างพีคไม่เหมาะสม และประกอบกับปรากฏการณ์ของค่าร้อยละของการคืนกลับต่ำเมื่อใช้เมธานอล และสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมธานอลนี้เกิดขึ้นกับยาเพียงตัวเดียว จึงยังไม่สามารถสรุปข้อสังเกตที่แน่นอนในประเด็นนี้ได้