บทที่ 3

ผลการศึกษาและการวิจารณ์ผล

ขั้นตอนที่ 1 คัดเลือกสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโดยใช้เทคนิควิธี HPLC

การทำการทดลองเพื่อคัดเลือกสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโดยใช้เทคนิควิธี HPLC ได้ผลดังตารางที่ 1

สารแยกพลาสมาโปรตีนที่ทำการทดลอง ได้แก่ สารละลายกรด สารละลายของโลหะหนัก และตัวทำละลายอินทรีย์ให้ลักษณะการแยกโปรตีน จากพลาสมาแตกต่างกัน โดย

ก. สารละลายกรด ที่ทำการศึกษาได้แก่ สารละลายไตรคลอโรอะซิติก, สารละลายกรดเปอร์คลอริก และ สารละลายผสมระหว่างกรดทังสติกและกรดซัลฟูริก หลังเติมสารละลายกรดลงในพลาสมาเกิดตะกอนขุ่นขาวคล้ายน้ำนม ตะกอนเบาลอยเป็นสาย หลังวอร์เทกซ์ตั้งทิ้งไว้ตะกอนค่อย ๆ ตกลงสู่ก้นหลอด สารละลายกรดเปอร์คลอริกแยกพลาสมาโปรตีนเร็วที่สุด และตะกอนสีเหลืองเข้มกว่าสารละลายกรดอื่น ๆ หลังเซนตริฟิวก์ ตะกอนสีขาวเหลืองติดแน่นก้นหลอด มีบางส่วนติดข้างหลอด ลักษณะตะกอนเมื่อใช้สารละลายผสมระหว่างกรดทังสติกและกรดซัลฟูริกมีลักษณะเบาที่สุดในกลุ่ม และปริมาตรส่วนใสน้อยที่สุด

สารละลายกรดที่นำมาศึกษามีความเป็นกรดอย่างแรง แต่จัดเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่มีประสิทธิภาพดี (Blanchard, 1981) จึงนำมาทำการ

ตารางที่ 1 ผลการทดลองการคัดเลือกสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยาด้วยเทคนิควิธี HPLC

สารแยกพลาสมาโปรตีน	การแยกตัวของ[ก] พลาสมาโปรตีน	ลักษณะตะกอน[ข] พลาสมาโปรตีน	สารละลายส่วนใส		
			ความใสสะอาด[ค]	ปริมาตร[ง]	pH
1. สารละลายกรด					
- กรดไตรคลอโรอะซิติก	++	+	+	++	1.0
- กรดเปอร์คลอริก	++	+	+	++	1.0
- กรดทังสติก	++	+	+	+	1.0
2. สารละลายของโลหะหนัก					
- ไอออนของสังกะสี	+	+	+	++	12.0
- ไอออนของทองแดง	+	++	++	++	7.0
3. ตัวทำละลายอินทรีย์					
- เมทานอล	+++	++	++	+++	7.0
- เอทานอล	+++	++	++	+++	7.0
- อะซิโตน	+++	++	++	+++	7.0
- แอซีโตรไนไตรล์	++++	+++	+++	++++	7.0

สัญญลักษณ์ + ในตาราง

ก การแยกตัวของพลาสมาโปรตีน
- + แยกตัวช้าที่สุด
- ++ ค่อย ๆ แยกตัวอย่างช้า ๆ
- +++ แยกตัวอย่างรวดเร็ว
- ++++ แยกตัวได้ทันที

ข ลักษณะตะกอน
- + ตะกอนเป็นก้อนเขา (floccule)
- ++ ตะกอนเกิดจากอนุภาคเล็ก ๆ (fine particle) อัดตัวกันแน่นเป็นก้อน
- +++ ตะกอนขนาดใหญ่อัดตัวกันแน่นมาก (solid mass)

ค ความใสสะอาดของชั้นสารละลาย
- + ขุ่นเล็กน้อย
- ++ ใสสะอาด
- +++ ใสสะอาดมาก

ง ปริมาตร ที่วัดได้อยู่ระหว่าง
- + 1.5-1.8 มล.
- ++ 1.9-2.0 มล.
- +++ 2.1-2.2 มล.
- ++++ 2.3-2.5 มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

i1978689D

ศึกษา แต่จากการศึกษาพบว่า pH ของสารละลายส่วนใส = 1.0 จึงไม่สามารถฉีดเข้า HPLC โดยตรง ถ้าจะนำสารละลายส่วนใสวิเคราะห์ ต้องปรับ pH ให้อยู่ในช่วงที่ฉีดเข้า HPLC ได้ ข้อเสียอีกประการจากความเป็นกรดอย่างแรง คือไม่สามารถใช้กับยาที่ไม่มีความคงตัวในสารละลายกรด

เมื่อพิจารณาลักษณะภายนอก สารละลายส่วนใสมีความขุ่นเล็กน้อย หากจะนำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ต้องทำการกรองเพื่อให้สารละลายส่วนใสใสสะอาด หรือทำการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมกับน้ำ เพื่อแยกยาออกจากสิ่งรบกวนต่าง ๆ และออกจากสารละลายกรดนั้น ซึ่งอาจทำให้สูญเสียยาไปกับขั้นตอนเหล่านี้ ทั้งยังเสียเวลาและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย

2. สารละลายของโลหะหนัก ได้แก่ สารละลายของไอออนของสังกะสี และไอออนของทองแดง ในรูปของเกลือซัลเฟตในสารละลายด่าง เมื่อเติมโลหะหนักลงในพลาสมา เกิดตะกอนขุ่นขาวลอยอยู่ส่วนบน สารละลายส่วนล่างใสเป็นสีของพลาสมา หลังวอร์เทกซ์ตะกอนค่อย ๆ ตกลงสู่ก้นหลอดอย่างช้าๆ ในลักษณะที่คล้าย ๆ กัน แต่หลังจากเซนตริฟิวก์ให้ลักษณะตะกอนและสารละลายส่วนใสที่แตกต่างกัน ไอออนของสังกะสีให้ตะกอนสีขาว-เหลืองอัดแน่นติดก้นหลอด มีชั้นเจล (gel) ลอยอยู่เหนือตะกอนทำให้สารละลายส่วนบนไม่ใสสะอาด เมื่อวัด pH ของสารละลาย พบว่ามีความเป็นด่างค่อนข้างมากคือ pH = 12.0 จึงต้องทำการปรับค่าpH ทำการกรองหรือสกัดเช่นเดียวกับการใช้สารละลายกรดเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน สำหรับไอออนของทองแดงให้ตะกอนสีขาว-ฟ้าอัดแน่นติดก้นหลอด สารละลายส่วนใสใสสะอาดสีฟ้าอ่อน และมีค่าpH เป็นกลางประมาณ 7.0

การใช้สารกลุ่มนี้มีข้อควรระวังคือ ถ้าใช้สารที่มีปริมาณมากเกินพอ หลังแยกพลาสมาโปรตีนไอออนของโลหะหนักที่มากเกินพอนี้จะไม่ตกตะกอนไปกับพลาสมาโปรตีน แต่จะอยู่ในสารละลายส่วนใส หากยาที่ต้องการวิเคราะห์

สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอออนของโลหะหนักนี้ได้ สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะรบกวนการวิเคราะห์ ทำให้ผลการทดลองที่ได้ไม่ถูกต้อง (Lim, 1988) ถ้าใช้ในปริมาณที่น้อยเกินไป ทำให้การแยกพลาสมาโปรตีนจากตัวยาไม่สมบูรณ์ การใช้สารนี้จึงต้องทำการทดลองหาปริมาณของไอออนของโลหะหนักที่เหมาะสมกับปริมาณพลาสมาโปรตีนในพลาสมา

3. ตัวทำละลายอินทรีย์ที่รวมกับน้ำได้ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล อะซีโตน และแอซีโตรไนไตรล์ เมื่อเติมตัวทำละลายอินทรีย์ในพลาสมาเกิดตะกอนขุ่นขาว-เหลืองตกลงสู่ก้นหลอดทันที แอซีโตรไนไตรล์แยกพลาสมาโปรตีนไวที่สุด เพราะเมื่อนำไปวอร์เทกซ์ตะกอนโปรตีนจะรวมกันเป็นก้อนตะกอนขนาดใหญ่สีเหลือง-น้ำตาล เห็นสารละลายส่วนบนใส และหลังเซนตริฟิวก์ ตะกอนมีลักษณะเป็นก้อนแบบสีเหลือง-น้ำตาลอัดแน่นติดก้นหลอด สารละลายส่วนใสใสสะอาด สีเหลืองอ่อนและมีปริมาตรมากที่สุดเมื่อเทียบกับสารในกลุ่มและสารในกลุ่มอื่นด้วย สำหรับเมทานอล เอทานอล อะซีโตน หลังวอร์เทกซ์ ตะกอนค่อยๆ ตกลงสู่ก้นหลอดอย่างช้า ๆ หลังเซนตริฟิวก์ ตะกอนขาว-เหลืองอัดแน่นติดก้นหลอด สารละลายส่วนใสใสสะอาดสีเหลืองอ่อน มีปริมาตรพอ ๆ กันทั้ง 3 ตัว สารทุกตัวในกลุ่มนี้มี pH ของสารละลายส่วนใสเป็นกลางประมาณ 7.0

จากการที่สารในกลุ่มตัวทำละลายอินทรีย์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่ให้สารละลายส่วนใสใสสะอาด มี pH เป็นกลาง จึงสามารถนำสารละลายส่วนใสฉีดเข้า HPLC ได้โดยตรง ไม่จำเป็นต้องใช้เทคนิคอื่น ๆ ร่วมด้วยอย่างสารในกลุ่มสารละลายกรดและสารละลายของโลหะหนัก จึงประหยัดเวลาและไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และเหมาะสมกับยาที่มีความคงตัวไม่ดี จำเป็นต้องใช้วิธีวิเคราะห์ที่รวดเร็ว เพื่อป้องกันการสลายตัวของยาในระหว่างการวิเคราะห์ นอกจากนี้สารในกลุ่มนี้ยังใช้เป็นส่วนประกอบในโมบายเฟสอีกด้วย

ถ้าพิจารณาสารในกลุ่มตัวทำละลายอินทรีย์ เมทานอล, เอทานอล, อะซีโตน และแอซีโตรไนไตรล์ มีค่า UV cut off = 210, 210, 330 และ 210 นาโนเมตร ตามลำดับ อะซีโตนมีค่า UV cut off ที่ 330 นาโนเมตร ในขณะที่ยาส่วนใหญ่มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 200 - 300 นาโนเมตร การใช้อะซีโตนจึงรบกวนผลการวิเคราะห์ เมื่อใช้เทคนิค HPLC และตรวจหาสารด้วย UV ดีเทกเตอร์ ทำให้มีประสิทธิภาพต่ำเมื่อเทียบกับสารในกลุ่มเดียวกันต่ำที่สุด จึงไม่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้วิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาในการศึกษานี้

ดังนั้น โดยสรุปสารในกลุ่มตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาด้วย HPLC เป็นวิธีการที่ทำเพียงขั้นตอนเดียว สามารถนำสารละลายส่วนใสฉีดเข้า HPLC โดยตรง เพื่อให้การวิเคราะห์มีความสะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ จึงใช้เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ ในการศึกษาครั้งนี้

ขั้นตอนที่ 2 สร้างสภาวะการทดลองทาง HPLC ที่เหมาะสมสำหรับแต่ละตัวยาที่ศึกษา

ผลการทดลองการสร้างสภาวะการทดลองทาง HPLC ที่เหมาะสมสำหรับแต่ละตัวยา ได้ผลเรียงลำดับแต่ละตัวยาดังนี้

1. <u>พาราเซตามอล</u> สภาวะการทดลองที่เหมาะสมมีดังนี้

คอลัมน์ : μ-Bondapak C_{18} (Phenomenex®)

การ์ดคอลัมน์ : Bondapak® C_{18}/Coracil

โมบายเฟส : สารผสมระหว่างแอซีโตรไนไตรล์กับสารละลายกรดอะซิติก (1% w/v ในน้ำ) อัตราส่วน 10:90

อัตราการไหล : 1 มล/นาที

ดีเทกเตอร์ : UV ดีเทกเตอร์ ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

อินทิเกรเตอร์ : เอทเทนนูเอชั่น (Attenuation) : $2^{\wedge 4}$

ความเร็วกระดาษบันทึก : 5 นาที/ซม.

ส่วนประกอบของโมบายเฟสและดีเทกเตอร์ ดัดแปลงจาก Korduba and Petruzzi (1984) และ Quattrone and Putnam (1981)

2. <u>มีโทรนิดาโซล</u> สภาวะการทดลองที่เหมาะสมมีดังนี้

คอลัมน์ : μ-Bondapak C_{18} (Phenomenex®)

การ์ดคอลัมน์ : Bondapak® C_{18}/Coracil

โมบายเฟส : สารผสมระหว่างเมทานอลกับอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ในอัตราส่วน 25:75

อัตราการไหล : 1.1 มล/นาที

ดีเทกเตอร์ : UV ดีเทกเตอร์ ความยาวคลื่น 320 นาโนเมตร

อินทิเกรเตอร์ : เอทเทนนูเอชั่น (Attenuation) : $2^{\wedge 8}$

ความเร็วกระดาษบันทึก : 5 นาที/ซม.

ส่วนประกอบของโมบายเฟสและดีเทกเตอร์ ดัดแปลงจาก Hackett and Dusci (1979)

3. <u>ไนโตรฟิวแรนโตอิน</u> สภาวะการทดลองที่เหมาะสมมีดังนี้

คอลัมน์ : μ-Bondapak C_{18} (Phenomenex®)

การ์ดคอลัมน์ : Bondapak® C_{18}/Coracil

โมบายเฟส : สารผสมระหว่างเมทานอลกับสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ในอัตราส่วน 33:67

อัตราการไหล : 1 มล/นาที

ดีเทกเตอร์ : UV ดีเทกเตอร์ ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

อินทิเกรเตอร์ : เอทเทนูเอชั่น (Attenuation) : $2^{\wedge 4}$

ความเร็วกระดาษบันทึก : 5 นาที/ซม.

ส่วนประกอบของโมบายเฟสและดีเทกเตอร์ ดัดแปลงจาก Hoenor and Woff (1980)

4. <u>ฟินายโตอิน</u> สภาวะการทดลองที่เหมาะสมมีดังนี้

คอลัมน์ : μ-Bondapak C_{18} (Phenomenex®)

การ์ดคอลัมน์ : Bondapak® C_{18}/Coracil

โมบายเฟส : สารผสมระหว่างแอซีโตรไนไตรล์กับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ในอัตราส่วน 33:67

อัตราการไหล : 1 มล/นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดีเทกเตอร์ : UV ดีเทกเตอร์ ความยาวคลื่น 195 นาโนเมตร
อินทิเกรเตอร์ : เอทเทนูเอชั่น (Attenuation) : 2^{-6}
ความเร็วกระดาษบันทึก : 5 นาที/ซม.

ส่วนประกอบของโมบายเฟสและดีเทกเตอร์ ดัดแปลงจาก Szobo and Brone (1982)

5. <u>โพรพราโนลอล</u> สภาวะการทดลองที่เหมาะสมมีดังนี้

คอลัมน์ : μ-Bondapak C_{18} (Water$^{(R)}$)
การ์ดคอลัมน์ : Bondapak$^{(R)}$ C_{18}/Coracil
โมบายเฟส : สารผสมระหว่างเมทานอลกับอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ความเข้มข้น 0.03 โมลาร์ ในอัตราส่วน 65:35
อัตราการไหล : 1 มล/นาที
ดีเทกเตอร์ : ฟลูออเรสเซนต์ดีเทกเตอร์
Excitation 298 นาโนเมตร
Emission 340 นาโนเมตร
อินทิเกรเตอร์ : เอทเทนูเอชั่น (Attenuation) : 2^{-4}
ความเร็วกระดาษบันทึก : 1 มม/นาที

ส่วนประกอบของโมบายเฟสและดีเทกเตอร์ ดัดแปลงจาก Albani, Riva and Baruzzi (1982)

6. <u>ไนเฟดิพีน</u> สภาวะการทดลองที่เหมาะสมมีดังนี้

คอลัมน์ : μ-Bondapak C_{18} (Phenomenex(R))

การ์ดคอลัมน์ : Bondapak(R) C_{18}/Coracil

โมบายเฟส : สารผสมระหว่างเมทานอลกับอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 6.1 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ในอัตราส่วน 61:39

อัตราการไหล : 1 มล/นาที

ดีเทกเตอร์ : UV ดีเทกเตอร์ ความยาวคลื่น 247 นาโนเมตร

อินทิเกรเตอร์ : เอทเทนูเอชั่น (Attenuation) : 2^0

ความเร็วกระดาษบันทึก : 5 นาที/ซม.

ส่วนประกอบของโมบายเฟสและดีเทกเตอร์ ดัดแปลงจาก Kleinbloesen and Harten (1984)

7. <u>ไกลเบนคลาไมด์</u> สภาวะการทดลองที่เหมาะสมมีดังนี้

คอลัมน์ : μ-Bondapak C_{18} (Phenomenex(R))

การ์ดคอลัมน์ : Bondapak(R) C_{18}/Coracil

โมบายเฟส : สารผสมระหว่างแอซีโตรไนไตรล์กับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 3.5 ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ในอัตราส่วน 46:54

อัตราการไหล : 1 มล/นาที

ดีเทกเตอร์ : UV ดีเทกเตอร์ ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตร

อินทิเกรเตอร์ : เอทเทนูเอชั่น (Attenuation) : 2^0

ความเร็วกระดาษบันทึก : 5 นาที/ซม.

ส่วนประกอบของโมบายเฟสและดีเทกเตอร์ ดัดแปลงจาก Boll and Melender (1979)

ขั้นตอนที่ 3 การใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนต่างๆ ที่คัดเลือก เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณยาแต่ละตัวที่ศึกษาในพลาสมา โดยใช้สภาวะทาง HPLC ที่สร้างขึ้นในขั้นตอนที่ 2

1. <u>พาราเซตามอล</u>

ผลการวิเคราะห์ยาพาราเซตามอลในพลาสมา ได้ผลเรียงลำดับแต่ละหัวข้อดังนี้

ก. <u>ลักษณะที่ปรากฏ</u>

ลักษณะปรากฏของตัวอย่างพลาสมาที่ spike ยาพาราเซตามอล และใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็น เมทานอลหรือเอทานอลหรือแอซีโตรไนไตรล์ อย่างใดอย่างหนึ่ง จะให้ลักษณะปรากฏของตะกอนพลาสมาโปรตีนและสารละลายส่วนใส แสดงในตารางที่ 2

แอซีโตรไนไตรล์ ให้ลักษณะปรากฏในแต่ละขั้นตอนของการวิเคราะห์ดีที่สุด เมทานอลและเอทานอล ให้ลักษณะที่ปรากฏที่คล้ายกัน แต่ทั้ง 3 ตัวให้สารละลายส่วนใสหลังเซนตริฟิวก์ ใสสะอาดมีปริมาตรมาก และ pH เป็นกลาง จึงสามารถนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้ทันที

ข. <u>ลักษณะโครมาโทแกรม</u>

สำหรับตัวยาพาราเซตามอล สภาวะทาง HPLC ที่ปรับให้ใช้กับสารแยกพาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวดังสภาวะทาง HPLC ที่แสดงในหน้า 38 สภาวะดังกล่าวจะให้ลักษณะโครมาโทรแกรมพีคของยาเมื่อใช้ เมทานอลหรือ

ตารางที่ 2 ลักษณะปรากฏเมื่อเติม สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์ ลงในพลาสมาที่ spike ยาพาราเซตามอล

ลักษณะปรากฏ	สารแยกพลาสมาโปรตีน		
	เมทานอล	เอทานอล	แอซีโตรไนไตรล์
1. เมื่อเติมสารแยกพลาสมาโปรตีน -ลักษณะและสีของตะกอน -ความเร็วในการแยกตัวออกจากพลาสมา	ตะกอนขุ่นขาว, เบา แยกตัวอย่างรวดเร็ว	แยกตัวอย่างรวดเร็ว	ตะกอนขุ่นขาว, หนัก แยกตัวทันที
2. หลังวอเทกซ์ -ลักษณะตะกอน -สีตะกอน -ความเร็วของตะกอนในการตกลงสู่ก้นหลอด	เบา ขาว-เหลือง ค่อยๆตกลงสู่ก้นหลอด	เบา ขาว-เหลือง ค่อยๆตกลงสู่ก้นหลอด	ก้อนขนาดใหญ่ เหลืองเข้ม ตกลงสู่ก้นหลอดทันที
3. หลังเซนตริฟิวก์ -ตะกอน -ลักษณะและความอัดแน่นของตะกอน -สีของตะกอน	อนุภาคเล็กๆอัดตัวกันแน่น ขาว	อนุภาคเล็กๆอัดตัวกันแน่น ขาว	ก้อนตะกอนขนาดใหญ่อัดตัวกันแน่น เหลือง-น้ำตาล
-สารละลายส่วนใส -ความใส -สีของสารละลาย -ปริมาตร (มล.) -pH	ใสสะอาด เหลืองอ่อน 2.05-2.15 7.0	ใสสะอาด เหลืองอ่อน 2.05-2.15 7.0	ใสสะอาด เหลืองอ่อน 2.30-2.40 7.0

เอทานอลมีความสมมาตรดี แต่เมื่อใช้แอซีโตรไนไตรล์ พีคของยามีลักษณะไม่สมมาตร ทั้งนี้เมื่อได้ปรับเปลี่ยนสภาวะการทดลองไปอีก จะทำให้พีคของยาเมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนแต่ละตัวมีลักษณะที่ไม่ดี ในการศึกษาจึงยึดหลักสภาวะการทดลองนี้ เพื่อให้ผลการทดลองสามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ โดยลักษณะโครมาโทแกรมของยาพาราเซตามอล เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล หรือเอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์ แสดงในรูป 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

จากการศึกษาลักษณะโครมาโทแกรม สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัว ให้ลักษณะโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมาที่สะอาด พีคของยาพาราเซตามอลไม่ถูกรบกวนด้วยพีคของ endogenous substance หรือสารอื่น ๆ และค่า retention time ของพีคยาในสารละลายมาตรฐานในเมทานอล และในพลาสมามีค่าเหมือนกัน แสดงว่าการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ สำหรับยาพาราเซตามอล มีความจำเพาะเจาะจงสูง

รูปร่างพีคของยาพาราเซตามอล เมื่อใช้ เมทานอล หรือเอทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน มีความสมมาตรและแคบ สำหรับแอซีโตรไนไตรล์ พีคของยาพาราเซตามอล ไม่สมมาตร รูปพีคกว้าง (broad) การเกิดรูปพีคในลักษณะเช่นนี้ เกิดขึ้นทั้งในพลาสมาและในสารละลายมาตรฐาน จึงไม่ใช่สาเหตุจากวิธีการแยกพลาสมาโปรตีน แต่คาดว่าการเกิดพีคของยาที่ไม่สมมาตรนี้เกิดจากสาเหตุเดียวกันคือ โมบายเฟสสำหรับสารละลายตัวยาที่มีแอซีโตรไนไตรล์อยู่ไม่เหมาะสม (Woollard, 1984) ยิ่งสารแยกพลาสมาโปรตีนมีความไม่ชอบน้ำมากเท่าใด พีคของยายิ่งผิดปกติมากขึ้น หรือถ้าสารแยกพลาสมาโปรตีนมีความแรงของตัวทำาละลายมากกว่าโมบายเฟส เมื่อฉีดตัวอย่างนั้นเข้า HPLC จะมีผลให้รูปร่างพีคผิดปกติไป (Synder and Dolan, 1989) รูปร่างพีคที่เกิดขึ้นมีลักษณะไม่แน่นอน เช่น peak broading, peak

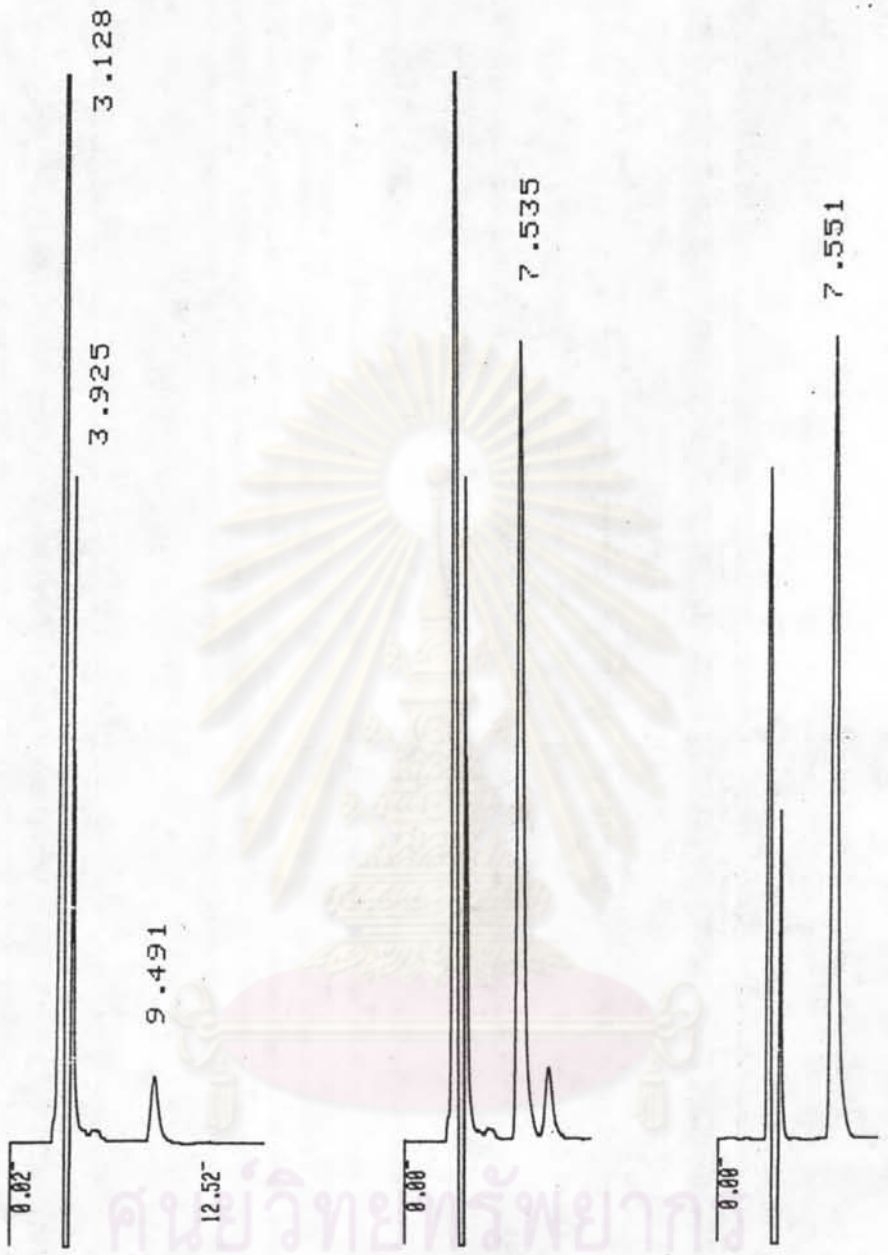
splitting หรือ peak skewing ซึ่งความผิดปกติเนื่องจากโมบายเฟสจะต่างกับเนื่องจากคอลัมน์เสีย

การปรากฏของ endogenous subtance ในโครมาโทแกรม เมื่อใช้เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์มีจำนวน 3 พีคเท่ากัน โดยเมื่อใช้เมทานอลจะมีค่า retention time ที่ 3.13, 3.92, 9.49 นาที เมื่อใช้เอทานอลพีค endogenous substance ปรากฏที่เวลา 3.23, 4.36, 9.33 นาที สำหรับแอซีโตรไนไตรล์ค่า retention time ของ endogenous substance อยู่ที่ 3.20, 3.48, 8.76 นาที

เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล หรือ เอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ เติมในสารละลายมาตรฐานของพาราเซตามอลในเมทานอล จะปรากฏพีคของพาราเซตามอลในโครมาโทแกรมที่เวลา 7.55, 7.50 และ 7.32 นาที ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกันมากกับการเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนดังกล่าวในแบลงค์พลาสมาที่เติมยาพาราเซตามอลโดยพีคของยาในโครมาโทแกรมอยู่ที่เวลา 7.53, 7.46 และ 7.35 นาที ตามลำดับ

รูปร่างพีคของยาพาราเซตามอล เมื่อใช้ เมทานอล และเอทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน มีความสมมาตรและแคบ สำหรับแอซีโตรไนไตรล์ พีคของยาพาราเซตามอล ไม่สมมาตร รูปพีคกว้าง (broad) การที่รูปพีคไม่สมมาตรนี้ ไม่ได้เกิดจากการมีโปรตีนอยู่ในสารละลายส่วนใส เพราะพีคของยาที่ผิดปกตินี้เกิดขึ้นทั้งในพลาสมาและในสารละลายมาตรฐาน

เมื่อพิจารณาทั้งลักษณะปรากฏของสารละลายส่วนใสตะกอนพลาสมาโปรตีนและลักษณะโครมาโทแกรมของพีคยา เมทานอล และเอทานอล ใช้เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนสำหรับการวิเคราะห์ยาพาราเซตามอลในพลาสมาได้



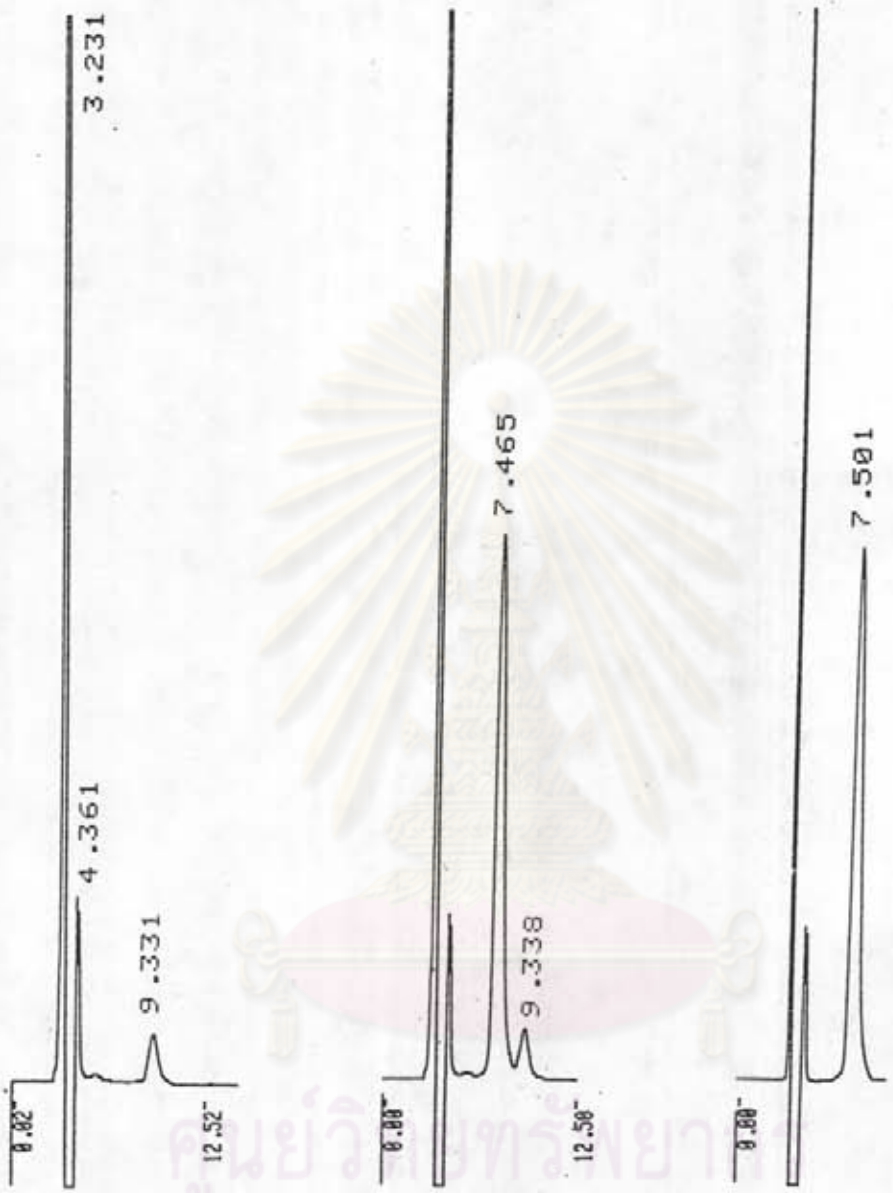
ก ข ค

รูปที่ 1 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาพาราเซตามอล ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ เมทานอล เป็น สารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยา พาราเซตามอล (20.0 มคก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาพาราเซตามอล ในเมทานอล (20.0 มคก/มล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

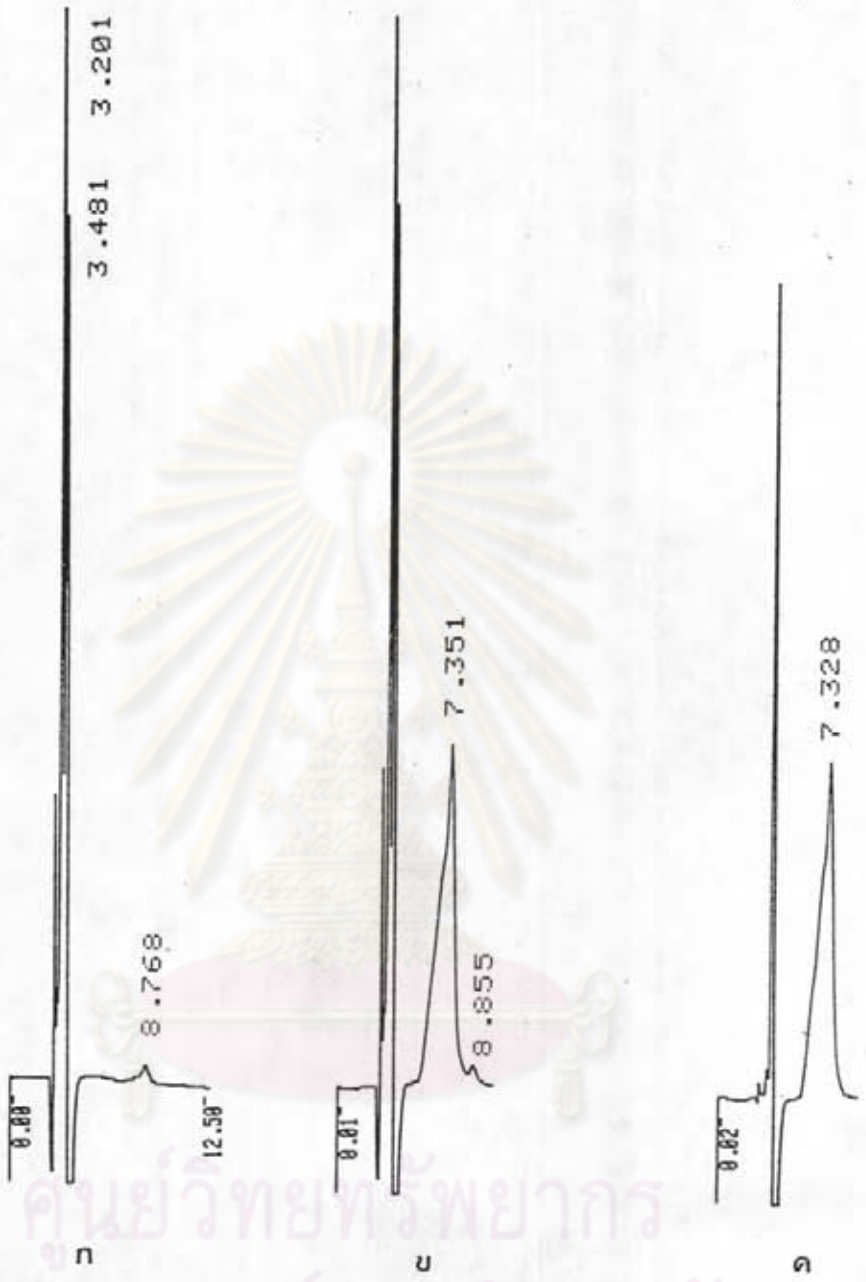


รูปที่ 2 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาพาราเซตามอล ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ เอทานอล เป็น สารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมา ที่เติมยา พาราเซตามอล (20.0 มคก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาพาราเซตามอล ในเมทานอล (20.0 มคก/มล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาพาราเซตามอล ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมา ที่เติมยา พาราเซตามอล (20.0 มคก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาพาราเซตามอล ในเมทานอล (20.0 มคก/มล)

ค. การ Validate วิธีวิเคราะห์

ทำการ Validate วิธีวิเคราะห์ยาพาราเซตามอลในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอล หรือเอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน โดย Validate ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

สำหรับแอซีโตรไนไตรล์ ซึ่งพีคของยาไม่สมมาตร ดังได้กล่าวแล้วข้างต้น จะทำการ validate วิธีวิเคราะห์โดยใช้พื้นที่พีคและความสูงพีคเช่นกัน เพื่อนำข้อมูลเปรียบเทียบกับเมทานอล และเอทานอล

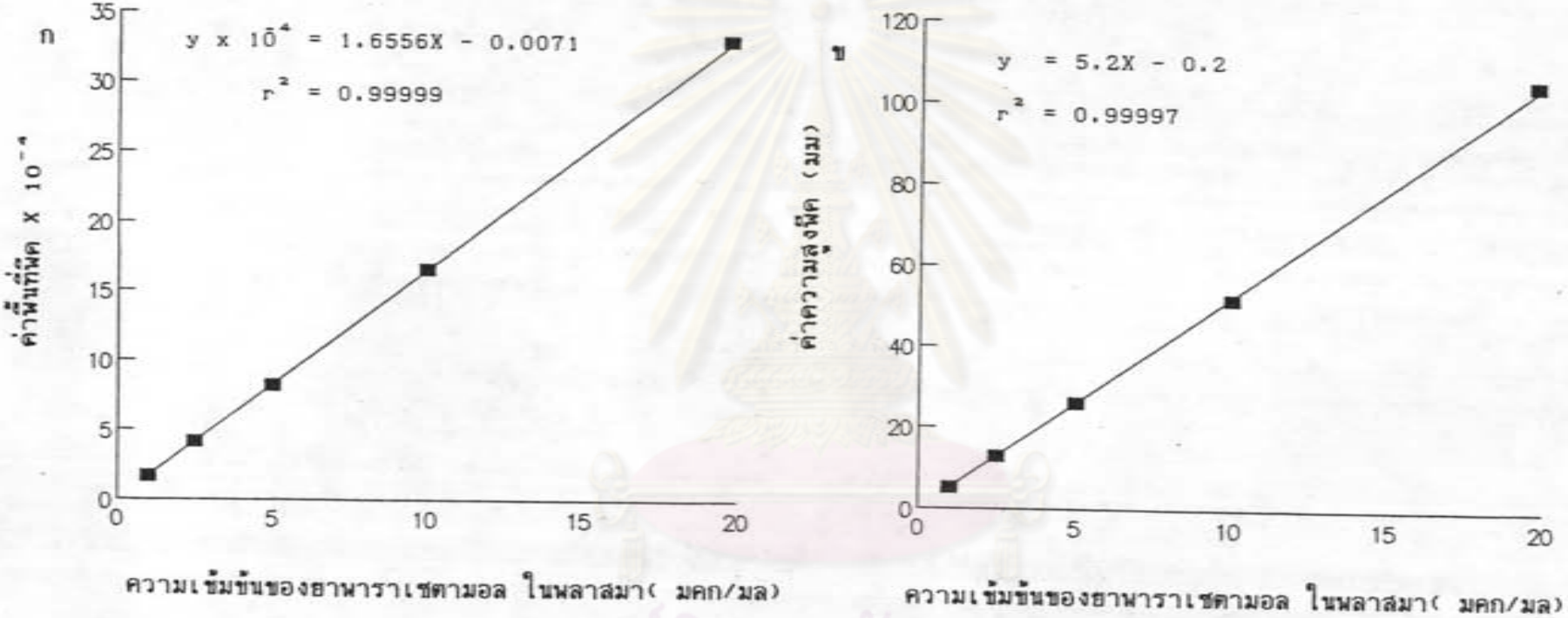
1. Linearity

จากการทดลอง ได้ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคกับความเข้มข้นของยาพาราเซตามอลในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลหรือเอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์ และความสัมพันธ์ระหว่างความสูงพีคกับความเข้มข้นของยาพาราเซตามอลในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอล หรือ เอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 1.0-20.0 มคก/มล โดยพล็อตกราฟระหว่างค่าพื้นที่พีค หรือความสูงพีค (แกน y) กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา (แกน x) ได้ผลความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงเป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's law) ดังแสดงในรูป 4, 5, และ 6 ตามลำดับ โดยมีสมการเส้นตรง และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) แสดงในรูปดังกล่าว

2. ขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์

(Lower Limit of Detection)

จากการทดลองเมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเมทานอล หรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาพาราเซตามอลในพลาสมาที่จะให้ค่าอัตราส่วน S/N เท่ากับ 2.2 และ %CV

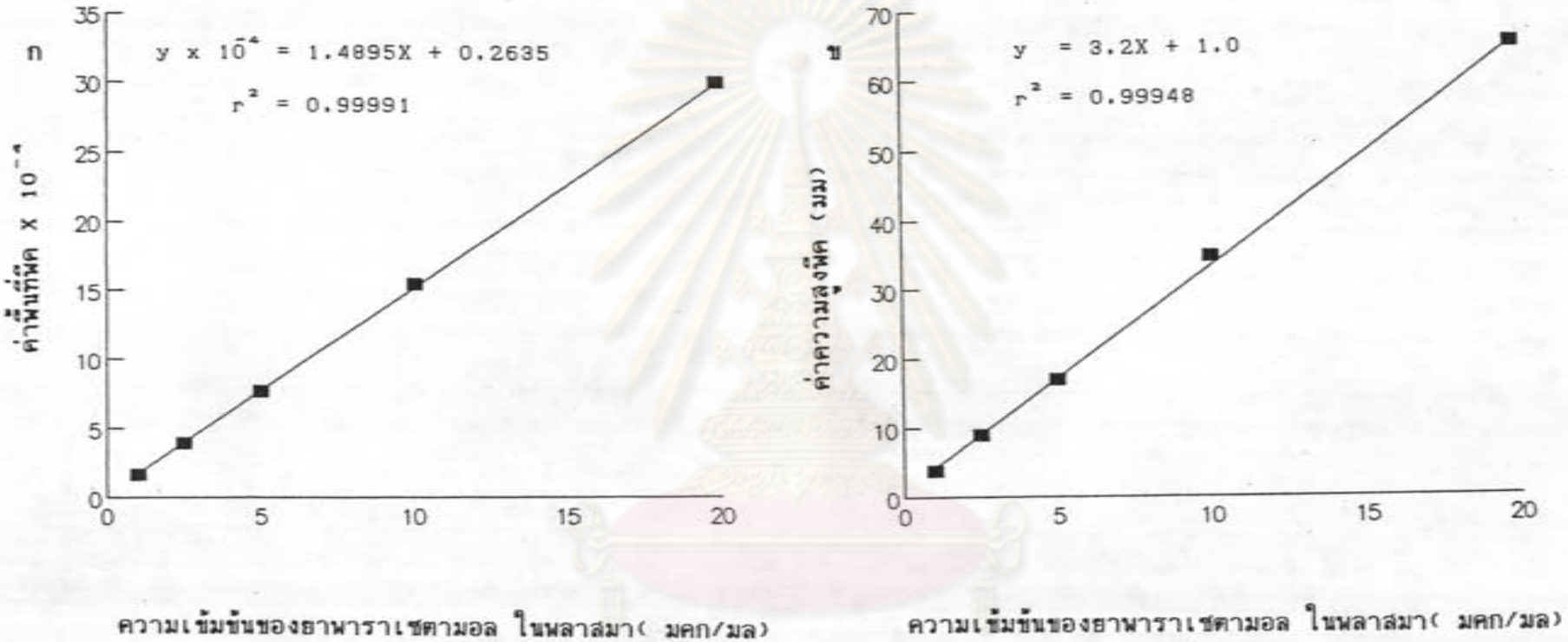


รูปที่ 4 แคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ของยาพาราเซตามอลในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ก. พื้นที่พีค

ข. ความสูงพีค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

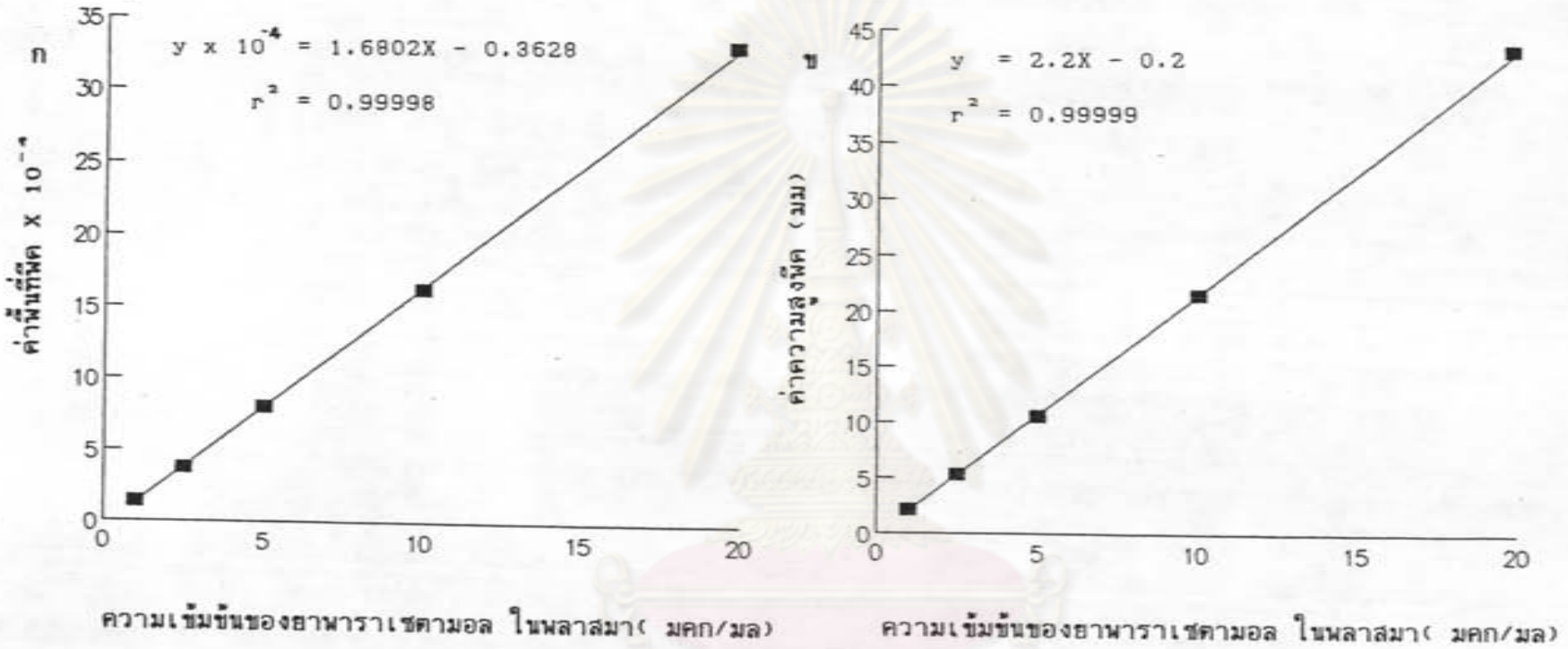


รูปที่ 5 แคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ของยาพาราเซตามอลในพลาสมา เมื่อใช้เอทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ก. พื้นที่พีค

ข. ความสูงพีค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 แคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ของยาพาราเซตามอลในพลาสมา เมื่อใช้แอซิโดรไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ก. พื้นที่พีค

ข. ความสูงพีค

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ของค่าอัตราส่วนS/N อยู่ในช่วง 7.03-9.78% คือ 0.125, 0.250 และ 0.50 มคก/มล ตามลำดับค่า S/N และ %CV แสดงในตารางที่ 3

ขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ให้ค่าที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด รองลงมาเป็นเอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ ตามลำดับ

3. ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

การใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเมทานอลหรือเอทานอลหรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาพาราเซตามอลในพลาสมามีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังได้กล่าวแล้วในลักษณะโครมาโทแกรมในข้อ 1.ข.

4. ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

ก) เปอร์เซนต์การกลับคืนของยาในการแยกออกจากพลาสมา (Physical Recovery)

ผลการทดลองหาเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาพาราเซตามอลที่แยกจากพลาสมาเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานพาราเซตามอลในเมทานอล ที่ความเข้มข้นเท่ากันเมื่อใช้เมทานอล หรือเอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน แสดงในตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ

เมทานอลให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยามากกว่า 90% ในทุกความเข้มข้นของยาพาราเซตามอลที่ทำการศึกษา และ %CV แต่ละความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 2.04-4.31 % ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีคในการคำนวณ เปรียบเทียบการผันแปรของ %CV ระหว่างพื้นที่พีคกับความสูงพีค

ตารางที่ 3 อัตราส่วน S/N เมื่อทำการวิเคราะห์ ยาพาราเซตามอล ในพลาสมา โดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล, เอทานอล และ แอซีโตรไนไตรล์

	S/N		
	เมทานอล ความเข้มข้น 0.125มคก/มล	เอทานอล ความเข้มข้น 0.25 มคก/มล	แอซีโตรไนไตรล์ ความเข้มข้น 0.50มคก/มล
1.	2.1	2.2	2.4
2.	2.5	2.1	2.0
3.	2.2	2.0	2.4
4.	2.3	2.5	2.0
5.	2.1	2.2	2.0
6.	2.2	2.5	2.4
7.	2.1	2.2	2.0
8.	2.2	2.6	2.6
9.	2.0	2.0	2.4
10.	2.0	2.1	2.2
$\bar{X}$	2.2	2.2	2.2
SD	0.2	0.2	0.2
%CV	7.03	9.78	9.55

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 เปอร์เซนต์การกลับคืนของ อาพาราเซตามอล ในพลาสมาเมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=12)

ก.พื้นที่พีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
1.0	103.73	97.41	94.14	92.29	106.59	99.98	98.92	98.60	94.72	96.42	96.12	97.46	98.03	4.00	4.09
2.5	101.32	101.11	101.02	94.95	102.72	99.10	94.00	98.43	98.04	103.09	94.33	99.45	98.96	3.15	3.18
5.0	98.86	99.13	97.50	94.22	102.44	99.66	101.59	95.74	95.45	97.92	98.74	96.06	98.11	2.48	2.53
10.0	96.97	93.86	95.19	100.93	103.51	102.14	99.87	102.44	99.23	103.09	100.80	104.46	100.21	3.36	3.35
20.0	99.26	98.18	94.51	101.42	103.10	102.42	101.76	102.42	101.42	102.20	101.52	100.86	100.76	2.40	2.38
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													99.21	3.20	3.22

ข.ความสูงพีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
1.0	100.00	98.57	92.86	95.41	106.42	93.58	95.41	91.74	100.92	97.19	93.46	95.33	96.74	4.17	4.31
2.5	100.00	96.97	100.00	96.44	97.92	97.92	100.15	94.96	97.92	100.00	94.70	100.00	98.08	2.00	2.04
5.0	93.33	94.81	91.85	97.58	102.42	100.56	101.31	97.58	97.58	98.19	99.28	97.47	97.66	3.13	3.20
10.0	95.93	91.06	93.50	99.46	99.46	100.23	97.93	102.53	99.46	101.85	99.51	101.07	98.50	3.41	3.46
20.0	97.59	96.38	92.37	101.03	100.84	100.45	99.87	102.47	100.55	100.29	99.90	99.93	99.31	2.69	2.71
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													98.06	3.15	3.21

ตารางที่ 5 เปอร์เซนต์การกลับคืนของ อานาราเซตามอล ในพลาสมาเมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=12)

ก. พื้นที่นัด

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
1.0	77.22	80.93	84.46	94.00	107.31	104.58	98.89	101.95	94.37	100.63	92.92	96.04	94.44	9.37	9.93
2.5	84.26	85.18	82.98	95.28	102.39	98.56	105.09	97.83	103.90	189.74	87.72	93.43	93.86	7.86	8.38
5.0	91.87	91.06	88.48	92.92	94.22	94.43	95.85	96.83	95.30	93.44	93.12	90.16	93.14	2.43	2.61
10.0	94.83	95.20	93.24	95.53	96.19	92.16	96.62	98.70	97.75	93.74	96.49	92.27	95.23	2.08	2.18
20.0	96.27	95.91	94.76	93.16	98.56	99.14	99.56	98.38	97.22	98.68	97.77	99.09	97.38	1.98	2.03
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													94.81	5.72	6.03

ข. ความสูงนัด

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
1.0	90.00	90.00	80.00	93.83	88.89	98.77	93.83	98.77	93.83	102.44	97.56	100.00	93.99	6.18	6.57
2.5	95.65	95.65	91.30	97.30	98.38	99.46	101.62	99.46	99.46	96.94	93.88	100.00	97.42	2.92	3.00
5.0	93.62	93.62	91.49	91.15	95.44	95.44	97.05	96.51	96.51	94.39	95.92	94.90	94.67	1.91	2.02
10.0	98.38	97.30	97.30	97.62	97.62	93.69	98.18	98.18	97.05	93.30	95.87	94.07	96.55	1.85	1.92
20.0	96.17	96.72	95.08	91.38	97.41	99.79	98.81	98.11	96.71	98.46	98.46	96.15	96.94	2.21	2.28
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													95.91	3.57	3.72

พบว่ามีการผันแปร ระหว่างความเข้มข้นน้อยทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

เอทานอลให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยามากกว่า 90% ในทุกความเข้มข้น และ %CV แต่ละความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 1.92-9.93% ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีค แต่การใช้พื้นที่พีค มีการผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นสูงกว่าการใช้ความสูงพีค

เปอร์เซนต์การกลับคืนของยาเมื่อใช้แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน แสดงในตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยามีค่า > 90% ในทุกความเข้มข้น เมื่อใช้พื้นที่พีคมีการผันแปรของ %CV สูงโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 1.0 มคก/มล ค่า %CV = 10.80 แต่ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น %CV มีค่าพอ ๆ กันโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 2.47--4.51% แต่เมื่อใช้ความสูงพีค %CV แต่ละความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 1.06-3.00% จึงมีการผันแปรน้อยกว่าพื้นที่พีค

สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวให้เปอร์เซนต์การกลับคืนของยา > 90% แสดงว่าทั้ง 3 ตัวมีประสิทธิภาพดีในการใช้วิเคราะห์ยาพาราเซตามอลในพลาสมา แต่เมื่อพิจารณา %CV แอซีโตรไนไตรล์ให้ %CV > 10% ที่ความเข้มข้นต่ำสุดเมื่อใช้พื้นที่พีคในการคำนวณ ดังนั้นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่ใช้วิเคราะห์ยาพาราเซตามอลได้เมื่อยึดถือตามเกณฑ์ในการศึกษานี้ ได้แก่ เมทานอล และเอทานอล

ข) เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Recovery)

เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ยาพาราเซตามอลในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอล หรือ เอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์

ตารางที่ 6 เปอร์เซนต์การกลับคืนของ อานาราเซตามอล ในพลาสมาเมื่อใช้ แอซิโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=12)

ก.พื้นที่พีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
1.0	92.90	73.88	104.01	87.12	104.83	86.15	99.41	104.00	97.24	106.42	107.78	89.45	96.11	10.38	10.80
2.5	100.71	98.29	103.28	94.31	100.97	92.51	95.54	96.57	99.27	106.73	101.21	101.06	99.20	4.00	4.03
5.0	95.84	94.22	93.78	99.27	199.45	102.21	102.28	104.59	99.37	105.17	102.08	94.01	99.19	2.45	2.47
10.0	98.18	99.40	100.20	100.23	99.77	96.06	99.77	101.62	102.09	92.80	92.80	91.10	97.84	3.73	3.81
20.0	106.22	104.82	106.22	199.43	100.57	197.82	197.59	198.74	196.91	93.00	95.74	93.62	99.22	4.51	4.54
												จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60	97.83	2.38	2.43

ข.ความสูงพีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
1.0	100.00	97.37	100.00	99.35	99.35	99.35	99.35	99.35	99.35	97.44	97.44	97.44	98.82	1.06	1.07
2.5	97.33	97.33	98.67	99.01	95.05	95.05	96.70	93.73	99.01	93.06	97.22	95.83	96.50	1.99	2.06
5.0	96.37	97.21	99.72	97.83	100.07	98.95	99.79	98.95	98.95	95.61	96.12	97.67	98.10	1.53	1.56
10.0	98.29	98.29	98.58	99.50	101.65	100.21	99.36	100.21	99.36	92.32	94.34	99.46	98.46	2.61	2.65
20.0	99.66	99.66	100.48	99.79	99.52	101.17	100.76	100.62	100.76	94.51	94.65	92.40	98.66	3.00	3.04
												จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60	98.71	3.40	3.44

อย่างใดอย่างหนึ่งในตารางที่ 7, 8 และ 9 ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่าสารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวให้เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์มีความถูกต้องดี ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา และ %CV ในแต่ละความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.35-2.04% โดยไม่มีการผันแปรของ %CV ในแต่ละความเข้มข้น ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีคคำนวณ

5. ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

ผลการทดลองศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ใน 1 วัน (within-run precision) และความเที่ยงตรงระหว่างวัน (between-run precision) เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ แสดงในตารางที่ 10-15

วิธีวิเคราะห์ยาพาราเซตามอลในพลาสมาโดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัว ให้ค่า %CV ในการวิเคราะห์ใน 1 วัน และการวิเคราะห์ระหว่างวันอยู่ระหว่าง 0.66-8.42 % และ 1.08-9.79 % ตามลำดับ ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีค แสดงว่ามีความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ใน 1 วันและระหว่างวันดี

เปรียบเทียบการใช้พื้นที่พีคกับความสูงพีค เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล พบว่า มีการผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นในการวิเคราะห์ใน 1 วัน น้อยทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค และ %CV ระหว่างความเข้มข้นในการวิเคราะห์ระหว่างวัน มีการผันแปรน้อยทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีคน้อยเช่นกัน จึงใช้ได้ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

ตารางที่ 7 เปอร์เซนต์การกลับคืน ของวิธีวิเคราะห์ ยาพาราเซตามอล ที่แยกจากพลาสมาที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ความเข้มข้นยาที่เติม (มคก/มล)	พื้นที่พีค				ความสูงพีค			
	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}$±SD	%CV	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}$±SD	%CV
1.0	0.96 0.97 0.99	96.00 97.00 99.00	97.33± 1.53	1.57	0.98 0.98 0.99	98.00 98.00 99.00	98.33± 0.58	0.59
5.0	5.00 4.80 4.90	100.00 96.00 98.00	98.00± 2.00	2.04	4.92 4.84 4.82	98.40 96.80 96.40	97.33± 1.17	1.19
20.0	20.08 20.17 20.22	100.40 100.85 101.11	100.79± 0.36	0.36	20.58 20.11 20.50	102.90 100.55 102.50	101.98 ±1.26	1.23
	จำนวนตัวอย่าง = 9		98.71± 2.03	2.06	จำนวนตัวอย่าง=9		99.13± 2.39	2.41

ตารางที่ 8 เปอร์เซนต์การกลับคืน ของวิธีวิเคราะห์ ยาพาราเซตามอล ที่แยกจากพลาสมาที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ความเข้มข้นยาที่เติม (มคก/มล)	พื้นที่พีค				ความสูงพีค			
	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}\pm SD$	%CV	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}\pm SD$	%CV
2.5	2.60 2.55 2.58	104.00 102.00 103.20	103.07± 1.01	0.98	2.61 2.63 2.57	104.40 105.20 102.80	104.13 ±1.22	1.17
5.0	4.84 4.95 4.78	96.80 99.00 95.60	97.13± 1.72	1.77	4.84 4.80 4.91	96.80 96.00 98.20	97.00± 1.11	1.15
10.0	9.77 9.82 9.69	97.70 98.20 96.90	97.60± 0.66	0.67	9.94 9.91 9.98	99.40 99.10 99.80	99.43 ±0.35	0.35
	จำนวนตัวอย่าง = 9		99.27± 3.04	3.07	จำนวนตัวอย่าง=9		100.19 ±3.25	3.25

ตารางที่ 9 เปอร์เซนต์การกลับคืน ของวิธีวิเคราะห์ ยาพาราเซตามอล ที่แยกจากพลาสมาที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ความเข้มข้นยาที่เติม (มคก/มล)	พื้นที่พีค				ความสูงพีค			
	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}$+SD	%CV	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}$+SD	%CV
2.5	2.63 2.65 2.59	105.20 106.00 103.60	104.93± 1.22	1.66	2.45 2.42 2.48	98.00 96.80 99.20	98.00 ±1.20	1.22
10.0	9.94 9.82 9.70	99.40 98.20 97.00	98.20± 1.20	1.22	9.81 9.85 9.80	98.10 98.50 98.00	98.20± 0.26	0.27
20.0	20.08 19.74 19.70	100.40 98.70 98.50	99.20± 1.04	1.05	19.72 19.92 19.81	98.61 99.60 99.05	99.09 ±0.50	0.50
	จำนวนตัวอย่าง = 9		100.78± 3.30	3.28	จำนวนตัวอย่าง=9		98.43 ±0.83	0.84

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ธาพาราเซตามอล ในพลาสมา ใน 1 วัน (within-run precision) เมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=6)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	SD	%CV
ก.พื้นที่พีค x 10^{-4}									
1.0	1.6543	1.9107	1.7921	1.7731	1.7675	1.6982	1.7660	0.0880	4.98
2.5	4.1086	4.4449	4.2882	4.0673	4.2592	4.2424	4.2351	0.1354	3.13
5.0	8.2595	8.9795	8.7362	8.9051	8.3928	8.3674	8.6068	0.3060	3.57
10.0	16.5952	17.0180	16.7937	16.4031	16.8422	16.3145	16.6611	0.2716	1.63
20.0	33.0868	33.6352	33.4116	33.1963	33.4113	33.0875	33.3048	0.2184	0.66
slope x 10^{-4}	1.6556	1.6654	1.6611	1.6496	1.6669	1.6474	1.6576	0.0081	0.49
intercept x 10^{-4}	-0.0071	0.37431	0.21350	0.16732	0.09979	0.05662	0.15073	0.1345	
r^2	0.99992	0.99992	0.99995	0.99972	0.99994	0.99995			
ข.ความสูงพีค (มม.)									
1.0	5.2	5.8	5.1	5.2	5.0	5.5	5.3	0.3	5.60
2.5	13.0	13.2	13.2	13.5	12.8	13.2	13.2	0.2	1.78
5.0	26.2	27.5	27.0	27.2	26.2	26.2	26.7	0.6	2.20
10.0	51.8	51.8	52.2	51.0	53.4	51.8	52.0	0.8	1.52
20.0	105.0	104.8	104.4	103.8	106.4	104.0	104.7	0.9	0.89
slope	5.2	5.2	5.2	5.2	5.4	5.2	5.2	0.1	1.29
intercept	-0.2	0.6	0.3	0.4	-0.4	0.2	0.2	0.4	
r^2	0.99994	0.99997	0.99998	0.99923	0.99998	0.99996			

ตารางที่ 11 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ธาพาราเซตามอล ในพลาสมา ใน 1 วัน (within-run precision) เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=6)

ก. พื้นที่พีค x 10^{-4}									
ความเข้มข้น มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	SD	%CV
1.0	1.6708	1.7576	1.9072	1.8587	1.8120	1.6772	1.7806	0.0963	5.41
2.5	3.9469	4.2424	4.0826	4.3532	4.0523	4.3604	4.1728	0.0710	4.10
5.0	7.6824	8.0059	7.7907	7.8077	7.9246	7.8795	7.8485	0.1132	1.44
10.0	15.4274	15.9401	15.5345	14.8825	15.6037	15.7857	15.5290	0.3657	3.36
20.0	29.9343	31.9934	31.6704	31.8566	31.6144	31.2419	31.3852	0.7552	2.41
slope x 10^{-4}	1.4895	1.5892	1.5701	1.4336	1.5697	1.5496	1.5336	0.0599	3.90
intercept x 10^{-4}	0.26354	0.15082	0.10721	0.59496	0.11467	0.2570	0.24803	0.1832	
r^2	0.99991	0.99997	0.99984	0.99967	0.99994	0.99992			
ข. ความสูงพีค (มม.)									
1.0	3.8	3.8	3.6	4.0	4.0	3.8	3.8	0.2	3.93
2.5	9.0	9.1	9.2	9.4	9.2	9.2	9.2	0.1	1.45
5.0	17.0	18.0	17.8	17.8	18.1	18.0	17.8	0.4	2.26
10.0	34.8	35.0	34.8	33.4	35.0	34.6	34.6	0.6	1.75
20.0	65.2	70.5	69.5	71.2	70.0	69.0	69.2	2.1	3.06
slope	3.2	3.5	3.5	3.5	3.5	3.4	3.4	0.1	2.95
intercept	1.0	0.3	0.4	0.1	0.5	0.6	0.5	0.3	
r^2	0.99994	0.99997	0.99998	0.99923	0.99998	0.99996			

ตารางที่ 12 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ธาตุราเชตามอล ในพลาสมา ใน 1 วัน (within-run precision) เมื่อใช้ แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=6)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	SD	%CV
ก. พื้นที่พีค x 10^{-4}									
1.0	1.4176	1.7058	1.4019	1.6176	1.6923	1.5823	1.5966	0.1321	8.42
2.5	3.7944	4.0621	3.7218	3.8436	3.8850	3.9939	3.8835	0.1263	3.25
5.0	8.0346	8.0488	8.2721	8.2779	8.4654	8.0426	8.1902	0.1767	2.16
10.0	16.3308	16.2599	15.6234	16.4208	16.5899	16.8083	16.3388	0.4021	2.46
20.0	33.2977	33.3968	32.8179	32.8415	32.9196	32.3793	32.9421	0.3677	-1.12
slope x 10^{-4}	1.6802	1.6705	1.6476	1.6478	1.6483	1.6278	1.6537	0.0187	1.13
intercept x 10^{-4}	-0.3628	-0.1679	-0.3194	-0.0875	0.0185	0.0270	0.1508	-0.1281	
r^2	0.99997	0.99988	0.99964	0.99996	0.99991	0.99973			
ข. ความสูงพีค (มม)									
1.0	2.1	2.2	2.0	2.1	2.2	2.1	2.1	0.1	3.56
2.5	5.3	5.1	5.0	5.4	5.3	5.4	5.2	0.2	3.13
5.0	10.6	10.6	10.9	10.9	10.6	10.6	10.7	0.2	1.45
10.0	21.6	21.5	20.7	21.5	21.9	22.0	21.5	0.5	2.13
20.0	43.4	43.9	42.7	42.6	43.1	42.3	43.0	0.6	1.36
slope	2.2	2.2	2.1	2.1	2.2	2.1	2.2	0.1	2.55
intercept	-0.2	-0.3	-0.2	0.1	0.0	0.1	-0.1	0.2	
r^2	0.99999	0.99992	0.99979	0.99997	0.99993	0.99974			

ตารางที่ 13 ความเที่ยงตรง ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาพาราเซตามอล ในพลาสมาระหว่างวัน(between-run precision) เมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	$\bar{X}$	SD	%CV
ก.พื้นที่พีค $x10^{-4}$						
1.0	1.9518	1.9107	1.9257	1.9257	0.0208	1.08
2.5	5.0514	4.4449	4.6270	4.7078	0.3112	6.61
5.0	9.5873	8.9795	7.9392	9.2775	0.3041	3.28
10.0	17.7214	17.0180	17.3415	17.3603	0.3521	2.03
20.0	35.9940	33.6352	32.2505	34.6227	1.1846	3.41
slope $x10^{-4}$	1.7738	1.6665	1.7123	1.7172	0.0544	3.15
intercept $x10^{-4}$	0.4031	0.3743	0.3717	0.3830	0.0174	
r^2	0.99974	0.99991	0.99988			
ข.ความสูงพีค(มม.)						
1.0	6.5	5.8	6.3	6.2	0.4	5.82
2.5	15.0	13.2	14.0	14.1	0.9	6.41
5.0	31.0	27.5	27.5	28.7	2.0	7.05
10.0	56.0	51.8	54.0	53.9	2.1	3.90
20.0	115.0	104.8	110.0	109.9	5.1	4.64
slope	5.7	5.2	5.5	5.4	0.2	4.35
intercept	1.0	0.6	0.3	0.5	0.3	
r^2	0.99960	0.99987	0.99990			

ตารางที่ 14 ความเที่ยงตรง ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาพาราเซตามอล ในพลาสมาระหว่างวัน(between-run precision) เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ก.พื้นที่พีค $x10^{-4}$						
ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	$\bar{X}$	SD	%CV
1.0	1.7137	1.7576	1.7227	1.7313	0.0232	1.39
2.5	4.2226	4.2414	3.9862	4.1501	0.1422	3.43
5.0	8.6010	8.0059	7.9392	8.1820	0.3644	4.45
10.0	17.8796	15.9401	15.7343	16.5180	1.1837	7.17
20.0	35.4878	31.9934	32.2505	33.3288	1.8871	5.66
slopex10^{-4}	1.5892	1.7852	1.6212	1.6652	0.1052	6.32
intercept $x10^{-4}$	0.1508	-0.1655	-0.1062	0.0305	0.1712	
r^2	0.99996	0.99994	0.99982			
ข.ความสูงพีค(มม.)						
1.0	4.5	3.8	4.2	4.2	0.4	8.43
2.5	11.0	9.1	9.8	10.0	1.0	9.64
5.0	21.5	18.0	18.5	19.3	1.9	9.79
10.0	42.0	35.0	37.2	38.1	3.6	9.40
20.0	85.0	70.5	75.0	76.8	7.4	9.66
slope	3.5	4.2	3.7	3.8	0.4	9.69
intercept	0.3	0.2	0.2	0.3	0.0	
r^2	0.99997	0.99995	0.99993			

ตารางที่ 15 ความเที่ยงตรง ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาพาราเซตามอล ในพลาสมา ระหว่างวัน (between-run precision) เมื่อใช้ แอซิโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ก.พื้นที่พีค $x10^{-4}$						
ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	$\bar{X}$	SD	%CV
1.0	1.8348	1.7058	1.8598	1.8001	0.0826	4.59
2.5	4.8370	4.0621	4.3529	4.4173	0.3914	8.86
5.0	9.3286	8.0488	8.7918	8.7231	0.6427	7.37
10.0	17.9830	16.2599	16.8482	17.0304	0.8759	5.14
20.0	37.7964	33.3968	33.9927	35.0620	2.3868	6.81
slope $x10^{-4}$	1.8814	1.6705	1.6880	1.7466	0.1170	6.70
intercept $x10^{-1}$	-0.1305	-0.1679	0.1716	-0.0423	0.1862	
r^2	0.99961	0.99988	0.99994			
ข.ความสูงพีค(มม.)						
1.0	2.5	2.2	2.3	2.3	0.2	6.55
2.5	6.0	5.1	5.9	5.7	0.5	8.70
5.0	12.4	10.6	11.3	11.3	0.9	7.94
10.0	24.7	21.5	21.9	22.7	1.7	7.68
20.0	52.2	43.9	45.0	47.0	4.5	9.59
slope	2.6	2.2	2.2	2.3	0.2	9.90
intercept	-0.6	-0.3	-0.1	-0.3	0.2	
r^2	0.99963	0.99992	0.99984			

เมื่อใช้เอทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน %cv ระหว่างความเข้มข้นในการวิเคราะห์ใน 1 วัน มีการผันแปรน้อยทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค และ %cv ระหว่างความเข้มข้นในการวิเคราะห์ระหว่างวันเมื่อใช้พื้นที่พีคมีการผันแปรมากกว่าความสูงพีคเล็กน้อย จึงใช้ได้ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

เมื่อใช้แอซีโตรไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน %cv ระหว่างความเข้มข้นในการวิเคราะห์ใน 1 วัน มีการผันแปรไม่มาก ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค สำหรับ %cv ระหว่างความเข้มข้นในการวิเคราะห์ระหว่างวันมีการผันแปรน้อยทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่พีค หรือค่าความสูงที่ได้จากการศึกษา ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์กับความเข้มข้นของยาในพลาสมาเมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล หรือแอซีโตร-ไนไตรล์ โดยการหา linearity เช่นเดียวกับหัวข้อ Validation (หน้า25) ได้ผลความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรง โดยมีค่าความชันของกราฟ (slope), จุดตัดแกน y (intercept) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) แสดงในตารางความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

จากชุดเส้นกราฟมาตรฐาน เมื่อใช้พื้นที่พีคและความสูงพีคได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของความชันของกราฟ (slope) และจุดตัดแกน y (intercept) ที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่า %cv ของค่าความชันของกราฟเมื่อวิเคราะห์ใน 1 วัน และระหว่างวันอยู่ระหว่าง 0.49-3.90% และ 3.15-9.69% ตามลำดับ ดังนั้นไม่ว่าจะทำการวิเคราะห์ใน 1 วันหรือวิเคราะห์ระหว่างวัน ก็ให้ผลการวิเคราะห์ไม่ต่างกัน

จากการ validate ในหัวข้อต่างๆ เมื่อใช้เมทานอลและเอทานอล อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ดังนั้นเมื่อดูผลรวมของลักษณะปรากฏของตะกอนพลาสมาโปรตีน, สารละลายส่วนใส, โครมาโทแกรมพีคของยาและการ validate วิธีวิเคราะห์ เมทานอลและเอทานอลใช้วิเคราะห์หาปริมาณยาพาราเซตามอลในพลาสมาได้ ส่วนแอซีโตรไนไตรล์ เมื่อ validate วิธีวิเคราะห์โดยใช้ความสูงพีค อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด แต่เมื่อทดลองทำการ validate วิธีวิเคราะห์โดยใช้พื้นที่พีค ค่าการ validate ต่าง ๆ ที่ทำการศึกษาอยู่เกณฑ์ที่กำหนดเช่นเดียวกัน ยกเว้นค่า %CV ของเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาที่ความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่ทำการศึกษา มีค่า %CV > 10% ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะพีคของยาที่ไม่สมมาตร ยิ่งความเข้มข้นต่ำ พีคจะยิ่งกว้าง (broad) มาก การอินทิเกรต (integrate) ค่าพื้นที่พีคจากเครื่อง จึงมีความแปรปรวนมาก อย่างไรก็ดี ถ้าปรับสภาวะการทดลองให้เหมาะสม แอซีโตรไนไตรล์อาจเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนอีกตัวหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ยาพาราเซตามอลในพลาสมาด้วย HPLC

การวิเคราะห์หาปริมาณยาพาราเซตามอลในพลาสมา โดยการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนที่มีรายงานการวิเคราะห์โดยวิธีทางสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ด้วยวิธี colorimetry วิธี colorimetry ที่ใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน ที่มีรายงานใช้สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (Bailey, 1982; Miceli; et al, 1979; Novotry and Elser, 1984) หลังแยกพลาสมาโปรตีนต้องต้มไล่กรดหรือทำการสกัด ก่อนนำไปฟอร์มสีและวิเคราะห์หาปริมาณ ซึ่งการรายงานการ validate วิธีวิเคราะห์ไม่มีความชัดเจน บางรายงานไม่มีการ validate เลย (Miceli; et al, 1979)

วิธีทาง HPLC ที่มีรายงานการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนใช้สารละลายผสมระหว่างแบเรียมไฮดรอกไซด์กับโซเดียมไฮดรอกไซด์

(O'Connell and Zurzola, 1982) หลังแยกพลาสมาโปรตีนต้องกรองก่อนฉีดเข้า HPLC การ validate วิธี รายงานเพียงความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) เท่านั้น การใช้แอซีโตรไนไตรล์ในการวิเคราะห์มีรายงานโดยใช้ร่วมกับเอธิลอะซิเตท (Qualtrone and Putnum, 1981) หรือร่วมกับคลอโรฟอร์ม (Tebbett and Omile, 1985) หรือใช้แอซีโตรไนไตรล์ในปริมาณที่มากเกินพอ (Korduba and Petruzzi, 1984) เพื่อทำการสกัดแล้วนำไประเหยแห้ง และละลายในโมบายเฟสก่อนฉีดเข้า HPLC วิธีเหล่านี้จึงมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและการ validate วิธีวิเคราะห์ไม่ชัดเจนสมบูรณ์

เปรียบเทียบรายงานเหล่านี้กับการวิเคราะห์หาปริมาณยาพาราเซตามอลในพลาสมา โดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล หรือเอทานอล ที่ทำการศึกษา วิธีที่มีรายงานจะมีขั้นตอนในการวิเคราะห์ที่ยุ่งยากกว่า ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและเสียเวลามากกว่า ทั้งยังไม่ให้ความเชื่อมั่นในวิธีวิเคราะห์ เนื่องจากการ validate ไม่มีความชัดเจน

สำหรับรูปร่างพีคของยาที่ไม่สมมาตร หรือพีคของยาพาราเซตามอลที่ผิดปกติ ไม่พบว่ามีรายงานแต่อย่างใด

2. <u>มีโทรนิดาโซล</u>

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณยามีโทรนิดาโซลในพลาสมา ได้ผลเรียงลำดับแต่ละหัวข้อดังนี้

ก. <u>ลักษณะปรากฏ</u>

ลักษณะปรากฏของตัวอย่างพลาสมาที่spikeยามีโทรนิดาโซลและใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็น เมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง จะให้ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีนและสารละลายส่วนใสแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ลักษณะปรากฏเมื่อเติม สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์ ลงในพลาสมาที่ spike ยามีโทรนิดาโซล

ลักษณะปรากฏ	สารแยกพลาสมาโปรตีน		
	เมทานอล	เอทานอล	แอซีโตรไนไตรล์
1. เมื่อเติมสารแยก-พลาสมาโปรตีน			
-ลักษณะและสีของตะกอน	ตะกอนขุ่นขาว, เบา		ตะกอนขุ่นขาว, หนัก
-ความเร็วในการแยกตัวออกจากพลาสมา	แยกตัวอย่างรวดเร็ว	แยกตัวอย่างรวดเร็ว	แยกตัวทันที
2. หลังวอเทกซ์			
-ลักษณะตะกอน	เบา	เบา	ก้อนขนาดใหญ่
-สีตะกอน	ขาว-เหลือง	ขาว-เหลือง	เหลืองเข้ม
-ความเร็วของตะกอนในการตกลงสู่ก้นหลอด	ค่อยๆตกลงสู่ก้นหลอด	ค่อยๆตกลงสู่ก้นหลอด	ตกลงสู่ก้นหลอดทันที
3. หลังเซนตริฟิวก์			
-ตะกอน			
-ลักษณะและความอัดแน่นของตะกอน	อนุภาคเล็กๆอัดตัวกันแน่น	อนุภาคเล็กๆอัดตัวกันแน่น	ก้อนตะกอนขนาดใหญ่อัดตัวกันแน่น
-สีของตะกอน	ขาว	ขาว	เหลือง-น้ำตาล
-สารละลายส่วนใส			
-ความใส	ใสสะอาด	ใสสะอาด	ใสสะอาด
-สีของสารละลาย	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน
-ปริมาตร (มล.)	2.05-2.15	2.05-2.15	2.30-2.40
-pH	7.0	7.0	7.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัว ให้ลักษณะตะกอนที่อัดแน่น แยกจากสารละลายส่วนใสอย่างชัดเจน และสารละลายส่วนใสใสสะอาด ปริมาตรมาก และมี pH เป็นกลาง = 7.0 จึงฉีดเข้า HPLC วิเคราะห์หาปริมาณได้ทันที

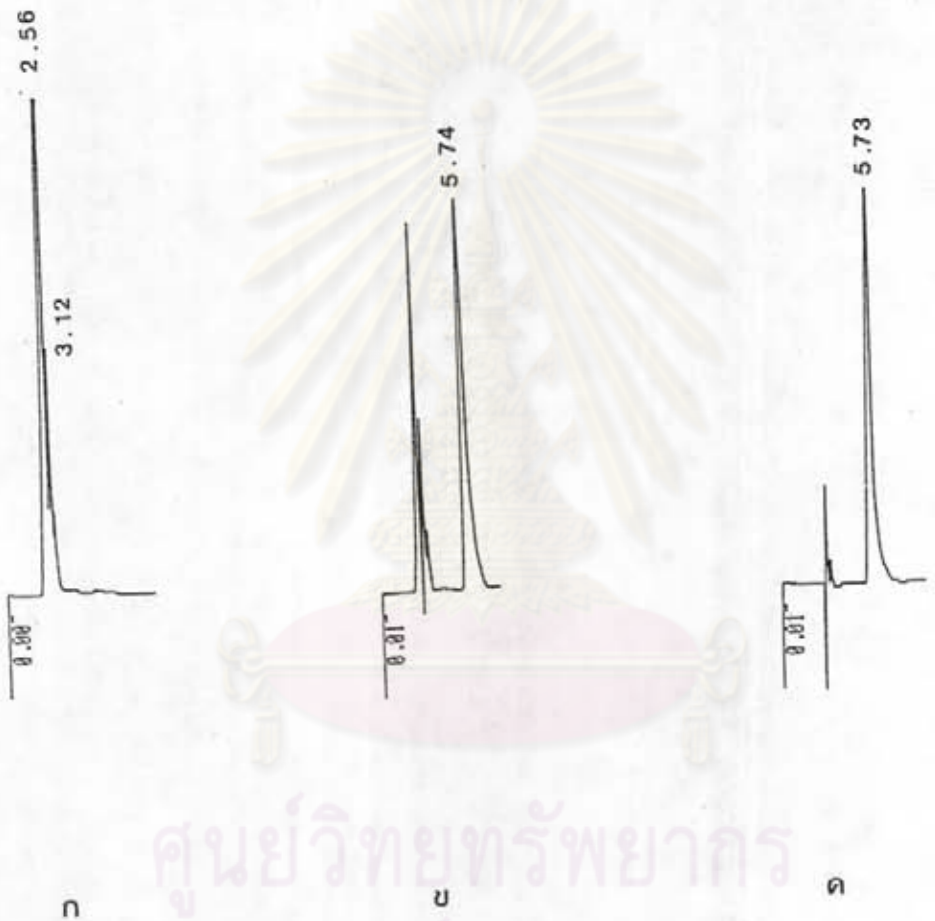
ข. ลักษณะโครมาโทแกรม

ลักษณะโครมาโทแกรมของยามีโทรนิดาโซล เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง แสดงในรูปที่ 7, 8 และ 9 ตามลำดับ

จากการศึกษาลักษณะโครมาโทแกรม สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวให้ลักษณะโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมาที่สะอาด พีคของยามีโทรนิดาโซลมีความสมมาตร, แคบ และไม่ถูกรบกวนด้วยพีคของ endogenous substance หรือสารอื่นๆ และค่า retention time ของพีคยาในสารละลายมาตรฐานในเมทานอล และในพลาสมามีค่าเหมือนกัน แสดงว่าการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ สำหรับยามีโทรนิดาโซล มีความจำเพาะเจาะจงสูง

การปรากฏของ endogenous substance ในโครมาโทแกรม เมื่อใช้เมทานอล, เอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ มีจำนวน 2 พีคเท่ากัน โดยเมื่อใช้เมทานอลจะมีค่า retention time ที่ 2.56, 3.12 นาที เมื่อใช้เอทานอล พีค endogenous substance ปรากฏที่เวลา 2.59, 4.20 นาที สำหรับแอซีโตรไนไตรล์ ค่า retention time ของ endogenous substance อยู่ที่ 2.93, 3.49 นาที

เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล หรือ เอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ เติมในสารละลายมาตรฐานของมีโทรนิดาโซลในเมทานอล จะปรากฏพีคของมีโทรนิดาโซลในโครมาโทรแกรมที่เวลา 5.73, 5.74 และ

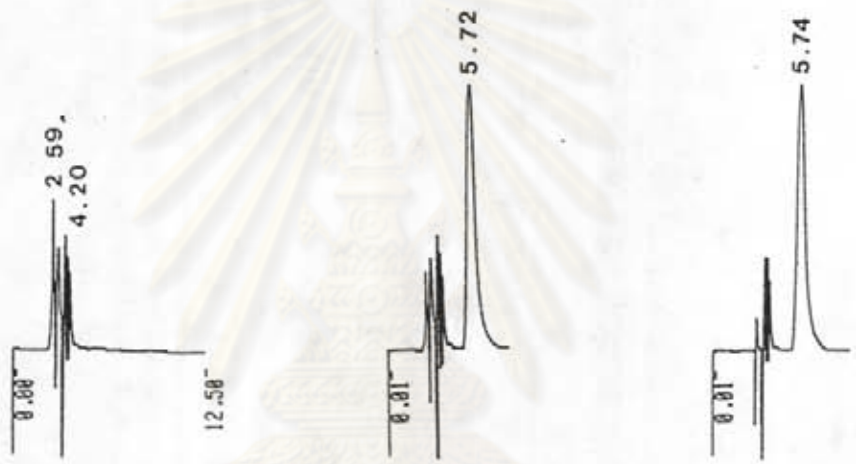


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยามิโทรนิดาโซล ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ เมทานอล เป็น สารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยา มิโทรนิดาโซล (10.0 มคก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยามิโทรนิดาโซล ในเมทานอล (10.0 มคก/มล)



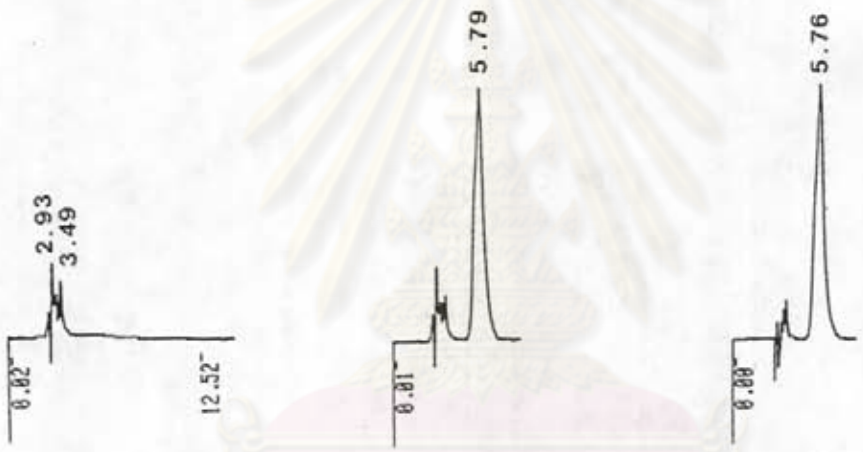
ก ข ค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยามิโทรนิดาโซล ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ เอทานอล เป็น สารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยา มิโทรนิดาโซล (10.0 มคก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยามิโทรนิดาโซล ในเมทานอล (10.0 มคก/มล)



ก ข ค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ๑ โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยามิโทรนิดาโซล ที่เติมลงในพลาสมาโดยใช้ แอซิโตรไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยา มิโทรนิดาโซล (10.0 มคก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยามิโทรนิดาโซล ในเมทานอล (10.0 มคก/มล)

5.76 นาที ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกันมากกับการเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนดังกล่าวในแบลงค์พลาสมาที่เติมยามีโทรนิดาโซล โดยพีคของยาในโครมาโทแกรมอยู่ที่เวลา 5.74, 5.72และ 5.79 นาที ตามลำดับ

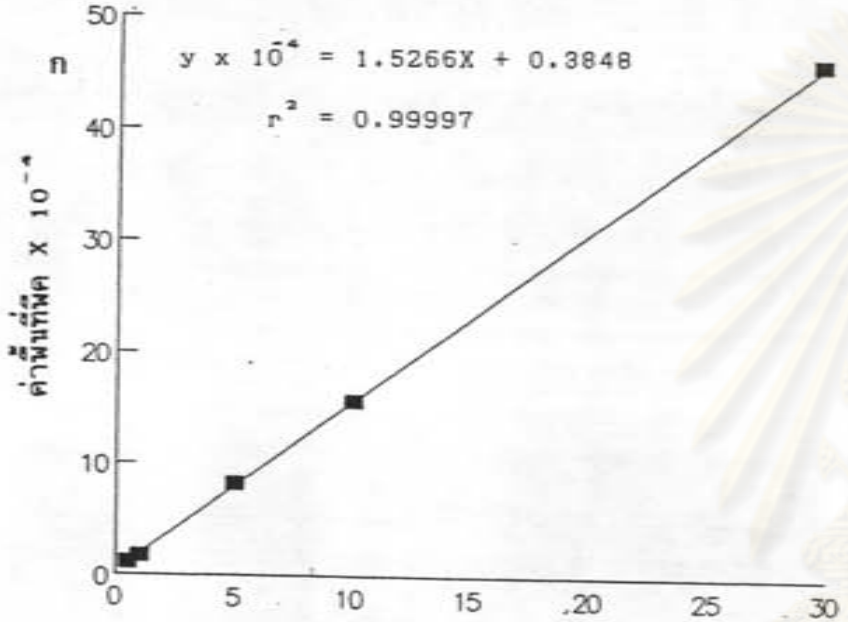
เมื่อพิจารณาทั้งลักษณะปรากฏของตะกอนพลาสมาโปรตีนและของสารละลายส่วนใสและลักษณะโครมาโทแกรมพีคของยา สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้งสามชนิดที่ใช้ คือ เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ใช้วิเคราะห์ยามีโทรนิดาโซลในพลาสมาได้ ดังนั้นจึงทำการ validate วิธีการวิเคราะห์สำหรับสารแยกพลาสมาโปรตีนแต่ละตัว

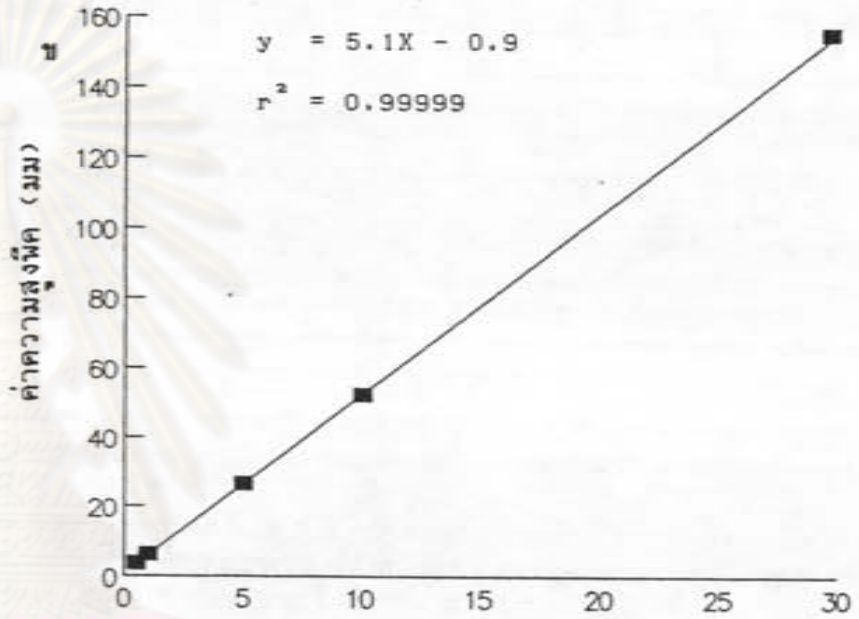
ค. <u>การ Validate วิธีวิเคราะห์</u>

ทำการ validate วิธีวิเคราะห์ยามีโทรนิดาโซลในพลาสมา เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง โดย validate ทั้งพื้นที่พีค และความสูงพีค

1. <u>Linearity</u>

จากการทดลองได้ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคกับความเข้มข้นของยามีโทรนิดาโซลในพลาสมา และความสัมพันธ์ระหว่างค่าความสูงพีคกับความเข้มข้นของยามีโทรนิดาโซลในพลาสมาเมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเมทานอล เอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์ ในช่วงความเข้มข้นของยาที่ทำการศึกษา คือ 0.5-30.0 มคก/มล. โดยพล็อตกราฟระหว่างค่าพื้นที่พีคหรือความสูงพีค (แกน y) กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา (แกน x) ได้ผลความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงเป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's law) ดังแสดงในรูป 10, 11 และ 12 ตามลำดับ โดยสมการเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) แสดงในรูปดังกล่าว



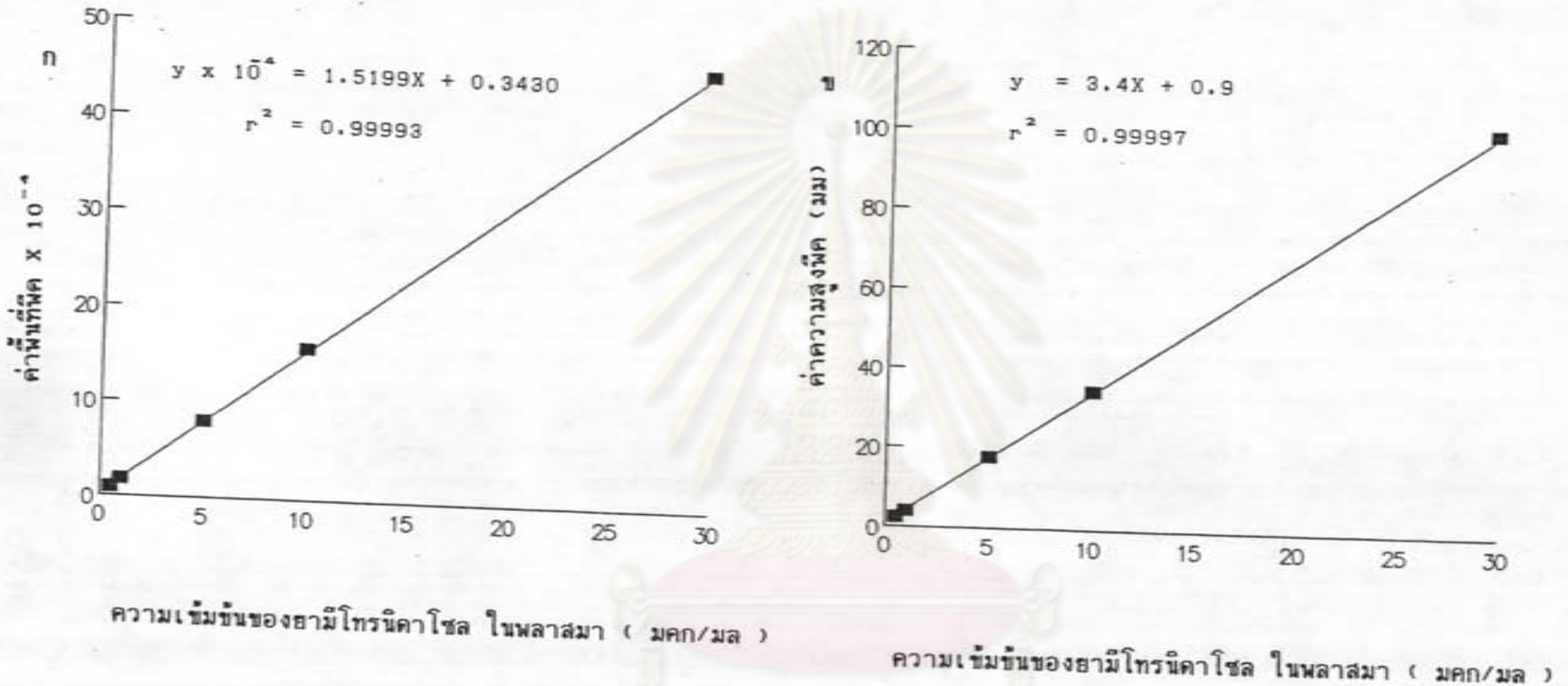


รูปที่ 10 แคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ของยามิโทรนิดาโซลในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ก. พื้นที่พีค

ข. ความสูงพีค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

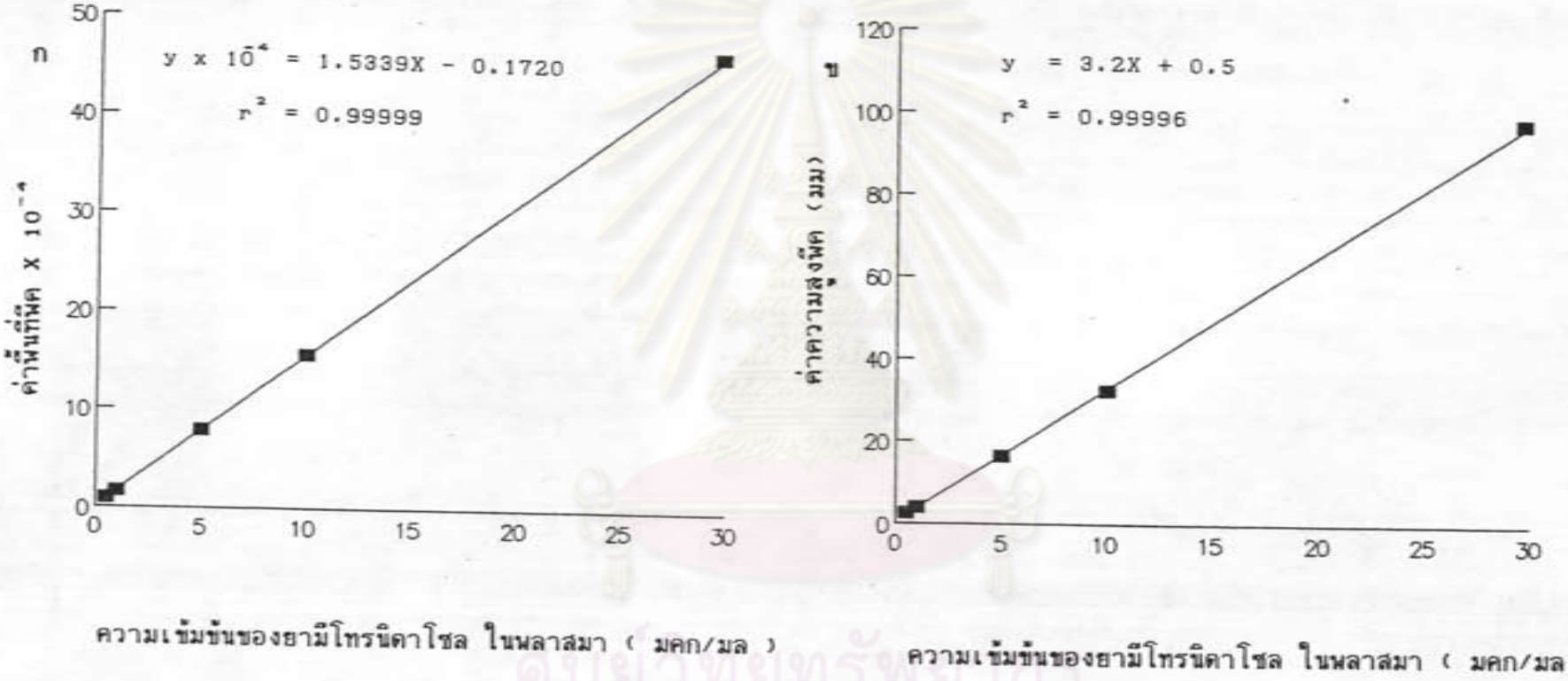


รูปที่ 11 แคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ของยามิโทรนิดาโซลในพลาสมา เมื่อใช้เอทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ก. พื้นที่พีค

ข. ความสูงพีค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 แคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ของยามิโทรนิดาโซลในพลาสมา เมื่อใช้แอซิโดรไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ก. พื้นที่พีค

ข. ความสูงพีค

2. ขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ (Lower Limit of Detection)

จากการทดลองเมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เป็น เมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยามีโทรนิดาโซล ในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 โดยค่า S/N อยู่ระหว่าง 2.4-2.7 คือความเข้มข้น 0.08, 0.10 และ 0.08 มคก/มล ตามลำดับ โดย %CV อยู่ระหว่าง 6.40-8.27% ค่า S/N และ %CV แสดงดังตารางที่ 17

ขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ เมื่อใช้เมทานอลและแอซีโตรไนไตรล์ ให้ค่าที่ความเข้มข้นเท่ากัน ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าเมื่อใช้เอทานอล

3. ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

การใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็น เมทานอล หรือ เอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง ในการวิเคราะห์หาปริมาณยามีโทรนิดาโซลในพลาสมา มีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังได้กล่าวแล้วในลักษณะโครมาโทแกรม ในข้อ 2.ข.

4. ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

ก) เปอร์เซนต์การกลับคืนของยาในการแยกออกจากพลาสมา (Physical Recovery)

ผลการทดลองหาเปอร์เซนต์การกลับคืนของยามีโทรนิดาโซลที่แยกจากพลาสมาเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานยามีโทรนิดาโซลในเมทานอล ที่ความเข้มข้นเท่ากันเมื่อใช้ เมทานอล หรือ เอทานอล หรือ

ตารางที่ 17 ค่าอัตราส่วน S/N เมื่อทำการวิเคราะห์ ยามิโทรนิดาโซล ในพลาสมา โดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล, เอทานอล และ แอซีโตรไนไตรล์

	S/N		
	เมทานอล ความเข้มข้น 0.08 มคก/มล	เอทานอล ความเข้มข้น 0.10 มคก/มล	แอซีโตรไนไตรล์ ความเข้มข้น 0.08มคก/มล
1.	3.0	2.5	2.4
2.	2.5	2.6	2.4
3.	2.8	2.5	2.2
4.	2.8	2.4	2.4
5.	2.7	2.7	2.6
6.	2.8	2.0	2.4
7.	2.4	2.4	2.7
8.	2.8	2.7	2.2
9.	2.4	2.4	2.4
10.	2.7	2.3	2.4
$\bar{X}$	2.7	2.4	2.4
SD	0.2	0.2	0.2
%CV	6.79	8.27	6.40

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนแสดงในตารางที่ 18, 19 และ 20 ตามลำดับ

สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยามากกว่า 90% ในทุกความเข้มข้นของยามีโทรนิดาโซลที่ทำการศึกษา และ %CV แต่ละความเข้มข้น < 10% โดยอยู่ระหว่าง0.63-7.40% ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีคในการคำนวณ และเปรียบเทียบความผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นเมื่อใช้พื้นที่พีคและความสูงพีค พบว่ามีความแปรผันของ %CV ระหว่างความเข้มข้นน้อย ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

ดังนั้นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่ใช้วิเคราะห์ยามีโทรนิดาโซล เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาและ %CV ได้แก่เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์

ข) เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Recovery)

เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ยามีโทรนิดาโซลในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลหรือ เอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน แสดงในตารางที่ 21, 22 และ 23 ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่าสารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัว ให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์มีความถูกต้องดี ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา และ %CV ในแต่ละความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.46-4.26 % โดยไม่มีความผันแปรของ %CV ในแต่ละความเข้มข้น ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีคในการคำนวณ

ตารางที่ 18 เปอร์เซนต์การกลับคืนของ ยามิโทรนิคาโซลในพลาสมา เมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=12)

ก.พื้นที่พีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
0.5	96.34	87.88	96.07	96.92	86.01	88.12	97.87	94.66	102.83	97.14	95.90	94.11	94.49	4.84	5.13
1.0	97.30	98.16	92.23	95.19	97.29	97.31	92.34	95.20	91.69	96.76	90.77	92.11	94.70	2.69	2.85
5.0	96.20	96.08	94.89	93.52	93.52	93.00	91.82	93.36	92.30	95.99	96.36	96.16	94.43	1.69	1.79
10.0	95.49	95.67	96.33	92.63	92.65	93.33	92.63	92.25	92.11	94.19	96.04	94.66	93.99	1.59	1.69
30.0	95.20	95.07	95.52	92.62	92.17	93.16	93.03	92.16	93.46	93.53	93.45	91.31	93.39	1.31	1.40
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													94.20	2.70	2.86

ข.ความสูงพีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
0.5	90.71	97.14	90.71	97.69	97.69	97.69	90.77	97.69	93.85	97.94	97.94	94.76	98.72	2.38	2.41
1.0	94.00	94.00	98.00	98.44	96.67	96.67	90.22	93.11	90.22	96.54	98.41	98.41	97.01	2.36	2.43
5.0	96.42	95.50	96.42	92.41	92.41	92.02	92.02	92.41	92.02	95.20	95.60	95.20	93.97	1.88	2.00
10.0	97.22	97.22	97.22	91.90	92.10	91.90	91.90	91.51	91.90	96.12	96.53	96.33	94.32	2.58	2.75
30.0	95.28	94.91	95.66	92.95	92.55	93.35	93.35	92.55	93.48	95.79	95.79	94.77	94.20	1.28	1.36
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													95.65	2.82	2.95

ตารางที่ 19 เปอร์เซนต์การกลับคืนของ ยามิโทรนิคาโซลในพลาสมา เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=12)

ก.พื้นที่พีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
0.5	96.11	92.81	98.70	102.72	104.55	99.31	101.85	96.79	94.87	92.66	98.76	95.96	97.92	3.78	3.86
1.0	96.56	95.88	95.38	101.44	97.99	95.48	99.93	91.10	96.85	92.84	98.85	87.62	95.79	3.79	3.96
5.0	101.01	100.96	99.83	100.68	99.02	93.73	102.90	101.27	98.83	98.66	99.51	99.35	99.65	2.24	2.24
10.0	100.39	100.31	100.66	100.30	100.81	100.47	101.78	100.86	100.67	102.51	102.83	102.01	101.11	0.89	0.88
30.0	99.44	99.78	99.41	100.29	100.81	101.08	100.97	101.20	99.94	99.59	100.32	99.63	100.20	0.67	0.66
												จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60	98.94	3.18	3.22

ข.ความสูงพีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
0.5	96.00	92.00	96.00	103.22	103.22	98.92	103.22	94.62	94.62	90.48	95.24	95.24	96.90	4.33	4.47
1.0	97.62	95.24	95.24	100.00	97.44	94.87	97.44	92.31	94.87	94.12	100.00	91.18	95.86	2.74	2.86
5.0	101.99	100.55	99.45	100.00	99.44	95.51	102.25	102.25	98.31	101.92	102.56	102.56	100.57	2.15	2.14
10.0	99.58	100.14	99.58	99.43	98.86	99.71	100.57	99.43	99.71	102.67	102.67	102.33	100.39	1.37	1.37
30.0	99.71	100.28	100.00	99.63	100.72	100.02	100.81	100.81	98.84	100.62	100.84	100.73	100.25	0.63	0.63
												จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60	98.79	3.20	3.24

ตารางที่ 20 เปอร์เซนต์การกลับคืนของ ยามิโทรนิดาโซลในพลาสมา เมื่อใช้ แอซิโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=12)

ก.พื้นที่พีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
0.5	84.96	98.79	100.30	104.87	101.03	104.22	87.32	98.58	96.23	86.09	96.26	104.76	96.95	7.17	7.40
1.0	97.31	104.60	93.69	103.39	103.58	97.34	99.99	94.82	101.33	98.52	101.53	99.04	99.60	3.46	3.47
5.0	96.60	101.23	98.09	104.60	102.54	100.90	102.58	101.51	101.21	100.47	99.34	101.75	100.90	2.12	2.10
10.0	103.07	99.73	99.27	100.32	101.11	100.30	100.07	101.34	101.92	102.58	100.44	101.30	100.95	1.15	1.14
30.0	103.19	101.02	101.83	100.74	100.90	100.42	102.95	101.80	100.79	101.44	101.43	101.44	101.50	0.85	0.84
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													99.98	3.97	3.97

ข.ความสูงพีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
0.5	88.00	100.00	96.00	105.26	101.05	105.26	88.42	96.84	92.63	87.80	102.44	102.44	97.18	6.61	6.80
1.0	96.00	101.33	93.33	104.70	102.01	96.64	99.33	96.64	99.33	98.51	98.51	98.51	98.74	3.01	3.04
5.0	93.84	100.88	96.77	99.70	99.70	99.09	100.30	99.09	102.13	99.67	100.99	100.33	99.37	2.18	2.19
10.0	99.56	96.63	97.51	97.37	100.68	98.57	98.27	97.97	99.77	99.34	100.33	100.33	98.86	1.33	1.34
30.0	99.30	97.42	98.61	100.41	100.64	99.92	102.08	101.05	100.85	99.66	98.31	98.88	99.76	1.33	1.33
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													98.78	3.49	3.53

ตารางที่ 21 เปอร์เซนต์การกลับคืน ของวิธีวิเคราะห์ ยามีโทรนิดาโซล ที่แยกจากพลาสมาที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ความเข้มข้นยาที่เติม (มคก/มล)	พื้นที่พีค				ความสูงพีค			
	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}$±SD	%CV	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}$±SD	%CV
2.0	2.01 1.95 2.05	100.50 97.50 102.50	100.17± 2.52	2.51	2.06 1.90 2.03	103.00 95.00 101.50	99.83± 4.25	4.26
10.0	10.00 9.99 10.10	100.00 99.90 101.00	100.30± 0.64	0.63	10.04 10.08 9.92	100.40 100.80 99.20	100.13 ±0.87	0.87
30.0	30.38 29.64 30.78	101.27 98.81 102.58	100.89± 1.91	1.90	30.52 30.04 28.82	101.73 100.15 96.07	99.51 ±3.02	3.04
	จำนวนตัวอย่าง = 9		100.45± 1.65	1.64	จำนวนตัวอย่าง=9		99.76± 2.64	2.65

ตารางที่ 22 เปอร์เซนต์การกลับคืน ของวิธีวิเคราะห์ ยามิโทรนิดาโซล ที่แยกจากพลาสมา ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ความเข้มข้นยาที่เติม (มคก/มล)	พื้นที่พีค				ความสูงพีค			
	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}$+SD	%CV	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}$+SD	%CV
10.0	9.63 10.07 9.81	96.30 100.70 98.10	98.38± 2.23	2.23	9.74 9.96 10.02	94.70 99.60 100.20	99.05± 1.50	1.51
20.0	20.21 19.95 20.07	101.06 99.74 100.34	100.38± 0.66	0.66	20.41 20.18 20.05	102.06 100.90 100.26	101.07 ±0.91	0.90
30.0	29.82 28.74 29.55	99.41 95.78 98.49	97.89± 1.89	1.93	30.16 29.14 29.41	100.54 97.15 98.04	98.58 ±1.76	1.78
	จำนวนตัวอย่าง = 9		98.88± 1.88	1.90	จำนวนตัวอย่าง=9		99.57± 1.69	1.70

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 23 เปอร์เซนต์การกลับคืน ของวิธีวิเคราะห์ ยามีโทรนิดาโซล ที่แยกจากพลาสมาที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ความเข้มข้นยาที่เติม (มคก/มล)	พื้นที่พีค				ความสูงพีค			
	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}$±SD	%CV	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}$±SD	%CV
3.0	3.03 3.01 3.02	101.13 100.23 100.50	100.62± 0.46	0.46	3.06 2.99 3.09	101.90 99.63 103.10	101.54 ±1.73	1.74
5.0	4.97 5.14 4.86	99.44 102.86 97.22	99.84± 2.84	2.84	5.04 5.06 4.94	100.74 101.16 98.72	100.21 ±1.30	1.30
20.0	20.46 20.94 19.59	102.31 104.68 98.49	101.65± 3.41	3.35	20.48 20.54 20.00	102.41 102.72 100.00	101.71 ±1.49	1.46
	จำนวนตัวอย่าง = 9		100.70± 2.36	2.35	จำนวนตัวอย่าง=9		101.15 ±1.50	1.49

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. <u>ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์</u> (Precision)

ผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ใน 1 วัน (within-run precision) และความเที่ยงตรงระหว่างวัน (between-run precision) เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือ เอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง แสดงดังตารางที่ 24-29

วิธีวิเคราะห์ยามีโทรนิดาโซล ในพลาสมาโดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวให้ค่า %CV ในการวิเคราะห์ใน 1 วันและการวิเคราะห์ระหว่างวัน อยู่ระหว่าง 0.20-7.00% และ 3.65-9.32% ตามลำดับ แสดงว่ามีความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ใน 1 วัน และระหว่างวันดี โดยมีค่าความผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นน้อย ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่พีค หรือค่าความสูงพีคที่ได้จากการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ โดยการหา linearity เช่นเดียวกับหัวข้อ Validation(หน้า25) ได้ผลความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงโดยมีค่าความชันของกราฟ (slope), จุดตัดแกน y (intercept) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) แสดงในตารางความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

จากชุดเส้นกราฟมาตรฐาน เมื่อใช้พื้นที่พีคและความสูงพีค ได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของความชันของกราฟ (slope) และจุดตัดแกน y (intercept) ที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่า %CV ของค่าความชันของกราฟในการวิเคราะห์ใน 1 วัน และระหว่างวันอยู่ระหว่าง 0.39-1.04% และ 5.76-9.02% ตามลำดับ ดังนั้นไม่ว่าจะทำการวิเคราะห์ใน 1 วัน หรือระหว่างวัน ก็ให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่ต่างกัน

ตารางที่ 24 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ธามีโทรนิดาโซล ในพลาสมา ใน 1 วัน (within-run precision) เมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=6)

ก. พื้นที่พีค x 10^{-4}									
ความเข้มข้น มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	SD	%CV
0.5	1.1029	1.0000	1.0199	1.1118	1.0816	1.1586	1.0791	0.0595	5.52
1.0	1.7302	1.7647	1.7651	1.8479	1.7303	1.8371	1.7792	0.0515	2.90
5.0	8.2380	8.2378	8.1967	8.1027	8.2249	8.1409	8.1902	0.0564	0.69
10.0	15.7052	15.7095	15.8133	15.7058	15.6482	15.6256	15.7013	0.0651	0.42
30.0	46.1355	45.9332	46.3776	46.3209	45.9287	46.5149	46.2018	0.2426	0.52
slope x 10^{-4}	1.5266	1.5206	1.5362	1.5322	1.5198	1.5393	1.5291	0.0812	0.53
intercept x 10^{-4}	0.3848	0.3873	0.3476	0.3672	0.3890	0.3247	0.3668	0.0260	
r^2	0.99997	0.99996	0.99997	0.99999	0.99996	0.99999			
ข. ความสูงพีค (มม.)									
0.5	3.5	3.5	3.5	3.6	3.5	3.7	3.6	0.1	2.36
1.0	6.1	6.0	6.0	6.2	5.8	6.2	6.0	0.2	2.51
5.0	26.6	26.6	26.5	26.5	26.6	26.5	26.6	0.1	0.21
10.0	52.5	52.3	52.2	52.2	52.0	52.2	52.2	0.1	0.20
30.0	155.4	154.8	156.0	156.0	154.8	156.2	155.5	0.6	0.40
slope	5.1	5.1	5.2	5.2	5.1	5.2	5.2	0.0	0.39
intercept	0.9	0.9	0.7	0.8	0.8	0.8	0.8	0.1	
r^2	0.99999	0.99999	0.99999	0.99999	0.99999	0.99999			

ตารางที่ 25 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาปฏิชีวนะ ในพลาสมา ใน 1 วัน (within-run precision) เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=6)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	SD	%CV
ก. พื้นที่พีค x 10^{-4}									
0.5	0.8739	0.8895	0.8449	0.8665	0.8234	0.8071	0.8509	0.0315	3.71
1.0	1.7873	1.7334	1.6891	1.7678	1.6116	1.7132	1.7171	0.0628	3.66
5.0	8.0190	7.8865	7.4652	8.1957	8.0663	7.8715	7.9174	0.2520	3.18
10.0	15.8940	15.9741	15.9199	16.1286	16.1286	15.9527	15.9752	0.0821	0.51
30.0	45.8163	46.0546	46.1807	46.1300	46.2330	45.6589	46.0122	0.2263	0.49
slope x10^{-4}	1.5199	1.5298	1.5384	1.5302	1.5374	1.5176	1.5289	0.0866	0.57
intercept x10^{-4}	0.3430	0.2806	0.1124	0.3867	0.2455	0.2872	0.2889	0.0928	
r^2	0.99926	0.99993	0.99989	0.99987	0.99991	0.99988			
ข. ความสูงพีค (มม.)									
0.5	2.4	2.4	2.3	2.4	2.2	2.2	2.3	0.1	4.24
1.0	3.9	3.8	3.7	3.8	3.6	3.7	3.8	0.1	2.80
5.0	17.8	17.7	17.0	18.2	18.2	18.5	17.9	0.5	2.96
10.0	34.8	34.6	34.9	35.2	34.8	34.9	34.9	0.2	0.56
30.0	101.3	102.0	101.7	102.5	102.5	100.5	101.8	0.8	0.76
slope	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.3	3.4	0.0	0.81
intercept	0.8	0.7	0.5	0.8	0.6	1.0	0.7	0.2	
r^2	0.99997	0.99999	0.99996	0.99996	0.99996	0.99999			

ตารางที่ 26 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาปิโตรนิดาโซล ในพลาสมา ใน 1 วัน (within-run precision) เมื่อใช้ แอซิโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=6)

ก.พื้นที่พีค x 10^{-4}									
ความเข้มข้น มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	SD	%CV
0.5	0.9376	0.9033	0.9318	0.7807	0.8814	0.8604	0.8825	0.0579	6.56
1.0	1.6303	1.6332	1.5348	1.5766	1.4651	1.5971	1.5780	0.0546	3.46
5.0	7.8443	7.6898	7.5669	7.6933	7.6127	7.5901	7.6662	0.1015	1.32
10.0	15.6184	15.7432	15.6160	15.5801	15.7771	15.8674	15.7003	0.1131	0.72
30.0	46.1537	46.2306	46.0109	47.1705	46.6392	46.1797	46.3974	0.4336	0.93
slopex10^{4}	1.5339	1.5382	1.5323	1.5734	1.5554	1.5385	1.5453	0.0160	1.04
intercept x10^{-4}	0.1720	0.1341	0.0817	-0.0726	0.0162	0.1111	0.0738	0.0869	
r^2	0.99999	0.99997	0.99997	0.99999	0.99997	0.99993			
ข.ความสูงพีค(มม.)									
0.5	2.5	2.4	2.5	2.1	2.3	2.2	2.3	0.2	7.00
1.0	3.9	3.8	3.6	3.7	3.6	3.7	3.7	0.1	3.14
5.0	16.4	16.4	16.3	16.5	16.3	16.8	16.4	0.2	1.14
10.0	32.4	33.5	32.8	32.7	32.6	33.2	32.9	0.4	1.24
30.0	97.8	98.0	97.3	99.4	98.4	98.2	98.2	0.7	0.72
slope	3.2	3.2	3.2	3.3	3.3	3.3	3.3	0.0	0.82
intercept	0.5	0.6	0.5	0.2	0.3	0.5	0.4	0.2	
r^2	0.99996	0.99997	0.99998	0.99997	0.99997	0.99999			

ตารางที่ 27 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยามิโทรนิดาโซล ในพลาสมา ระหว่างวัน (between-run precision) เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ก.พื้นที่พีค $x10^{-4}$						
ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	$\bar{X}$	SD	%CV
0.5	0.9203	1.0000	0.8596	0.9266	0.0704	7.60
1.0	1.9191	1.7647	1.6610	1.7816	0.1299	7.29
5.0	9.2863	8.2378	8.0022	8.5088	0.6836	8.03
10.0	18.0648	15.7095	15.8402	16.5382	1.3237	8.00
30.0	53.8368	45.9332	46.8230	48.8643	4.3292	8.86
slope $x10^{-4}$	1.7903	1.5206	1.5570	1.6227	0.1464	9.02
intercept $x10^{-4}$	0.1552	0.3873	0.1568	0.2331	0.1335	
r^2	0.99999	0.99996	0.99999			
ข.ความสูงพีค(มม.)						
0.5	3.0	3.5	3.4	3.3	0.3	8.02
1.0	5.2	6.0	5.8	5.7	0.4	7.35
5.0	23.0	26.6	26.4	25.3	2.9	7.99
10.0	46.8	52.3	52.2	50.4	3.1	6.24
30.0	139.0	154.8	156.3	150.0	9.6	6.39
slope	4.6	5.1	5.2	5.0	0.3	6.31
intercept	0.5	0.9	0.6	0.7	0.2	
r^2	0.99998	0.99999	0.99999			

ตารางที่ 28 ความเที่ยงตรง ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยามีโทรนิดาโซล ในพลาสมาระหว่างวัน(between-run precision) เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	$\bar{X}$	SD	%CV
ก.พื้นที่พีค $x10^{-4}$						
0.5	0.9447	0.8895	1.0095	0.9479	0.0601	6.34
1.0	1.8025	1.7334	1.9226	1.8195	0.0957	5.26
5.0	8.2499	7.8865	8.5197	8.2187	0.3178	3.87
10.0	16.1763	15.9199	17.6229	16.5730	0.9182	5.54
30.0	47.2577	46.1807	51.2799	48.2394	2.6876	5.57
slopex10^{4}	1.5676	1.5278	1.7049	1.6007	0.0921	5.76
intercept $x10^{-4}$	0.3084	0.2806	0.2156	0.2681	0.0475	
r^2	0.99997	0.99992	0.99995			
ข.ความสูงพีค(มม.)						
0.5	2.3	2.4	2.0	2.2	0.2	9.32
1.0	4.0	3.8	3.4	3.7	0.3	8.18
5.0	18.4	17.7	16.0	17.4	1.2	7.11
10.0	35.5	34.6	30.8	33.6	2.5	7.42
30.0	103.8	102.0	90.0	98.6	7.5	7.61
slope	3.4	3.4	3.0	3.3	0.2	7.62
intercept	0.8	0.7	0.7	0.7	0.1	
r^2	0.99997	0.99999	0.99996			

ตารางที่ 29 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาฮิโทรนิดาโซล ในพลาสมา ระหว่างวัน (between-run precision) เมื่อใช้ แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	$\bar{X}$	SD	%CV
ก.พื้นที่พีค $x10^{-4}$						
0.5	0.9620	0.9033	1.0385	0.9680	0.0678	7.00
1.0	1.6762	1.6332	1.7547	1.6880	0.0616	3.65
5.0	7.8387	7.6898	8.5409	8.0231	0.4545	5.67
10.0	15.5729	15.7432	17.2893	16.2018	0.9456	5.84
30.0	46.4187	46.2306	52.3841	48.3444	3.4997	7.24
slope $x10^{-4}$	1.5421	1.5383	1.7447	1.6084	0.1181	7.34
intercept $x10^{-4}$	0.1524	0.1341	-0.0246	0.0873	0.0973	
r^2	0.99999	0.99997	0.99998			
ข.ความสูงพีค(มม.)						
0.5	2.5	2.4	2.1	2.3	0.2	8.92
1.0	3.8	3.8	3.3	3.6	0.3	7.94
5.0	17.0	16.4	15.2	16.2	0.9	5.66
10.0	33.0	33.5	30.3	32.3	1.7	5.34
30.0	98.3	98.0	87.5	94.6	6.2	6.50
slope	3.3	3.2	2.9	3.1	0.2	6.48
intercept	0.7	0.6	0.7	0.7	0.1	
r^2	0.99999	0.99997	0.99995			

จากการ validate วิธีวิเคราะห์ การใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเมทานอล เอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ เมื่อใช้พื้นที่พีคและความสูงพีคในการคำนวณ มีความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) และความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision) ดีโดยมีค่า %CV ระหว่าง 1-7% และ 1-7% ตามลำดับ และมีความผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นที่ทำการศึกษาน้อย ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดคือ ระหว่าง 90-100% สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัว จึงใช้วิเคราะห์หาปริมาณยามีโทรนิดาโซลในพลาสมา

ดังนั้นการจากการพิจารณาลักษณะปรากฏของตะกอนพลาสมาโปรตีนและสารละลายส่วนใส, ลักษณะโครมาโทแกรมพีคของยา และการ validate วิธีวิเคราะห์ สารแยกพลาสมาโปรตีนที่ใช้วิเคราะห์ยามีโทรนิดาโซลในพลาสมาได้เมื่อยึดตามเกณฑ์ในการศึกษานี้ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์

การวิเคราะห์หาปริมาณยามีโทรนิดาโซลในพลาสมาที่มีการวิเคราะห์ด้วยวิธีทาง HPLC ที่มีรายงานการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนได้แก่การใช้แอซีโตรไนไตรล์(Hackett and Dusci,1979) แต่ไม่มีการแสดงโครมาโทแกรมของยาในพลาสมาและไม่รายงานความเที่ยงตรง โดยค่าความถูกต้องรายงานเป็นค่าเฉลี่ยโดยไม่แสดง %CV และการใช้เอทานอล (Roberto, et al, 1978) ซึ่งรายงานนี้ไม่แสดงค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์และรายงานความเที่ยงตรงทำเพียงความเข้มข้นเดียวโดยขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์มีความเข้มข้นสูงกว่าที่ทำการศึกษา ดังนั้นการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัว ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ ในการศึกษานี้ เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ยามีโทรนิดาโซลในพลาสมา โดยใช้ได้ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

3. ไนโตรฟิวแรนโตอิน

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมา ได้ผลเรียงลำดับแต่ละหัวข้อดังนี้

ก. ลักษณะปรากฏ

ลักษณะปรากฏของตัวอย่างพลาสมาที่ spike ยาไนโตรฟิว-แรนโตอิน และใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็น เมทานอล หรือ เอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง จะให้ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีนและสารละลายส่วนใสแสดงในตารางที่ 30

สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัว ให้ลักษณะตะกอนที่อัดแน่นแยกจากสารละลายส่วนใสอย่างชัดเจน และสารละลายส่วนใส ใสสะอาดปริมาตรมาก และมี pH เป็นกลาง = 7.0 จึงฉีดเข้า HPLC วิเคราะห์หาปริมาณได้ทันที

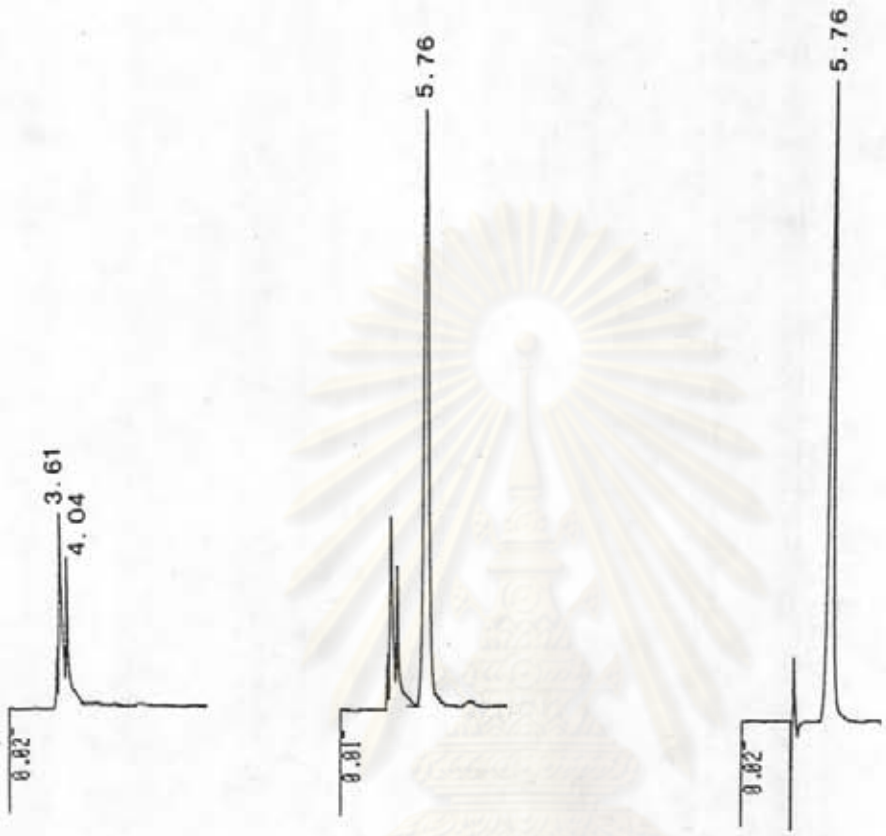
ข. ลักษณะโครมาโทแกรม

ลักษณะโครมาโทแกรมของยามีโทรนิดาโซล เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็น เมทานอลหรือ เอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ แสดงดังรูปที่ 13, 14 และ 15 ตามลำดับ

จากการศึกษาลักษณะโครมาโทแกรม สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวให้ลักษณะโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมาที่สะอาด พีคของยาไนโตรฟิวแรนโตอินมีความสมมาตร, แคบ และไม่ถูกรบกวนด้วยพีคของ endogenous substance หรือสารอื่นๆ และค่า retention time ของพีค

ตารางที่ 30 ลักษณะปรากฏเมื่อเติม สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์ ลงในพลาสมาที่ spike ยาไนโตรฟิวแรนโตอิน

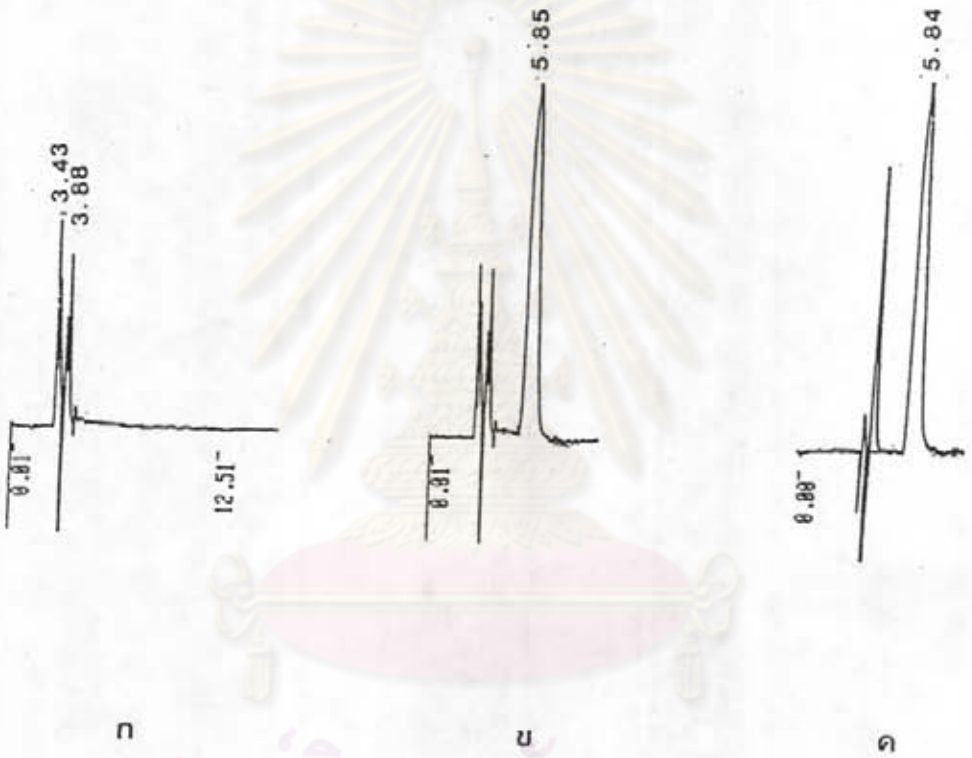
ลักษณะปรากฏ	สารแยกพลาสมาโปรตีน		
	เมทานอล	เอทานอล	แอซีโตรไนไตรล์
1. เมื่อเติมสารแยก-พลาสมาโปรตีน			
-ลักษณะและสีของตะกอน	ตะกอนขุ่นขาว, เบา		ตะกอนขุ่นขาว, หนัก
-ความเร็วในการแยกตัวออกจากพลาสมา	แยกตัวอย่างรวดเร็ว	แยกตัวอย่างรวดเร็ว	แยกตัวทันที
2. หลังวอเทกซ์			
-ลักษณะตะกอน	เบา	เบา	ก้อนขนาดใหญ่
-สีตะกอน	ขาว-เหลือง	ขาว-เหลือง	เหลืองเข้ม
-ความเร็วของตะกอนในการตกลงสู่ก้นหลอด	ค่อยๆตกลงสู่ก้นหลอด	ค่อยๆตกลงสู่ก้นหลอด	ตกลงสู่ก้นหลอดทันที
3. หลังเซนตริฟิวก์			
-ตะกอน			
-ลักษณะและความอัดแน่นของตะกอน	อนุภาคเล็กๆอัดตัวกันแน่น	อนุภาคเล็กๆอัดตัวกันแน่น	ก้อนตะกอนขนาดใหญ่อัดตัวกันแน่น
-สีของตะกอน	ขาว	ขาว	เหลือง-น้ำตาล
-สารละลายส่วนใส			
-ความใส	ใสสะอาด	ใสสะอาด	ใสสะอาด
-สีของสารละลาย	เหลืองอ่อน สีเข้มขึ้นตามความเข้มข้น	เหลืองอ่อน สีเข้มขึ้นตามความเข้มข้น	เหลืองอ่อน สีเข้มขึ้นตามความเข้มข้น
-ปริมาตร (มล.)	2.05-2.15	2.05-2.15	2.30-2.40
-pH	7.0	7.0	7.0



ก ข ค

รูปที่ 13 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาไนโตรฟิวแรนโตอิน ที่เติมลงในพลาสมาโดยใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยา ไนโตรฟิวแรนโตอิน (10.0 มคก/มล) ตามลำดับ รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาไนโตรฟิวแรน-โตอิน ในเมทานอล (10.0 มคก/มล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



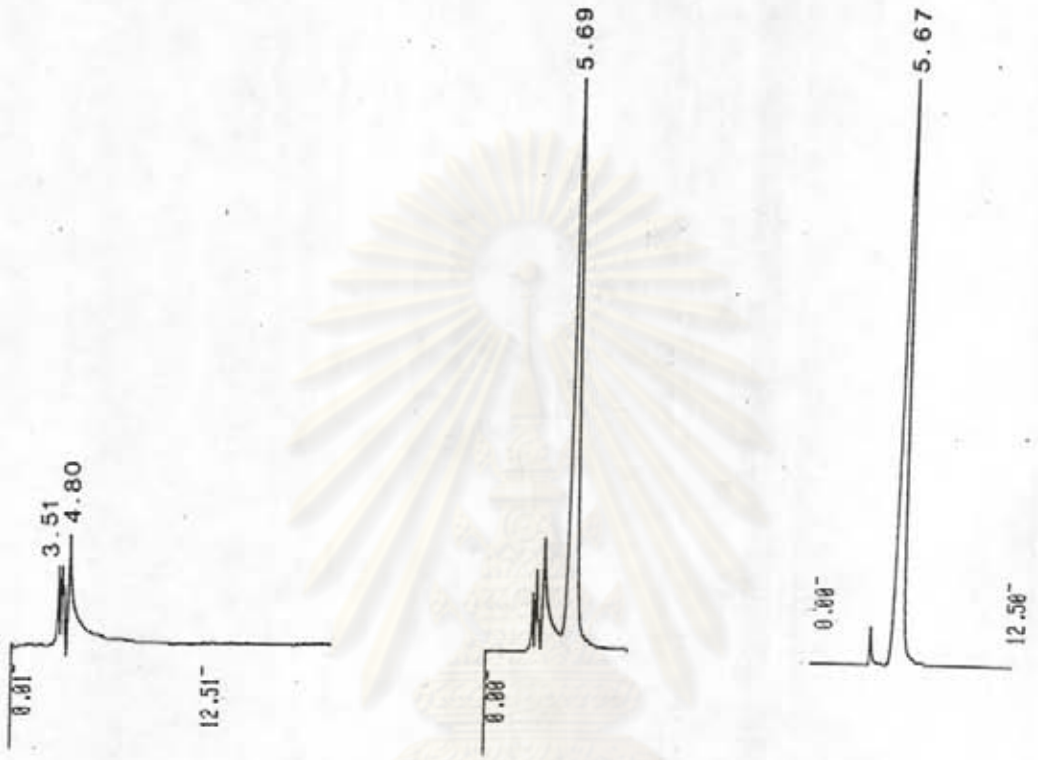
ก ข ค

รูปที่ 14 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาไนโตรฟิวแรนโตอิน ที่เติมลงในพลาสมาโดยใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยา ไนโตรฟิวแรนโตอิน (10.0 มคก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาไนโตรฟิวแรน-โตอิน ในเมทานอล (10.0 มคก/มล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก ข ค

รูปที่ 15 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาไนโตรฟิวแรนโตอินที่เติมลงในพลาสมาโดยใช้ แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยา ไนโตรฟิวแรนโตอิน (10.0 มคก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาไนโตรฟิวแรนโต-อิน ในเมทานอล (10.0 มคก/มล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ยาในสารละลายมาตรฐานในเมทานอล และในพลาสมามีค่าเหมือนกัน แสดงว่าการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์สำหรับยาไนโตรฟิวแรนโตอิน มีความจำเพาะเจาะจงสูง

การปรากฏของ endogenous substance ในโครมาโทแกรม เมื่อใช้เมทานอลหรือเอทานอลหรือแอซีโตรไนไตรล์ มีจำนวน 2 พีคเท่ากันโดยเมื่อใช้เมทานอลจะมีค่า retention time ที่ 3.61 กับ 4.04 นาที เมื่อใช้เอทานอล พีค endogenous substance ปรากฏที่เวลา 3.43 กับ 3.88 นาที สำหรับแอซีโตรไนไตรล์ ค่า retention time ของ endogenous substance อยู่ที่ 3.51 กับ 4.80 นาที

เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล หรือ เอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ เติมในสารละลายมาตรฐานไนโตรฟิวแรนโตอินในเมทานอล จะปรากฏพีคของไนโตรฟิวแรนโตอินในโครมาโทแกรมที่เวลา 5.76, 5.84 และ 5.67 นาที ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกันมากกับการเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนดังกล่าวในแบลงค์พลาสมาที่เติมยาไนโตรฟิวแรนโตอิน โดยพีคของยาในโครมาโทแกรม อยู่ที่เวลา 5.76, 5.85 และ 5.69 นาที ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาทั้งลักษณะปรากฏของตะกอนพลาสมาโปรตีนและของสารละลายส่วนใสและลักษณะโครมาโทแกรมพีคของยา สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้งสามชนิดที่ใช้ คือ เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ใช้วิเคราะห์ยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมาได้ ดังนั้นจึงทำการ validate วิธีการวิเคราะห์สำหรับสารแยกพลาสมาแต่ละตัว

ค. การ Validate วิธีวิเคราะห์

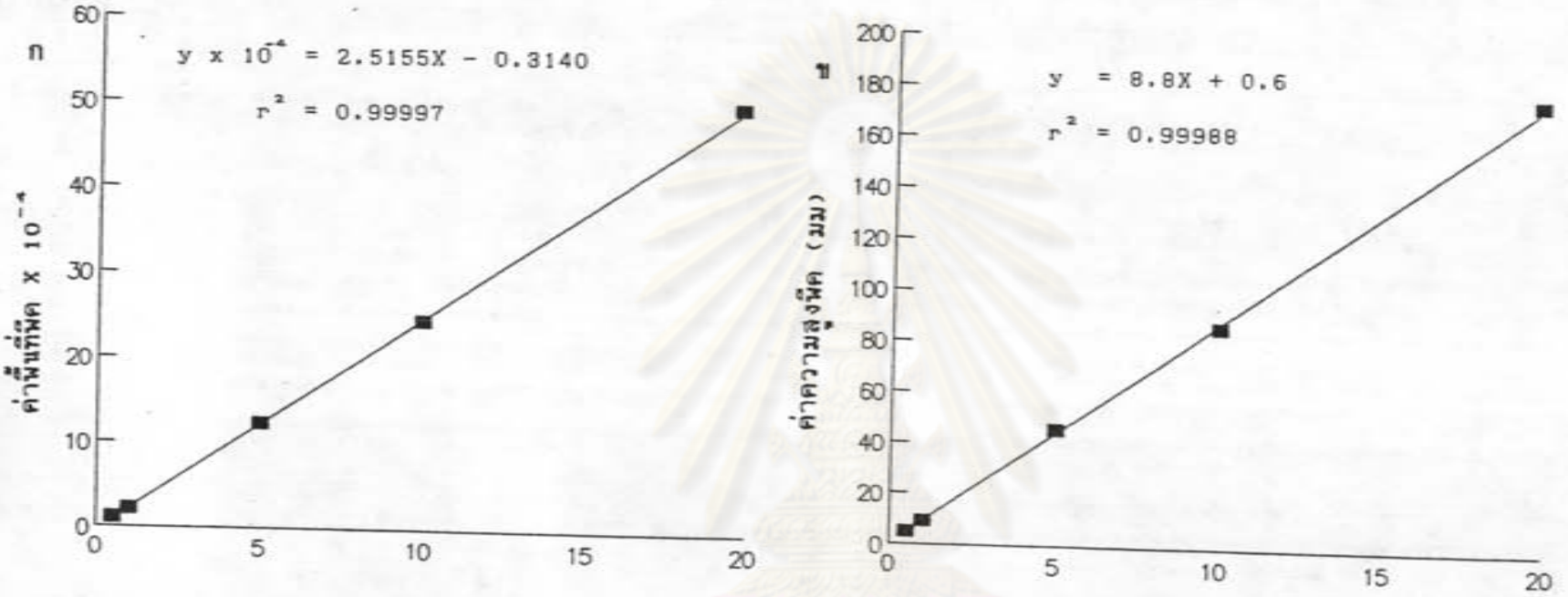
ทำการ validate วิธีวิเคราะห์ยาไนโตรฟิวแรนโตอิน ในพลาสมา เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ โดย validate ทั้งพื้นที่พีค และความสูงพีค

1. Linearity

จากการทดลองได้ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคกับความเข้มข้นของยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมา และความสัมพันธ์ระหว่างค่าความสูงพีคกับความเข้มข้นของยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมาเมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์ ในช่วงความเข้มข้นของยาที่ทำการศึกษา คือ 0.50-20.0 มคก/มล. โดยพล็อตกราฟระหว่างค่าพื้นที่พีคหรือความสูงพีค (แกน y) กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา (แกน x) ได้ผลความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงเป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's law) ดังแสดงในรูป 16, 17 และ 18 ตามลำดับ โดยสมการเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) เมื่อใช้ เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ แสดงในรูปดังกล่าว

2. ขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ (Lower Limit of Detection)

จากการทดลองเมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาไนโตรฟิวแรนโตอิน ในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 โดยค่า S/N อยู่ระหว่าง 2.2-2.4 คือความเข้มข้น 0.05, 0.10 และ 0.05 มคก/มล ตามลำดับ โดย %CV อยู่ระหว่าง 5.18-7.21% ค่า S/N และ %CV แสดงดังตารางที่ 31

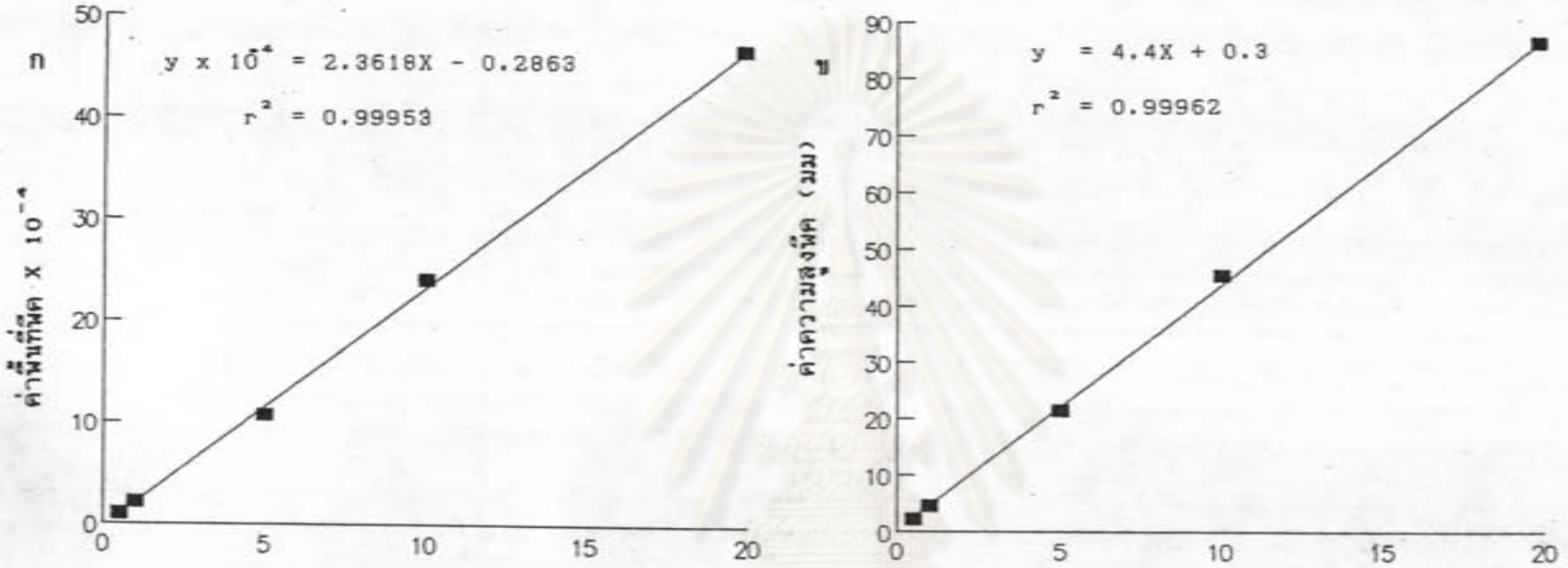


รูปที่ 16 แคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ของยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ก. พื้นที่พีค

ข. ความสูงพีค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

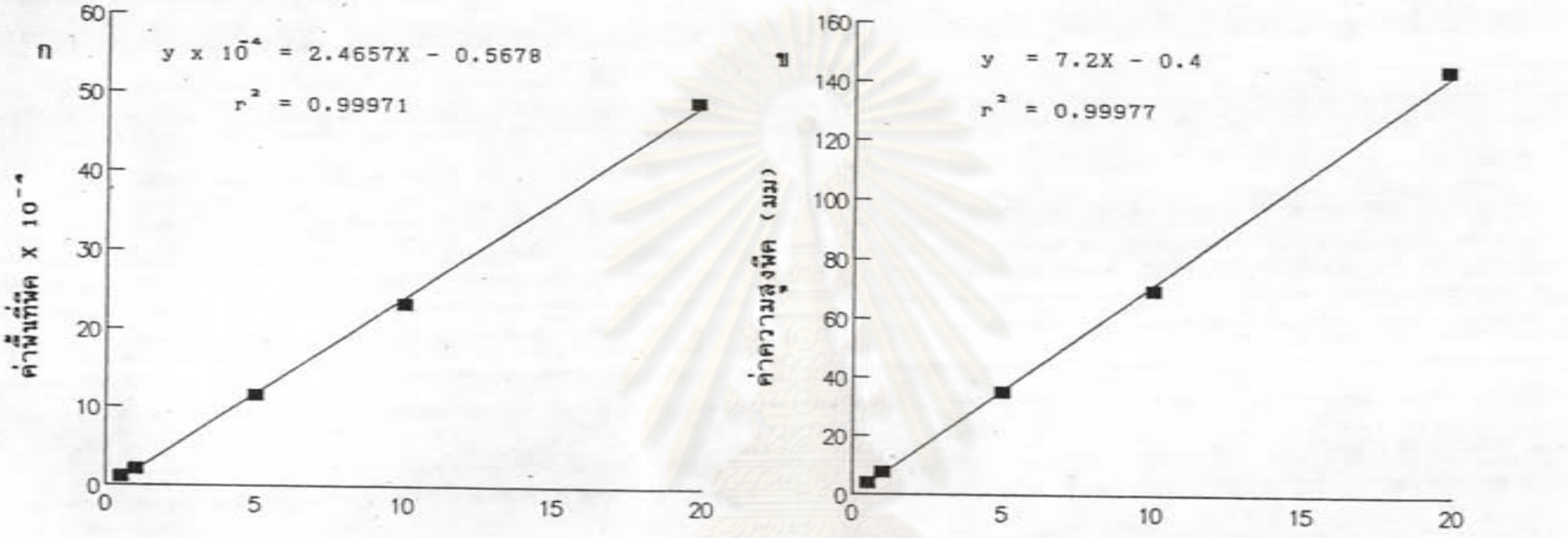


รูปที่ 17 แคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ของยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมา เมื่อใช้เอทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ก. พื้นที่พีค

ข. ความสูงพีค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 แคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ของยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมา เมื่อใช้แอซิโตรไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ก. พื้นที่พีค

ข. ความสูงพีค

ตารางที่ 31 ค่าอัตราส่วน S/N เมื่อทำการวิเคราะห์ ยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมา โดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล, เอทานอล และ แอซีโตรไนไตรล์

	S/N		
	เมทานอล ความเข้มข้น 0.05 มคก/มล	เอทานอล ความเข้มข้น 0.10 มคก/มล	แอซีโตรไนไตรล์ ความเข้มข้น 0.05มคก/มล
1.	2.1	2.2	2.6
2.	2.3	2.2	2.6
3.	2.2	2.5	2.4
4.	2.4	2.2	2.4
5.	2.0	2.1	2.2
6.	2.2	2.4	2.2
7.	2.1	2.3	2.6
8.	2.2	2.4	2.4
9.	2.2	2.3	2.1
10.	2.2	2.2	2.6
$\bar{X}$	2.2	2.3	2.4
SD	0.1	0.1	0.2
%CV	5.18	5.70	7.21

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ เมื่อใช้เมทานอลหรือแอซีโตรไนไตรล์ ให้ค่าที่ความเข้มข้นเท่ากัน ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าเมื่อใช้เอทานอล

3. ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

การใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมา มีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังได้กล่าวแล้วในลักษณะโครมาโทแกรม ในข้อ 3.ข.

4. ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

ก) เปอร์เซนต์การกลับคืนของยาในการแยกออกจากพลาสมา (Physical Recovery)

ผลการทดลองหาเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาไนโตรฟิวแรนโตอินที่แยกจากพลาสมาเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานไนโตรฟิวแรนโตอินในเมทานอล ที่ความเข้มข้นเท่ากันเมื่อใช้ เมทานอลหรือเอทานอลหรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนแสดงในตารางที่ 32, 33 และ 34 ตามลำดับ

สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยามากกว่า 90% ในทุกความเข้มข้นของไนโตรฟิวแรนโตอินที่ทำการศึกษา และ %CV แต่ละความเข้มข้น < 10% โดยอยู่ระหว่าง 1-7% ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีคในการคำนวณ และเปรียบเทียบความผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นเมื่อใช้พื้นที่พีคและความสูงพีค พบว่ามีความแปรผันของ %CV ระหว่างความเข้มข้นน้อย ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

ตารางที่ 32 เปอร์เซนต์การกลับคืนของ อาไนโตรฟิวแรนโดอินในพลาสมา เมื่อใช้ เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=12)

ก.พื้นที่พีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
0.5	104.37	102.14	98.59	97.53	96.66	101.47	99.85	99.01	103.39	94.87	100.30	97.79	99.66	2.82	2.83
1.0	95.05	98.22	101.18	97.12	99.01	97.43	100.74	101.45	101.48	92.51	94.75	94.64	97.80	3.01	3.14
5.0	100.66	100.28	100.64	100.59	97.66	99.49	100.14	97.77	98.36	90.43	93.30	92.22	97.63	3.62	3.71
10.0	99.55	97.55	101.66	99.62	100.70	101.67	102.37	101.17	100.86	93.43	91.97	92.13	98.56	3.87	3.93
20.0	99.62	99.42	98.55	101.61	97.92	102.51	99.28	98.58	100.55	95.20	95.90	95.13	98.69	2.37	2.40
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													98.47	3.17	3.22

ข.ความสูงพีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
0.5	102.04	102.04	97.96	98.43	96.34	102.62	98.43	94.24	100.52	93.75	95.83	93.75	98.00	3.28	3.35
1.0	97.11	98.27	101.73	97.61	98.68	98.68	99.73	100.80	100.80	93.18	94.32	94.32	97.94	2.78	2.84
5.0	100.33	99.89	100.11	100.33	97.27	98.15	101.42	97.06	94.44	91.43	91.90	92.38	97.06	3.64	3.75
10.0	99.53	98.84	100.00	97.50	99.30	98.85	99.41	100.08	99.97	91.19	91.19	91.19	97.25	3.72	3.83
20.0	98.07	98.87	98.87	100.48	99.00	101.74	100.60	100.37	101.51	95.06	94.45	95.06	98.73	2.56	2.60
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													97.80	3.18	3.25

ตารางที่ 33 เปอร์เซนต์การกลับคืนของ ยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมา เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=12)

ก.พื้นที่พีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
0.5	89.39	91.30	90.70	90.65	96.75	89.09	92.81	88.35	87.00	99.95	93.90	90.05	91.56	3.85	5.64
1.0	92.86	94.34	95.85	98.26	90.60	92.84	99.03	95.63	92.41	91.10	91.40	89.96	93.69	2.96	3.16
5.0	91.42	96.87	98.19	90.50	100.05	92.26	96.07	92.44	94.26	96.47	97.11	99.71	95.41	3.18	3.33
10.0	94.46	96.14	97.69	100.08	97.98	98.82	99.21	99.08	95.40	96.01	95.64	96.17	97.29	1.79	1.84
20.0	96.12	96.00	97.95	96.21	96.40	97.85	99.31	98.28	95.62	95.32	96.49	94.46	96.67	1.40	1.44
												จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60	94.27	4.43	4.70

ข.ความสูงพีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
0.5	93.62	93.62	93.62	94.62	98.92	90.32	94.62	90.32	90.32	89.29	96.43	89.29	92.92	3.05	3.28
1.0	95.74	93.62	97.87	100.00	95.56	97.78	97.78	100.00	95.56	98.18	90.90	96.36	96.61	2.60	2.69
5.0	94.00	98.49	98.93	96.29	100.79	96.29	98.99	98.99	94.49	94.19	93.79	95.79	96.75	2.40	2.48
10.0	97.61	97.61	97.61	99.62	96.33	97.21	98.74	99.40	95.24	95.19	94.99	96.37	97.16	1.59	1.64
20.0	98.37	97.28	98.37	95.51	97.49	97.16	98.04	98.04	95.95	95.05	96.53	94.55	96.82	1.33	1.37
												จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60	96.06	2.72	2.83

ตารางที่ 34 เปอร์เซนต์การกลับคืนของ ยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมาเมื่อใช้ แอซิโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=12)

ก.พื้นที่นัด

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
0.5	100.29	98.16	99.63	99.64	93.41	99.80	99.96	97.71	87.71	98.04	97.74	102.21	98.64	2.19	2.21
1.0	96.32	94.51	98.11	93.93	95.91	96.24	94.75	92.73	98.00	92.14	97.87	96.68	95.62	1.97	2.06
5.0	95.67	95.33	99.47	95.66	101.34	95.23	99.84	98.27	97.63	96.59	97.77	97.22	97.50	1.96	2.01
10.0	98.22	97.61	99.24	99.87	101.69	99.28	98.76	99.47	98.55	93.13	94.36	98.16	98.19	2.34	2.38
20.0	99.71	98.84	100.93	100.50	97.64	101.26	101.19	100.23	100.63	97.11	97.25	94.95	96.19	2.02	2.04
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													97.83	2.38	2.43

ข.ความสูงนัด

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
0.5	100.00	97.37	100.00	99.35	99.35	99.35	99.35	99.35	99.35	97.44	97.44	97.44	98.82	1.06	1.07
1.0	97.33	97.33	98.67	99.01	95.05	95.05	96.70	93.73	99.01	93.06	97.22	95.83	96.50	1.99	2.06
5.0	96.37	97.21	99.72	97.83	100.07	98.95	99.79	98.95	98.95	95.61	96.12	97.67	98.10	1.53	1.56
10.0	98.29	98.29	98.58	99.50	101.65	100.21	99.36	100.21	99.36	92.32	94.34	99.46	98.46	2.61	2.65
20.0	99.66	99.66	100.48	99.79	99.52	101.17	100.76	100.62	100.76	94.51	94.65	92.40	98.66	3.00	3.04
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													98.11	2.24	2.29

ดังนั้นสารแยกพลาสมาโปรตีนใช้วิเคราะห์ยาไนโตรฟิวแรนโตอิน เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาและ %CV ได้แก่เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์

ข) เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Recovery)

เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมา เมื่อใช้ เมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน แสดงในตารางที่ 35, 36และ 37 ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่าสารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์มีความถูกต้องดี ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา และ %CV ในแต่ละความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.78-6.01% โดยไม่มีความผันแปรของ %CV ในแต่ละความเข้มข้น ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีคในการคำนวณ

5. <u>ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์</u> (Precision)

ผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ใน 1 วัน (within-run precision) และความเที่ยงตรงระหว่างวัน (between-run precision) เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือเอทานอลหรือแอซีโตรไนไตรล์ แสดงดังตารางที่ 38-43

วิธีวิเคราะห์ยาไนโตรฟิวแรนโตอิน ในพลาสมาโดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวให้ค่า %CV ในการวิเคราะห์ใน 1 วัน และการวิเคราะห์ระหว่างวัน อยู่ระหว่าง 0.64-3.90% และ 0.63-8.74% ตามลำดับ ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีคแสดงว่ามีความเที่ยงตรงของการ

ตารางที่ 35 เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ ยาไนโตรฟิวแรนโตอิน ที่แยกจากพลาสมาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ความเข้มข้นยาที่เติม (มคก/มล)	พื้นที่พีค				ความสูงพีค			
	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}$+SD	%CV	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}$+SD	%CV
1.0	0.94 0.98 0.98	94.00 98.00 98.00	96.67± 2.31	2.39	0.98 0.98 1.00	98.00 98.00 100.00	98.67 ±1.15	1.17
5.0	5.18 5.05 4.94	103.58 101.08 98.86	101.17± 2.36	2.33	5.30 5.11 5.07	106.10 102.24 101.34	103.23 ±2.53	2.45
10.0	9.72 10.23 9.56	97.20 102.30 95.60	98.37± 3.50	3.56	10.45 10.24 9.90	104.58 102.40 99.00	101.99 ±2.81	2.76
	จำนวนตัวอย่าง = 9		98.74± 3.11	3.15	จำนวนตัวอย่าง=9		101.30 ±2.84	2.81

ตารางที่ 36 เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ ยาไนโตรฟิวแรนโตอิน ที่แยกจากพลาสมาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ความเข้มข้นยาที่เติม (มคก/มล)	พื้นที่พีค				ความสูงพีค			
	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}\pm SD$	%CV	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}\pm SD$	%CV
3.0	2.90 2.71 3.06	96.60 90.40 101.97	96.32± 5.79	6.01	2.92 2.66 2.97	97.43 98.93 88.53	94.96 ±5.62	5.92
10.0	10.06 9.79 10.19	100.60 97.90 101.90	100.13± 2.04	2.04	10.27 9.72 9.89	102.70 97.20 98.90	99.60 ±2.82	2.83
20.0	18.04 20.16 19.56	90.19 100.78 95.76	95.58± 5.34	5.54	19.11 20.84 20.62	95.56 104.22 103.12	100.97 ±4.71	4.67
	จำนวนตัวอย่าง = 9		97.34± 4.57	4.70	จำนวนตัวอย่าง=9		98.51 ±4.78	4.85

ตารางที่ 37 เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ ยาไนโตรฟิวแรนโตอิน ที่แยกจากพลาสมาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้ แอซิโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ความเข้มข้นยาที่เติม (มคก/มล)	พื้นที่พีค				ความสูงพีค			
	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}$+SD	%CV	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}$+SD	%CV
3.0	2.78 2.84 2.76	92.50 94.83 92.13	93.15± 1.46	1.57	3.02 2.96 2.92	100.83 98.70 97.27	98.93 ±1.79	1.81
5.0	4.90 5.07 4.92	97.94 101.42 98.46	99.27± 1.88	1.89	5.10 5.18 5.14	101.94 103.52 102.76	102.74 ±0.79	0.78
10.0	9.54 9.71 9.95	95.40 97.10 99.50	97.33± 2.06	2.12	9.67 9.84 10.57	96.70 98.40 105.70	100.27 ±4.78	4.77
	จำนวนตัวอย่าง = 9		96.59± 3.13	3.24	จำนวนตัวอย่าง=9		100.65 ±3.08	3.06

ตารางที่ 38 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมา ใน 1 วัน (within-run precision) เมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=6)

ความเข้มข้น มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	SD	%CV
ก. พื้นที่พีค x 10^{-4}									
0.5	1.0584	1.0490	1.1011	1.0836	1.0745	1.1220	1.0814	0.0271	2.50
1.0	2.1228	2.1455	2.1296	2.2019	2.2175	2.2182	2.1726	0.0448	2.06
5.0	12.3747	12.0139	12.2396	12.3189	12.0280	12.0994	12.1791	0.1536	1.26
10.0	24.6004	24.8662	25.1080	25.2807	24.9842	24.9060	24.9576	0.2308	0.92
20.0	50.0901	48.2732	50.5350	48.9428	48.5981	49.5693	49.3348	0.8820	1.79
slope x 10^{-4}	2.5115	2.4323	2.5424	2.4644	2.4469	2.4916	2.4815	0.0415	1.67
intercept x 10^{-4}	-0.3013	-0.0866	-0.3373	-0.0247	-0.0821	-0.2064	-0.1730	0.1282	
r^2	0.99997	0.99983	0.99998	0.99981	0.99985	0.99998			
ข. ความสูงพีค (มม.)									
0.5	4.7	4.6	4.7	4.7	4.5	4.8	4.7	0.1	3.01
1.0	9.2	9.3	9.4	9.4	9.5	9.5	9.4	0.1	1.29
5.0	46.0	44.6	46.5	46.5	44.5	43.3	45.0	1.1	2.54
10.0	86.8	88.4	88.0	88.5	89.1	89.0	88.3	0.8	0.95
20.0	176.2	173.6	178.4	176.4	176.0	178.0	176.4	1.7	0.97
slope	8.8	8.7	8.9	8.8	8.8	8.9	8.8	0.01	0.95
intercept	0.6	0.8	0.3	1.0	0.6	0.0	0.6	0.36	
r^2	0.99988	0.99996	0.99020	0.99992	0.99998	0.99995			

ตารางที่ 39 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมา ใน 1 วัน (within-run precision) เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=6)

ก.พื้นที่พีค x 10^{-4}									
ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	SD	%CV
0.5	0.9925	1.0592	0.9754	1.0161	0.9673	0.9525	0.9934	0.0388	3.90
1.0	2.1292	2.1460	2.0117	1.9633	2.0723	2.0024	2.0542	0.0737	3.59
5.0	10.7656	11.9018	10.9753	11.4286	10.9965	11.2127	11.2134	0.4060	3.62
10.0	24.1742	23.6664	23.8696	23.9618	23.9305	23.0427	23.7742	0.3938	1.66
20.0	46.7120	46.8051	47.5113	48.2204	47.7192	46.4265	47.2324	0.6919	1.46
slope x 10^{-4}	2.3618	2.3488	2.3991	2.4308	2.4085	2.3362	2.3809	0.0374	1.57
intercept x 10^{-4}	-0.2862	-0.0308	-0.4449	-0.4272	-0.4447	-0.3271	-0.3268	0.1595	
r^2	0.99995	0.99995	0.99984	0.99985	0.99983	0.99998			
ข.ความสูงพีค(มม.)									
0.5	2.2	2.3	2.1	2.2	2.1	2.1	2.2	0.1	3.77
1.0	4.5	4.3	4.4	4.4	4.5	4.3	4.4	0.1	2.03
5.0	21.4	22.4	21.4	22.0	22.0	21.0	21.7	0.5	2.39
10.0	45.5	44.0	44.4	45.1	45.4	43.5	44.6	0.8	1.82
20.0	86.7	88.5	88.2	89.0	89.0	87.1	88.1	1.0	1.11
slope	4.4	4.4	4.4	4.5	4.5	4.4	4.4	0.04	1.04
intercept	0.3	0.0	-0.2	-0.0	0.0	-0.3	0.1	0.1	
r^2	0.99962	0.99998	0.99996	0.99996	0.99993	0.99996			

ตารางที่ 40 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมา ใน 1 วัน (within-run precision) เมื่อใช้ แอซิโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=6)

ก.พื้นที่พีค x 10^{-4}									
ความเข้มข้น มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	SD	%CV
0.5	1.0593	0.9931	1.0610	1.0627	1.0388	1.0320	1.0412	0.0268	2.57
1.0	2.0049	2.0471	2.0542	2.0225	1.9793	2.0918	2.0333	0.0397	1.94
5.0	11.6185	12.3087	11.5661	12.1264	11.9356	11.8578	11.9022	0.2871	2.41
10.0	23.3330	23.7551	23.1908	23.0716	23.2364	23.0214	23.2680	0.2638	1.13
20.0	49.1457	47.7490	49.5175	49.4846	49.0164	49.2086	49.2003	0.6527	1.33
slope x10^{-4}	2.4657	2.3964	2.48164	2.4745	2.4567	2.4620	2.4562	0.0306	1.24
intercept x10^{-4}	-0.5674	-0.1233	-0.6380	-0.5107	-0.4929	-0.5306	-0.4772	0.1808	
r^2	0.99971	0.99991	0.99952	0.99943	0.99970	0.99951			
ข.ความสูงพีค(มม.)									
0.5	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	0.0	0.00
1.0	7.5	7.2	7.2	7.3	7.1	7.5	7.3	0.2	2.29
5.0	35.0	35.8	35.4	35.7	35.4	35.4	35.4	0.3	0.79
10.0	69.5	71.0	70.0	69.4	70.0	69.4	69.9	0.6	0.88
20.0	144.4	144.0	146.4	145.8	145.6	145.4	145.3	0.9	0.64
slope	7.2	7.2	7.3	7.3	7.3	7.2	7.2	0.0	0.60
intercept	-0.4	-0.1	-0.7	-0.6	-0.6	-0.6	-0.5	0.2	
r^2	0.99977	0.99997	0.99972	0.99966	0.99979	0.99965			

ตารางที่ 41 ความเที่ยงตรงของ วิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมาระหว่างวัน(between-run precision) เมื่อใช้ เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ก.พื้นที่พีค $x10^{-4}$						
ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	$\overline{X}$	SD	%CV
0.5	1.1370	1.0490	1.1951	1.1270	0.0736	6.53
1.0	2.0650	2.1455	2.2166	2.1424	0.0758	3.54
5.0	12.0994	12.0139	10.5545	11.5559	0.8683	7.51
10.0	23.6879	24.8662	20.9232	23.1591	2.0240	8.74
20.0	48.1643	48.2732	41.9753	46.1376	3.6051	7.81
slope $x10^{-4}$	2.4031	2.3488	2.3484	2.3668	0.0314	1.33
intercept $x10^{-4}$	-0.1328	-0.0308	0.0492	0.0709	0.0544	
r^2	0.99999	0.99995	0.99999			
ข.ความสูงพีค(มม.)						
0.5	5.0	4.6	4.6	4.7	0.2	4.88
1.0	8.5	9.3	8.3	8.7	0.5	6.08
5.0	45.0	44.6	38.6	42.7	3.6	8.39
10.0	85.0	88.4	78.1	83.8	5.2	6.26
20.0	174.4	173.6	154.0	167.3	11.6	6.91
slope	4.5	4.4	4.9	4.6	0.2	5.36
intercept	-0.1	0.0	-0.2	0.1	0.1	
r^2	0.99998	0.99998	0.99993			

ตารางที่ 42 ความเที่ยงตรง ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาไนโตรฟิวแรนโตอิน ในพลาสมาระหว่างวัน(between-run precision) เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	$\bar{X}$	SD	%CV
ก.พื้นที่พีค $x10^{-4}$						
0.5	1.0963	1.0592	1.1496	1.1017	0.0454	4.12
1.0	2.3128	2.1460	2.4782	2.3123	0.1661	7.18
5.0	11.7325	11.9018	11.7997	11.8113	0.0852	0.72
10.0	23.9882	23.6664	23.5119	23.7222	0.2430	1.02
20.0	47.9179	46.8051	47.0246	47.2492	0.5894	1.25
slope $x10^{-4}$	2.4137	2.4324	2.0909	2.3123	0.1920	8.30
intercept $x10^{-4}$	-0.1892	-0.0866	0.0110	0.1284	0.0538	
r^2	0.99995	0.99983	0.99999			
ข.ความสูงพีค(มม.)						
0.5	2.2	2.3	2.5	2.3	0.2	6.58
1.0	4.4	4.3	5.0	4.6	0.4	8.38
5.0	22.0	22.4	23.4	22.6	0.7	3.19
10.0	45.0	44.0	48.4	45.8	2.3	5.04
20.0	89.5	88.5	97.5	91.8	4.9	5.37
slope	8.6	8.7	7.7	8.3	0.6	6.81
intercept	0.3	0.8	0.7	0.6	0.3	
r^2	0.99984	0.99996	0.99998			

ตารางที่ 43 ความเที่ยงตรงของ วิธีวิเคราะห์หาปริมาณ อาไนโตรฟิวแรนโตอิน ในพลาสมา ระหว่างวัน (between-run precision) เมื่อใช้ แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ก.พื้นที่พีค $x10^{-4}$						
ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	$\bar{X}$	SD	%CV
0.5	1.0407	0.9931	0.9139	0.9826	0.0640	6.52
1.0	2.0557	2.0471	2.0765	2.0598	0.0151	7.34
5.0	11.6698	12.3087	10.9929	11.6571	0.6580	5.64
10.0	22.7973	23.7551	21.0446	22.5323	1.3745	6.10
20.0	48.4035	47.7490	43.5198	46.5574	2.6509	5.69
slope $x10^{-4}$	2.4227	2.3964	2.1745	2.3312	0.1363	5.85
intercept $x10^{-4}$	-0.4921	-0.1233	-0.1645	-0.2560	0.2021	
r^2	0.99961	0.99991	0.99983			
ข.ความสูงพีค(มม.)						
0.5	3.7	3.8	3.8	3.8	0.1	1.53
1.0	7.3	7.2	7.0	7.2	0.2	2.13
5.0	34.8	35.8	37.2	35.9	1.2	3.36
10.0	69.0	71.0	70.0	70.0	1.0	1.43
20.0	145.0	144.0	143.2	144.1	0.9	0.63
slope	7.2	7.2	7.2	7.2	0.0	0.66
intercept	-0.8	-0.1	-0.2	0.4	0.4	
r^2	0.99965	0.99997	0.99984			

วิเคราะห์ใน 1 วัน และระหว่างวันดี โดยมีค่าความผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นน้อย ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีคในการใช้เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ จึงใช้ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่พีค หรือค่าความสูงพีคที่ได้จากการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ โดยการหา linearity เช่นเดียวกับหัวข้อ Validation (หน้า25) ได้ผลความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงโดยมีค่าความชันของกราฟ (slope), จุดตัดแกน y (intercept) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) แสดงในตารางความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

จากชุดเส้นกราฟมาตรฐาน เมื่อใช้พื้นที่พีคและความสูงพีค ได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของความชันของกราฟ (slope) และจุดตัดแกน y (intercept) ที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่า %CV ของค่าความชันของกราฟในการวิเคราะห์ใน 1 วัน และระหว่างวันอยู่ระหว่าง 1-8% ดังนั้นไม่ว่าจะทำการวิเคราะห์ใน 1 วัน หรือระหว่างวันก็ให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่ต่างกัน

จากการ validate วิธีวิเคราะห์ การใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ เมื่อใช้พื้นที่พีคและความสูงพีคในการคำนวณ มีความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) และความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision) ดีโดยมีค่า %CV ระหว่าง 1.0-6.0% และ 1.0-8.5% ตามลำดับ และมีความผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นที่ทำการศึกษาน้อย ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาอยู่ใน

เกณฑ์ที่กำหนดคือระหว่าง 90-100% สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัว จึงใช้วิเคราะห์หาปริมาณยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมาได้

ดังนั้นการจากการพิจารณาลักษณะปรากฏของตะกอนพลาสมาโปรตีนและสารละลายส่วนใส ลักษณะโครมาโทแกรมพีคของยาและการ validate วิธีวิเคราะห์ สารแยกพลาสมาโปรตีนที่ใช้วิเคราะห์ยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมาได้เมื่อ ยึดตามเกณฑ์ในการศึกษานี้ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์

การวิเคราะห์หาปริมาณยาไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมาที่มีรายงานการวิเคราะห์ มีการใช้วิธีทางสเปกโตรสโคปี (Conklin and Hollifield, 1966) โดยสกัดยาด้วยไนโตรมีเทน หลังจากนั้นนำมาเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับ Hyamine hydroxide และวัดค่าดูดกลืนของสารประกอบเชิงซ้อน ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร วิธีนี้มีขั้นตอนยุ่งยาก และมีข้อเสียคือเกิดการสลายตัว (degradation) ของสารประกอบเชิงซ้อนทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่ถูกต้อง

สำหรับวิธีทาง HPLC ที่มีรายงานการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน ได้แก่การใช้เมทานอล (Aufrere, Hoener and Vore, 1977) ในรายงานนี้ไม่รายงานค่าความถูกต้อง (accuracy) ส่วนค่าความเที่ยงตรง (precision) ไม่แสดงค่าอย่างชัดเจน Vree และคณะ(1979) ใช้สารละลายกรดเปอร์คลอริกในปริมาณที่มากเกินพอแยกพลาสมาโปรตีนแล้วฉีดเข้า HPLC วิเคราะห์หาปริมาณวิธีนี้ไม่รายงานลักษณะโครมาโทแกรมในพลาสมา ไม่รายงานค่าความเที่ยงตรง (precision) และไม่บอกจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ นอกจากนี้ค่าความถูกต้อง (accuracy) ไม่แสดงค่าอย่างชัดเจน ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ทำการศึกษาวิธีที่ทำการศึกษาจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

หาปริมาณไนโตรฟิวแรนโตอินในพลาสมา ซึ่งสามารถใช้ได้ทั้งเมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ โดยใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีคในการคำนวณได้ทั้ง 2 แบบ

4. ฟีนายโตอิน

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณยาฟีนายโตอินในพลาสมา ได้ผลเรียงตามลำดับแต่ละหัวข้อดังนี้

ก. ลักษณะปรากฏ

ลักษณะปรากฏของตัวอย่างพลาสมาที่ spike ยาฟีนายโตอิน และใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ อย่างใดอย่างหนึ่ง จะให้ลักษณะตะกอนพลาสมาโปรตีนและสารละลายส่วนใส แสดงดังตารางที่ 44

สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัว ให้ลักษณะตะกอนที่อัดแน่นแยกจากสารละลายส่วนใสอย่างชัดเจน และสารละลายส่วนใส ใสสะอาดปริมาตรมาก และมี pH เป็นกลาง = 7.0 จึงฉีดเข้า HPLC วิเคราะห์หาปริมาณได้ทันที

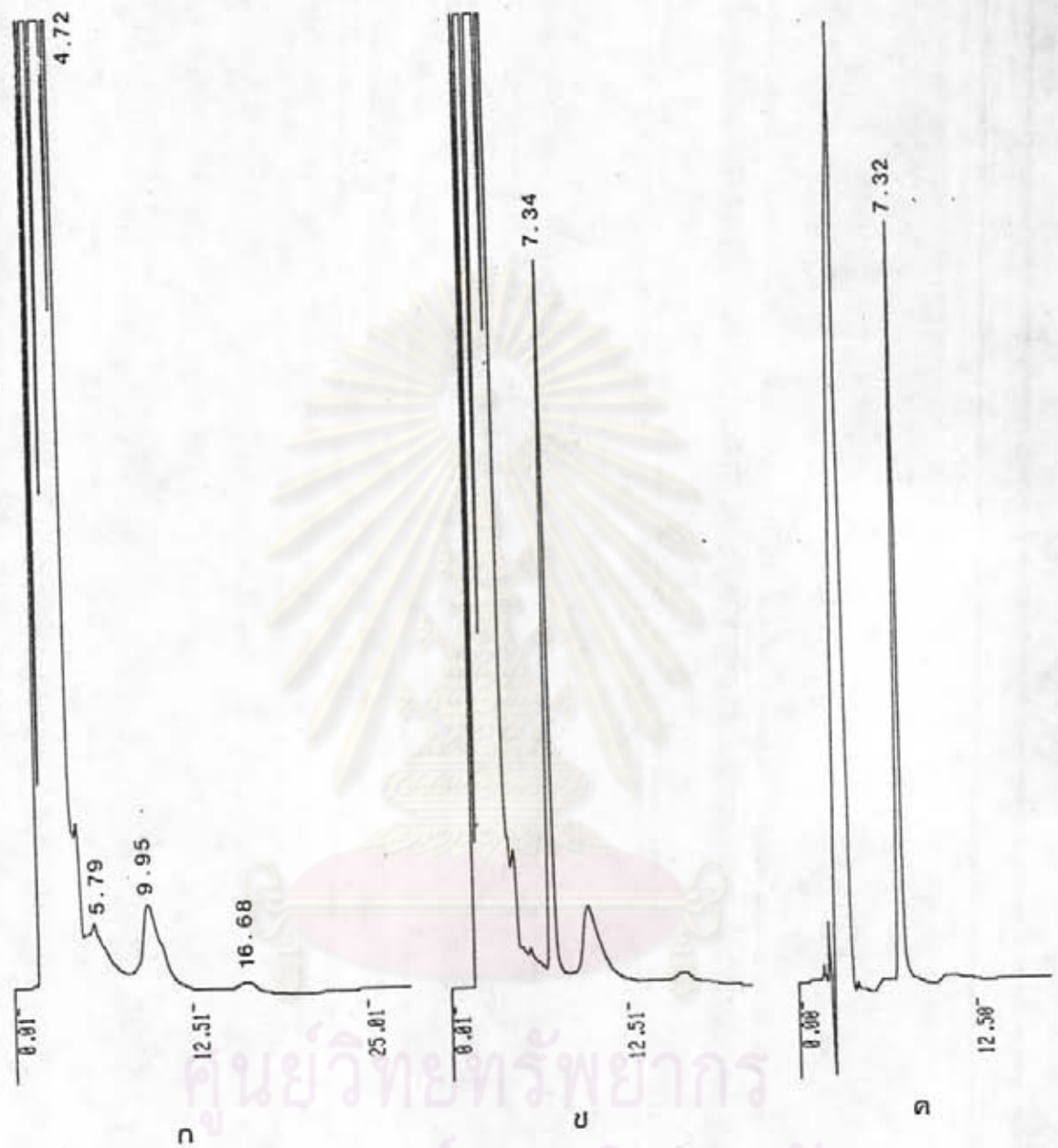
ข. ลักษณะโครมาโทแกรม

ลักษณะโครมาโทแกรมของยาฟีนายโตอิน เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือ เอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ แสดงดังรูปที่ 19,20 และ 21 ตามลำดับ

จากการศึกษาลักษณะโครมาโทแกรม สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวให้ลักษณะโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมาที่สะอาด พีคของ

ตารางที่ 44 ลักษณะปรากฏเมื่อเติม สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์ ลงในพลาสมาที่ spike ยาฟีนายโตอิน

ลักษณะปรากฏ	สารแยกพลาสมาโปรตีน		
	เมทานอล	เอทานอล	แอซีโตรไนไตรล์
1. เมื่อเติมสารแยก-พลาสมาโปรตีน			
-ลักษณะและสีของตะกอน	ตะกอนขุ่นขาว, เบา		ตะกอนขุ่นขาว, หนัก
-ความเร็วในการแยกตัวออกจากพลาสมา	แยกตัวอย่างรวดเร็ว	แยกตัวอย่างรวดเร็ว	แยกตัวทันที
2. หลังวอเทกซ์			
-ลักษณะตะกอน	เบา	เบา	ก้อนขนาดใหญ่
-สีตะกอน	ขาว-เหลือง	ขาว-เหลือง	เหลืองเข้ม
-ความเร็วของตะกอนในการตกลงสู่ก้นหลอด	ค่อยๆตกลงสู่ก้นหลอด	ค่อยๆตกลงสู่ก้นหลอด	ตกลงสู่ก้นหลอดทันที
3. หลังเซนตริฟิวก์			
-ตะกอน			
-ลักษณะและความอัดแน่นของตะกอน	อนุภาคเล็กๆอัดตัวกันแน่น	อนุภาคเล็กๆอัดตัวกันแน่น	ก้อนตะกอนขนาดใหญ่อัดตัวกันแน่น
-สีของตะกอน	ขาว	ขาว	เหลือง-น้ำตาล
-สารละลายส่วนใส			
-ความใส	ใสสะอาด	ใสสะอาด	ใสสะอาด
-สีของสารละลาย	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน
-ปริมาตร (มล.)	2.05-2.15	2.05-2.15	2.30-2.40
-pH	7.0	7.0	7.0

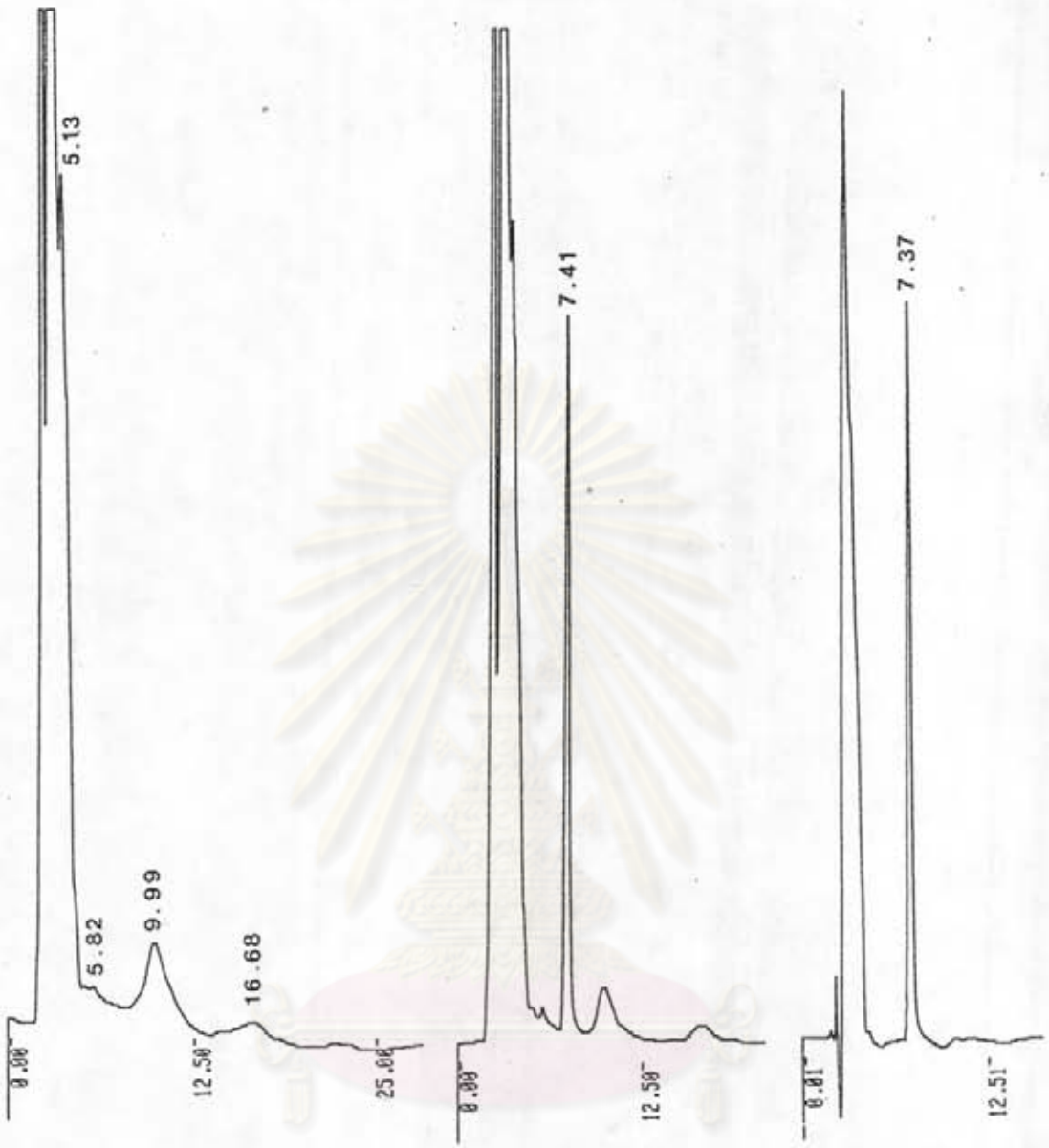


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 19 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาฟีนายโตอิน ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยา ฟีนายโตอิน (20.0 มคก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาฟีนายโตอิน ในเมทานอล (20.0 มคก/มล)

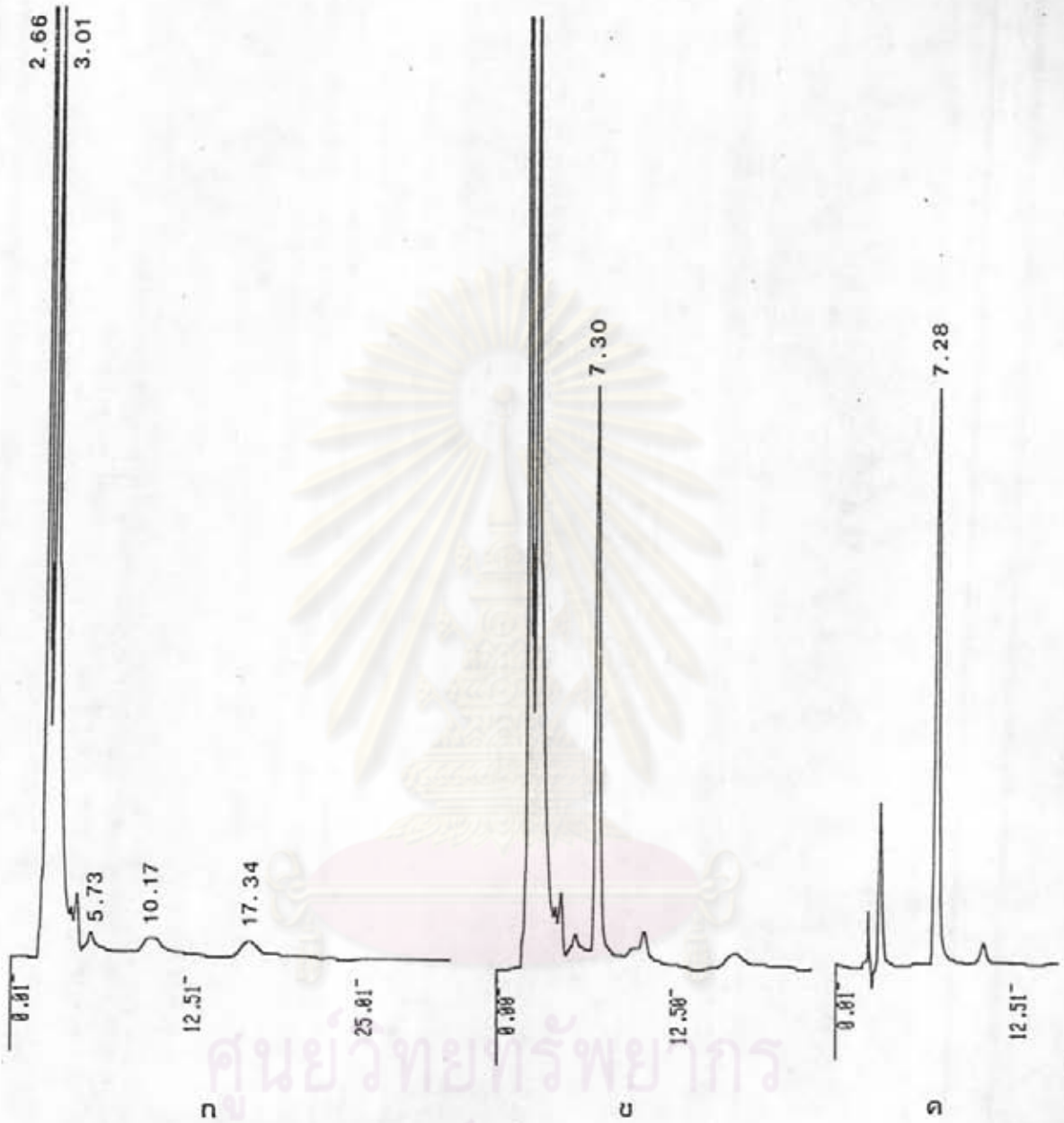


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 20 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาฟีนายโตอิน ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยา ฟีนายโตอิน (20.0 มคก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาฟีนายโตอิน ในเมทานอล (20.0 มคก/มล)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาฟีนายโตอิน ที่เติมลงในพลาสมาโดยใช้ แอซิโตรไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยา ฟีนายโตอิน (20.0 มคก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาฟีนายโตอิน ในเมทานอล (20.0 มคก/มล)

ยาฟีนายโตอินมีความสมมาตร, แคบ และไม่ถูกรบกวนด้วยพีคของ endogenous substance หรือสารอื่น ๆ และค่า retention time ของพีคยาในสารละลายมาตรฐานในเมทานอล และในพลาสมามีค่าเหมือนกัน แสดงว่าการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ สำหรับยาฟีนายโตอิน มีความจำเพาะเจาะจงสูง

การปรากฏของ endogenous substance ในโครมาโทแกรม เมื่อใช้เมทานอลหรือเอทานอลหรือแอซีโตรไนไตรล์ มีจำนวน 4 พีคใหญ่ ๆ เท่ากัน โดยเมื่อใช้เมทานอลจะมีค่า retention time ที่ 4.72, 5.79, 9.95, 16.68 นาที เมื่อใช้เอทานอล พีค endogenous substance ปรากฏที่เวลา 5.13, 5.82, 9.99, 16.68 นาที สำหรับแอซีโตรไนไตรล์ ค่า retention time ของ endogenous substance อยู่ที่ 3.01, 5.73, 10.17, 17.34 นาที

เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล หรือ เอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ เติมในสารละลายมาตรฐานของฟีนายโตอินในเมทานอล จะปรากฏพีคของฟีนายโตอินในโครมาโทแกรมที่เวลา 7.32, 7.37 และ 7.28 นาที ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกันมากกับการเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนดังกล่าวในแบลงค์พลาสมาที่เติมยาฟีนายโตอิน โดยพีคของยาในโครมาโทแกรม อยู่ที่เวลา 7.34, 7.41, 7.30 นาที ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาทั้งลักษณะปรากฏของตะกอนพลาสมาโปรตีนและสารละลายส่วนใสและลักษณะโครมาโทแกรมพีคของยา สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้งสามชนิดที่ใช้ คือ เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ ใช้วิเคราะห์ยาฟีนายโตอินในพลาสมาได้ ดังนั้นจึงทำการ validate วิธีการวิเคราะห์สำหรับสารแยกพลาสมาแต่ละตัว

ค. การ Validate วิธีวิเคราะห์

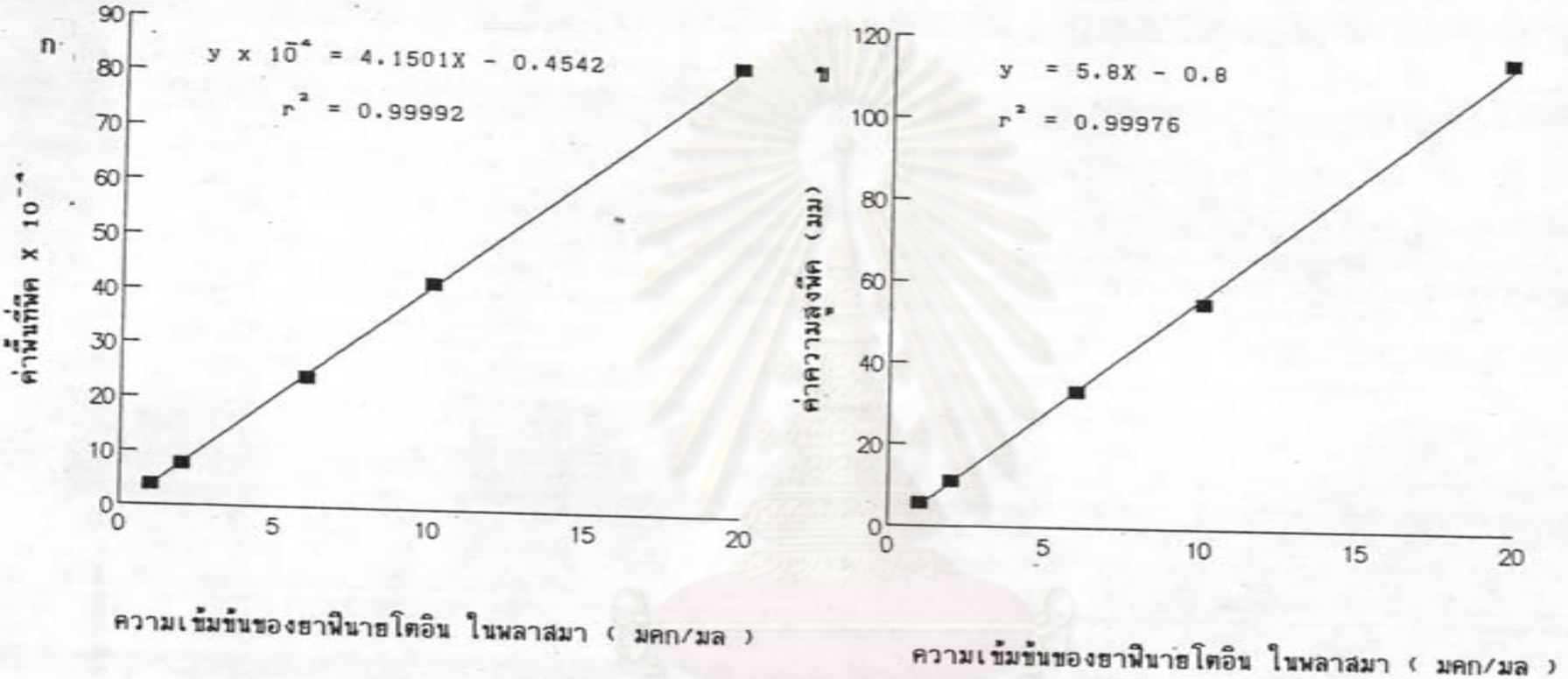
ทำการ validate วิธีวิเคราะห์ยาฟีนายโตอินในพลาสมา เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ โดย validate ทั้งพื้นที่พีค และความสูงพีค

1. Linearity

จากการทดลองได้ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคกับความเข้มข้นของยาฟีนายโตอินในพลาสมา และความสัมพันธ์ระหว่างค่าความสูงพีคกับความเข้มข้นของยาฟีนายโตอินในพลาสมาเมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือเอทานอลหรือแอซีโตรไนไตรล์ ในช่วงความเข้มข้นของยาที่ทำการศึกษา คือ 1.0-20.0 มคก/มล. โดยพล็อตกราฟระหว่างค่าพื้นที่พีคหรือความสูงพีค (แกน y) กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา (แกน x) ได้ผลความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงเป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's law) ดังแสดงในรูป 22, 23 และ 24 ตามลำดับ โดยสมการเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) แสดงในรูปดังกล่าว

2. ขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ (Lower Limit of Detection)

จากการทดลองเมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือเอทานอลหรือแอซีโตรไนไตรล์ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาฟีนายโตอิน ในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 โดยค่า S/N อยู่ระหว่าง 2.4-3.5 และ %CV ของค่าอัตราส่วน S/N อยู่ระหว่าง 7.90-8.91% คือ 0.10, 0.10 และ 0.04 มคก/มล ตามลำดับ ค่า S/N และค่า %CV แสดงในตารางที่ 45

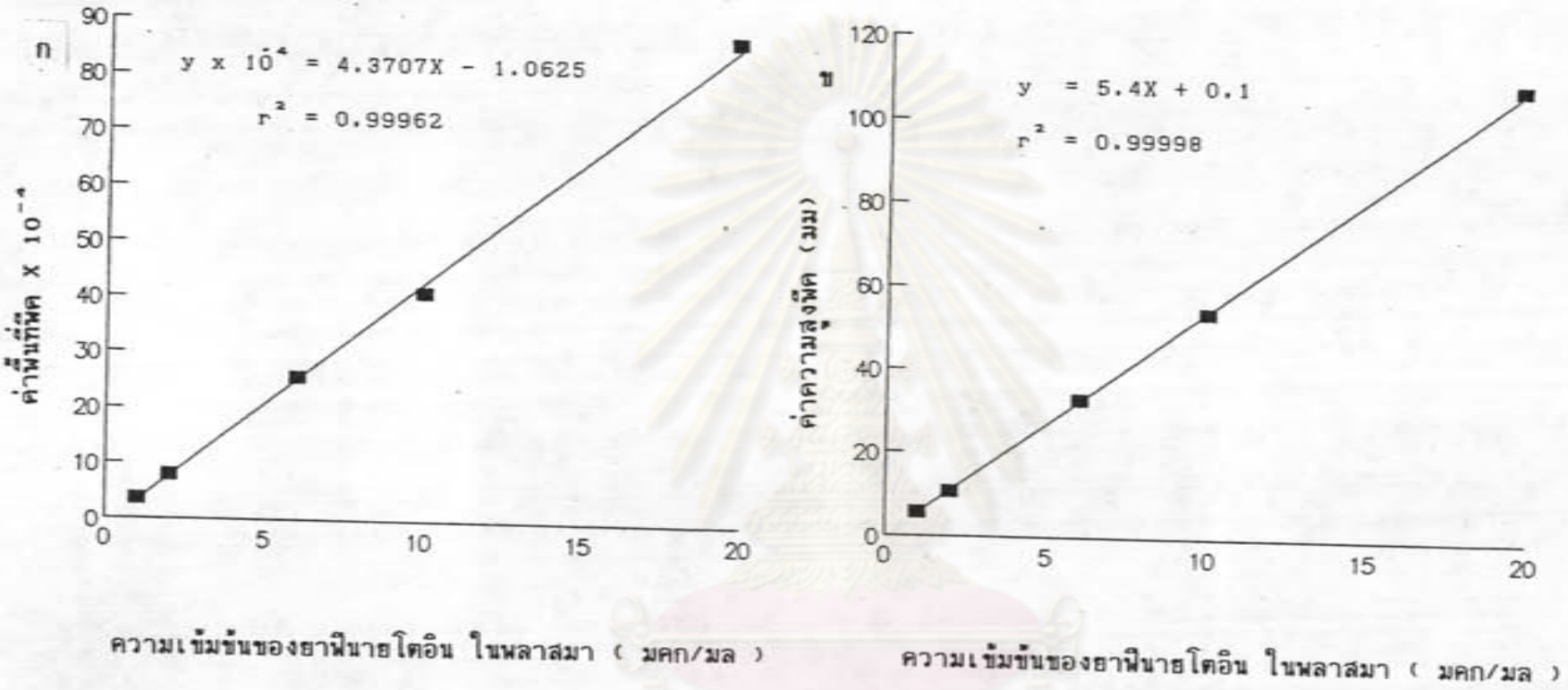


รูปที่ 22 แคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ของยาฟินายโตอินในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ก. พื้นที่พีค

ข. ความสูงพีค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

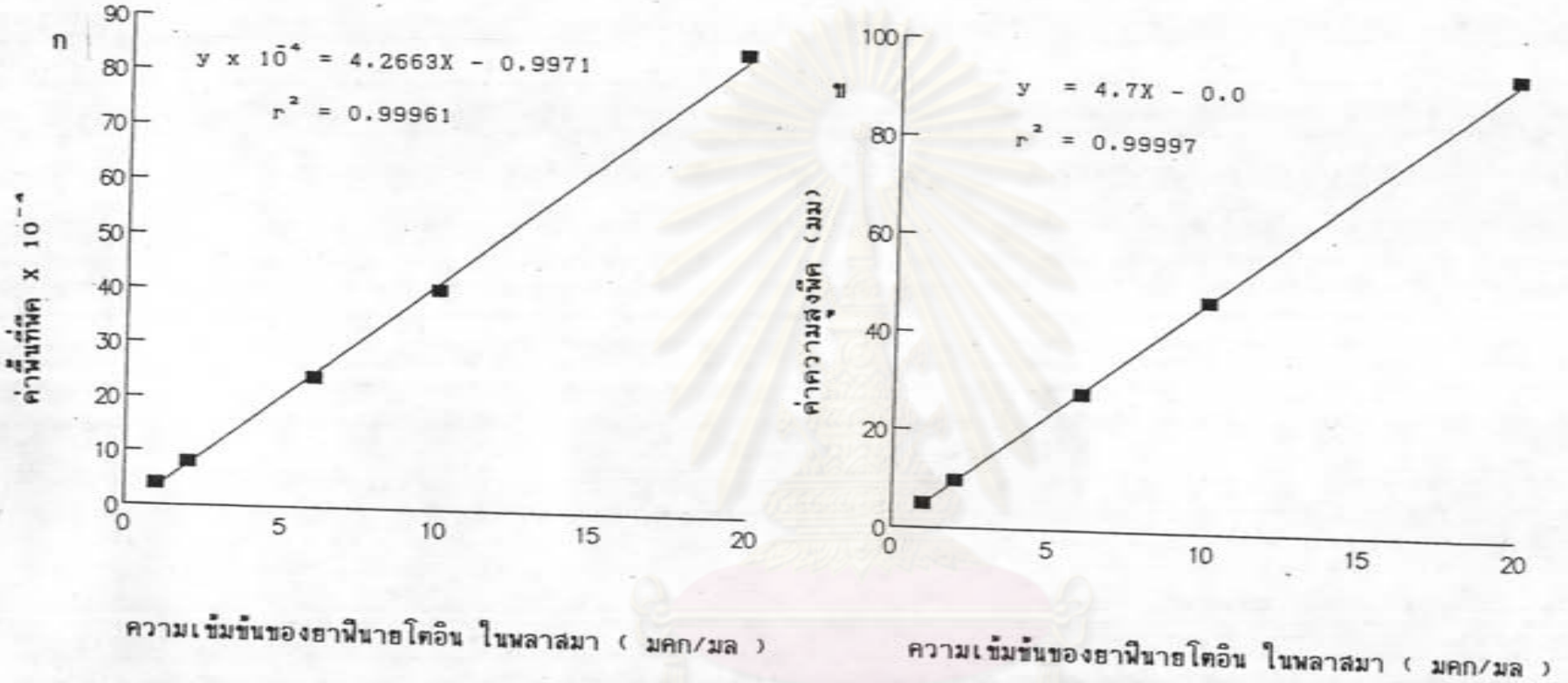


รูปที่ 23 แคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ของยาฟีนายโตอินในพลาสมา เมื่อใช้เอทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ก. พื้นที่พีค

ข. ความสูงพีค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 แคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ของยาฟีนายโตอินในพลาสมา เมื่อใช้แอซิโตรไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ก. พื้นที่พีค

ข. ความสูงพีค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 45 อัตราส่วน S/N เมื่อทำการวิเคราะห์ ยาพินายโตอิน ในพลาสมา โดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล, เอทานอล และ แอซีโตรไนไตรล์

	S/N		
	เมทานอล ความเข้มข้น 0.10 มคก/มล	เอทานอล ความเข้มข้น 0.10 มคก/มล	แอซีโตรไนไตรล์ ความเข้มข้น 0.04มคก/มล
1.	3.2	3.5	2.2
2.	3.6	4.0	2.7
3.	3.5	3.7	2.5
4.	3.3	3.7	2.5
5.	3.7	4.0	2.0
6.	3.9	3.1	2.4
7.	3.2	3.0	2.2
8.	3.0	3.6	2.4
9.	3.7	3.7	2.2
10.	3.7	3.7	2.3
$\bar{X}$	3.5	3.6	2.4
SD	0.3	0.3	0.2
%CV	8.13	8.91	7.90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ เมื่อใช้แอซีโตรไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนให้ค่าที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด ส่วนเมทานอลและเอทานอลให้ค่าที่ความเข้มข้นสูงกว่าแอซีโตรไนไตรล์ ทั้งนี้เมทานอลและเอทานอล ไม่สามารถหาค่าขีดจำกัดของวิธีที่เอทเทนนูเอชั่นต่ำสุด $2^{\circ}=1$ ได้ เพราะพีคของยาไม่สามารถแยกออกจากพีคของ endogeneous substances ซึ่งมีขนาดใหญ่มาก ต้องปรับใช้เอทเทนนูเอชั่น $2^{1}=2$

3. <u>ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์</u> (Specificity)

การใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเมทานอลหรือเอทานอลและแอซีโตรไนไตรล์ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาฟีนายโตอินในพลาสมา มีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังได้กล่าวแล้วในลักษณะโครมาโทแกรม ในข้อ 4.ข.

4. <u>ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์</u> (Accuracy)

ก) เปอร์เซนต์การกลับคืนของยาในการแยกออกจากพลาสมา (Physical Recovery)

ผลการทดลองหาเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาฟีนายโตอินที่แยกจากพลาสมาเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานฟีนายโตอินในเมทานอล ที่ความเข้มข้นเท่ากันเมื่อใช้เมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตร-ไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนแสดงในตารางที่ 46, 47 และ 48 ตามลำดับ

เมทานอลให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยามากกว่า 90% ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษาและ %CV แต่ละความเข้มข้นเมื่อใช้พื้นที่พีคและความสูงพีคของยาในการคำนวณอยู่ระหว่าง 1.05-2.64% โดยมีการผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นน้อย ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

ตารางที่ 46 เปอร์เซนต์การกลับคืนของ ยาปินายโคอิน ในพลาสมาเมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=12)

ก.พื้นที่พีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
1.0	89.44	93.00	91.32	92.74	90.34	91.49	88.91	91.85	91.45	91.45	91.68	93.28	91.41	1.33	1.45
2.0	91.64	94.63	90.74	91.45	91.50	97.07	90.66	88.78	93.74	90.37	91.68	89.86	91.84	2.28	2.48
6.0	94.00	93.28	93.07	92.08	90.10	92.10	93.43	93.61	89.68	95.35	94.60	94.66	93.00	1.75	1.88
10.0	95.04	95.31	94.96	96.80	96.44	95.99	94.73	97.04	96.62	96.24	97.99	95.13	96.02	1.01	1.05
20.0	96.00	91.64	94.63	96.17	95.68	95.68	89.90	97.43	97.33	95.40	91.69	94.94	94.75	2.40	2.54
												จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60	93.41	2.50	2.67

ข.ความสูงพีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
1.0	91.20	92.80	91.20	91.94	90.32	91.94	90.32	91.94	90.32	89.66	89.66	89.66	90.91	1.07	1.18
2.0	90.83	92.50	90.83	90.90	90.90	94.21	90.90	89.26	92.56	90.66	90.66	89.77	91.17	1.33	1.46
6.0	93.18	91.79	91.79	91.65	88.89	91.65	92.48	92.48	90.55	94.64	93.75	93.75	92.20	1.52	1.65
10.0	94.58	94.58	94.58	95.17	94.48	94.31	93.96	97.41	97.41	95.29	95.66	94.91	95.20	1.13	1.19
20.0	95.75	90.76	94.09	95.79	94.96	95.79	89.55	96.63	96.63	94.46	90.40	94.10	94.08	2.48	2.64
												จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60	92.71	2.28	2.46

ตารางที่ 47 เปอร์เซนต์การกลับคืนของ ยาฟินายโดอิน ในพลาสมาเมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=12)

ก.พื้นที่พีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
1.0	70.15	73.76	72.33	71.60	75.15	72.63	70.00	72.00	74.65	69.33	72.13	69.04	71.90	2.00	2.78
2.0	89.21	85.00	86.96	86.26	90.36	87.91	86.91	89.22	87.17	85.93	86.92	86.60	87.37	1.54	1.77
6.0	88.01	87.80	89.59	94.39	93.06	92.04	90.76	89.82	88.95	86.06	87.53	87.86	89.66	2.49	2.78
10.0	94.78	92.98	90.04	93.83	97.35	97.64	94.73	95.18	98.23	94.14	90.84	90.65	94.20	2.74	2.91
20.0	95.00	96.22	95.76	95.38	97.18	97.26	94.68	94.42	97.92	92.60	96.24	96.49	95.76	1.46	1.53
												จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60	87.78	8.81	10.03

ข.ความสูงพีค

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
1.0	89.43	91.06	91.06	91.93	90.32	91.93	90.32	93.55	93.55	90.27	92.04	90.27	91.31	1.32	1.44
2.0	93.62	91.91	92.77	93.04	94.78	93.91	93.04	94.78	93.91	92.17	93.09	94.00	93.42	0.92	0.98
6.0	94.44	94.44	95.83	94.29	92.86	92.86	91.48	91.48	91.48	95.07	96.05	96.05	93.86	1.78	1.90
10.0	95.40	93.67	92.63	94.74	96.49	96.49	94.74	94.74	96.49	95.53	92.23	92.82	94.66	1.53	1.62
20.0	95.65	95.91	96.35	94.93	96.94	96.94	94.50	94.32	96.94	93.20	96.75	97.14	95.80	1.29	1.35
												จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60	93.81	2.01	2.15

ตารางที่ 48 เปอร์เซนต์การกลับคืนของ ยาปินายโดอิน ในพลาสมาเมื่อใช้ แอซิโดรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=12)

ก.พื้นที่นิด

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
1.0	97.30	98.78	95.41	95.55	98.50	97.33	101.11	96.81	99.30	96.83	98.48	99.85	97.94	1.71	1.75
2.0	98.40	96.19	98.77	97.41	98.84	97.12	99.36	96.13	98.76	97.28	95.81	96.88	97.58	1.21	1.24
6.0	99.79	97.86	99.01	96.74	96.92	96.87	96.84	97.22	97.66	99.69	98.80	99.93	98.11	1.26	1.28
10.0	97.08	99.50	99.73	101.73	100.91	99.61	95.88	97.50	98.76	101.32	99.02	100.35	99.28	1.76	1.78
20.0	98.01	98.50	98.16	100.99	99.61	100.00	100.03	99.18	100.40	98.50	97.72	98.38	99.12	1.06	1.07
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													98.41	1.54	1.56

ข.ความสูงนิด

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
1.0	97.03	99.01	97.03	96.00	99.80	99.80	100.00	96.00	99.80	98.82	98.82	98.82	98.41	1.50	1.52
2.0	98.48	97.46	99.49	98.46	98.46	97.44	99.49	97.44	99.49	98.80	98.80	98.80	98.55	0.77	0.78
6.0	100.00	98.60	100.00	97.79	97.09	98.50	98.85	99.91	98.85	100.00	99.61	98.82	99.00	0.94	0.95
10.0	99.79	100.21	100.00	100.21	100.21	100.00	97.87	97.87	99.79	100.36	99.40	99.40	99.59	0.86	1.86
20.0	99.89	99.89	99.89	99.47	99.47	99.26	100.00	100.00	99.47	98.92	99.28	99.64	99.60	0.34	0.35
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													99.03	1.05	1.06

เอทานอลให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาขึ้นกับความเข้มข้นของฟีนายโตอินที่เติมลงในพลาสมา เมื่อคำนวณด้วยค่าพื้นที่พีคของยาโดยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของยาเพิ่มขึ้น ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 70.00-97.26 % ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาจึงน้อยกว่า 90% คือ 87.78% และ %CV = 10.03% แต่เมื่อคำนวณด้วยค่าความสูงพีคของยา ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยามากกว่า 90% ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษาและค่า %CV อยู่ระหว่าง 0.98-1.90% โดยมีการผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นน้อย

เปอร์เซนต์การกลับคืนของยาเมื่อใช้พื้นที่พีค มีค่าขึ้นกับความเข้มข้น อาจเป็นผลมาจากการ integrate ของเครื่อง integrator การตั้งค่าจากเครื่อง จะตั้งค่าที่สามารถ integrate ค่าพื้นที่พีคของโครมาโทแกรมได้ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ดีไม่สามารถตั้งให้เหมาะกับโครมาโทแกรมทุกรูปได้ ที่ความเข้มข้นต่ำรูปร่างพีคของยาฟีนายโตอินเมื่อใช้เอทานอลมีความกว้าง (broad) มากกว่าที่ความเข้มข้นสูง การ integrate ค่าพื้นที่พีคจึงอาจให้ค่าไม่ถูกต้องที่ความเข้มข้นต่ำ กรณีเช่นนี้การใช้ความสูงพีคของยาจึงให้ค่าที่ถูกต้องกว่า

แอซีโตรไนไตรล์ให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยามากกว่า 90% ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา และ %CV แต่ละความเข้มข้นเมื่อใช้พื้นที่พีคและความสูงพีคของยาในการคำนวณอยู่ระหว่าง 0.78-1.86% โดยมีการผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นน้อยทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

ดังนั้นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่ใช้วิเคราะห์ฟีนายโตอินได้ เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาและ %CV ได้แก่ เมทานอล และแอซีโตรไนไตรล์

ข) เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Recovery)

เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ยาฟีนายโตอินในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน แสดงในตารางที่ 49, 50 และ 51 ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่าสารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์มีความถูกต้องดี ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา และ %CV ในแต่ละความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 1-4% โดยไม่มีความผันแปรของ %CV ในแต่ละความเข้มข้น ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีคในการคำนวณ

5. <u>ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์</u> (Precision)

ผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ใน 1 วัน (within-run precision) และความเที่ยงตรงระหว่างวัน (between-run precision) เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือเอทานอลหรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง แสดงในตารางที่ 54-59

วิธีวิเคราะห์ยาฟีนายโตอิน ในพลาสมาโดยใช้เมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ ให้ค่า %CV ในการวิเคราะห์ใน 1 วัน และการวิเคราะห์ระหว่างวัน อยู่ระหว่าง 0.31-3.11% และ 0.60-9.27% ตามลำดับ ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีค แสดงว่ามีความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ใน 1 วันและระหว่างวันดี โดยมีค่าความผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นน้อย ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

ตารางที่ 49 เปอร์เซนต์การกลับคืน ของวิธีวิเคราะห์ ยาฟินายโตอิน ที่แยกจากพลาสมา ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ความเข้มข้นยาที่เติม (มคก/มล)	พื้นที่พีค				ความสูงพีค			
	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}\pm SD$	%CV	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}\pm SD$	%CV
5.0	4.65 4.85 4.91	92.98 96.94 98.20	96.04± 2.72	2.83	4.98 4.72 5.12	99.60 94.46 102.32	98.79 ±3.99	4.04
10.0	9.56 9.44 9.82	95.60 94.40 98.20	96.05± 1.94	2.02	9.50 9.69 10.10	95.00 96.90 101.00	97.63 ±3.04	3.12
18.0	17.08 17.76 18.09	94.91 98.64 100.52	98.02± 2.86	2.91	17.51 17.14 17.81	97.28 95.24 98.94	97.15 ±1.85	1.91
	จำนวนตัวอย่าง = 9		96.70± 2.41	2.49	จำนวนตัวอย่าง=9		97.86 ±2.77	2.83

ตารางที่ 50 เปอร์เซนต์การกลับคืน ของวิธีวิเคราะห์ ยาฟินายโตอิน ที่แยกจากพลาสมา ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ความเข้มข้นยาที่เติม (มคก/มล)	พื้นที่พีค				ความสูงพีค			
	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}\pm SD$	%CV	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}\pm SD$	%CV
6.0	6.07 5.98 5.83	101.18 99.68 97.22	99.36± 2.06	2.01	6.16 6.05 5.70	102.60 100.80 95.03	99.48 ±3.95	3.98
10.0	9.92 10.14 9.87	99.20 101.40 98.70	99.78± 1.42	1.42	9.84 10.18 9.76	98.40 101.85 97.60	99.28 ±2.26	2.28
15.0	15.13 14.93 14.58	100.85 99.51 97.20	99.19± 1.85	1.86	14.82 14.50 15.00	98.79 96.67 100.00	98.49 ±1.69	1.72
	จำนวนตัวอย่าง = 9		99.58± 1.58	1.57	จำนวนตัวอย่าง=9		99.08 ±2.47	2.49

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 51 เปอร์เซนต์การกลับคืน ของวิธีวิเคราะห์ ยาฟีนายโตอิน ที่แยกจากพลาสมา ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ แอซิโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ความเข้มข้นยาที่เติม (มคก/มล)	พื้นที่พีค				ความสูงพีค			
	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}\pm SD$	%CV	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(มคก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}\pm SD$	%CV
4.0	3.95 4.03 4.10	98.82 100.72 102.55	100.70± 1.86	1.85	4.07 4.08 3.94	101.65 102.10 98.42	100.72 ±2.01	1.99
10.0	9.89 9.77 9.57	98.90 97.70 95.70	97.44± 1.64	1.68	9.49 9.96 10.11	94.90 99.60 101.10	98.54 ±3.21	3.26
12.0	11.62 12.12 11.78	96.87 101.02 98.13	98.67± 2.13	2.16	12.20 11.53 11.73	101.65 96.10 97.77	98.51 ±2.85	2.89
	จำนวนตัวอย่าง = 9		98.94± 2.16	2.19	จำนวนตัวอย่าง=9		99.26 ±2.61	2.63

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 52 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาฟีนายโตอินในพลาสมา ใน 1 วัน (within-run precision) เมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=6)

ก. พื้นที่พีค x 10^{-4}									
ความเข้มข้น มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	SD	%CV
1.0	3.9062	3.8052	3.8534	3.7446	3.8687	3.8535	3.8386	0.0563	1.47
2.0	7.7072	7.7117	8.1811	7.6412	7.4824	7.9003	7.7706	0.2419	3.11
6.0	23.9306	23.4144	23.9361	24.2817	24.3289	23.3070	23.8664	0.4272	1.79
10.0	41.6184	41.4617	41.2696	40.7288	41.7193	41.5413	41.3898	0.3578	0.87
20.0	82.4190	81.9955	82.4489	77.0397	83.4937	83.4126	81.8016	2.4072	2.94
slope x10^{-4}	4.1500	4.1334	4.1382	3.8682	4.2099	4.2021	4.0389	0.1068	2.64
intercept x10^{-4}	-0.4542	-0.5636	-0.3403	0.5150	-0.6588	-0.7731	-0.3792	0.4635	
r^2	0.99992	0.99985	0.99995	0.99941	0.99996	0.99980			
ข. ความสูงพีค (มม.)									
1.0	5.7	5.6	5.7	5.6	5.7	5.6	5.6	0.1	0.97
2.0	11.0	11.0	11.4	11.0	10.8	11.2	11.1	0.2	1.87
6.0	33.2	32.2	33.2	33.5	33.5	32.8	33.1	0.5	1.50
10.0	55.2	54.8	54.7	54.5	56.5	56.5	55.4	0.9	1.64
20.0	115.0	114.0	115.0	107.5	116.0	116.0	113.9	3.2	2.84
slope	5.6	5.7	5.7	5.4	5.9	5.8	5.7	0.2	3.27
intercept	-0.8	-1.0	-0.8	0.6	-2.2	-0.9	-0.8	0.9	
r^2	0.99976	0.99970	0.99962	0.99993	0.99984	0.99981			

ตารางที่ 53 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ อาฟินายโตอินในพลาสมา ใน 1 วัน (within-run precision) เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=6)

ความเข้มข้น มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	SD	%CV
ก.พื้นที่พีค x 10^{-4}									
1.0	3.6111	3.7899	3.6625	3.5302	3.6311	3.7649	3.6650	0.0978	2.67
2.0	7.9041	8.2797	8.0548	7.9637	8.1745	7.9869	8.0606	0.1416	1.76
6.0	25.6250	25.7501	25.4671	25.1180	24.8523	24.6139	25.2377	0.4510	1.79
10.0	41.0149	42.5548	42.6816	41.4076	41.6043	42.9366	42.0333	0.7900	1.88
20.0	86.9896	88.6253	88.7005	86.3515	86.1135	89.3053	87.6810	1.3618	1.55
slope x 10^{-4}	4.3707	4.4540	4.4704	4.3462	4.3297	4.5091	4.4134	0.0740	1.68
intercept x 10^{-4}	-1.0625	-0.9412	-1.1555	-1.0261	-0.8966	-1.4498	-1.0886	0.1990	
r^2	0.99962	0.99984	0.99987	0.99984	0.99988	0.99974			
ข.ความสูงพีค(มม.)									
1.0	5.7	5.6	5.7	5.6	5.8	5.8	5.7	0.1	1.57
2.0	10.7	10.9	10.8	10.7	10.9	10.8	10.8	0.1	0.83
6.0	33.0	32.5	32.5	32.0	32.0	32.0	32.3	0.4	1.26
10.0	54.0	55.0	55.0	54.0	54.0	55.0	54.5	0.5	1.00
20.0	108.7	111.0	111.0	108.2	108.0	111.0	109.6	1.5	1.36
slope	5.4	5.6	5.6	5.4	5.4	5.6	5.5	0.1	1.48
intercept	0.1	-0.3	-0.3	-0.1	0.1	-0.4	-0.2	0.2	
r^2	0.99975	0.99996	0.99996	0.99998	0.99998	0.99999			

ตารางที่ 54 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาฟีนายโตอินในพลาสมา ใน 1 วัน (within-run precision) เมื่อใช้ แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=6)

ก.พื้นที่พีค x 10^{-4}									
ความเข้มข้น มคก/มล)	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	SD	%CV
1.0	3.9487	4.0705	4.0223	4.1783	4.0009	4.1037	4.0541	0.0814	2.01
2.0	8.0565	8.1747	8.0326	8.2174	7.9510	8.1681	8.1000	0.1026	1.27
6.0	23.8927	25.9371	23.9243	23.9171	24.1195	24.0120	23.9671	0.0849	0.35
10.0	40.4283	40.1030	39.5846	38.1026	38.7459	39.2470	39.3686	0.8619	2.19
20.0	85.0739	83.8999	84.2351	84.2538	83.5429	84.5721	84.2630	0.5300	0.63
slope x 10^{-4}	4.2663	4.1960	4.2135	4.1917	4.1711	4.2214	4.2100	0.0327	0.78
intercept	-0.9970	-0.6922	-0.9053	-0.9615	-0.8629	-0.9061	-0.8875	0.1067	
r^2 x 10^{-4}	0.99961	0.99968	0.99947	0.99860	0.99926	0.99923			
ข.ความสูงพีค(มม.)									
1.0	4.8	4.9	4.9	5.0	4.8	4.9	4.9	0.1	1.54
2.0	9.6	9.6	9.5	9.7	9.5	9.7	9.6	0.1	0.93
6.0	27.7	27.5	27.9	28.0	28.3	28.0	27.9	0.3	1.00
10.0	47.1	47.1	47.0	46.0	46.0	46.9	46.7	0.5	1.14
20.0	94.0	94.0	93.8	94.5	94.5	94.0	94.1	0.3	0.31
slope	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	0.0	0.21
intercept	0.0	0.0	0.1	0.0	-0.1	0.1	0.0	0.1	
r^2	0.99999	0.99995	0.99999	0.99985	0.99988	0.99999			

ตารางที่ 55 ความเที่ยงตรงของ วิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาพินายโตอิน ในพลาสมา ระหว่างวัน (between-run precision) เมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	$\overline{X}$	SD	%CV
ก.พื้นที่พีค $x10^{-4}$						
1.0	3.9564	3.8052	4.0200	3.9272	0.1103	2.81
2.0	7.9632	7.7117	8.0246	7.8998	0.1658	2.10
6.0	23.5356	23.4144	25.3688	24.1063	1.0951	4.54
10.0	41.1283	41.4617	42.1848	41.5916	0.5401	1.30
20.0	78.1944	81.9955	80.9982	80.3960	1.9708	2.45
slope $x10^{-4}$	3.9231	4.1335	4.0601	4.0389	0.1068	2.64
intercept $x10^{-4}$	0.3551	-0.5637	0.4502	0.0805	0.5599	
r^2	0.99958	0.99985	0.99967			
ข.ความสูงพีค(มม.)						
1.0	5.8	5.6	5.2	5.5	0.3	5.52
2.0	11.1	11.0	10.2	10.8	0.5	4.58
6.0	33.0	32.2	31.5	32.2	0.75	2.33
10.0	55.0	54.8	50.8	53.5	2.4	4.43
20.0	109.0	114.6	98.0	107.0	8.2	7.65
slope	5.4	5.7	4.9	5.3	0.4	7.87
intercept	0.4	-1.0	1.0	0.1	1.0	
r^2	0.99999	0.99970	0.99968			

ตารางที่ 56 ความเที่ยงตรงของ วิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาฝิ่นยาโตอิน ในพลาสม่า ระหว่างวัน (between-run precision) เมื่อใช้ เอทานอล เป็น สารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ก.พื้นที่พีค $x10^{-4}$						
ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	$\bar{X}$	SD	%CV
1.0	3.8032	3.7899	4.3460	3.9797	0.3173	7.97
2.0	7.9892	8.2797	8.6769	8.3153	0.3452	4.15
6.0	25.9114	25.7501	26.3478	26.0031	0.3092	1.19
10.0	42.6327	42.5548	43.3095	42.8323	0.4151	0.97
20.0	88.0668	88.6253	89.3896	88.6939	0.6641	0.75
slope $x10^{-4}$	4.4314	4.4540	4.4701	4.4518	0.0194	0.44
intercept $x10^{-4}$	-0.8846	-0.9412	-0.4531	-0.7598	0.2671	
r^2	0.99991	0.99984	0.99987			
ข.ความสูงพีค(มม.)						
1.0	5.6	5.6	5.2	5.5	0.2	4.22
2.0	10.8	10.9	10.1	10.6	0.4	4.11
6.0	34.0	32.5	29.2	31.9	2.4	7.70
10.0	54.0	55.0	47.5	52.2	4.1	7.81
20.0	110.3	111.0	98.1	106.5	7.3	6.81
slope	5.5	5.6	4.9	5.3	0.4	7.10
intercept	0.0	-0.3	0.0	-0.1	0.1	
r^2	0.99985	0.99997	0.99980			

ตารางที่ 57 ความเที่ยงตรงของ วิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาฟีนายโตอิน ในพลาสมา ระหว่างวัน (between-run precision)เมื่อใช้ แอซิโตรไนไตรล์ เป็น สารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ก.พื้นที่พีค x10^{-4}						
ความเข้มข้น (มคก/มล)	1	2	3	$\overline{X}$	SD	%CV
1.0	4.1378	4.0705	3.9360	4.0481	0.1027	2.54
2.0	8.0514	8.1747	8.3741	8.2001	0.1628	1.99
6.0	24.5594	23.9371	25536417	24.7127	0.8626	3.49
10.0	40.9417	40.1030	41.8422	40.9623	0.8698	2.12
20.0	82.9221	83.8999	83.1954	83.3391	0.5045	0.60
slopex10^{-4}	4.1498	4.1961	4.1619	4.1693	0.0240	0.58
intercept x10^{-4}	-0.2462	-0.6922	0.1348	-0.1839	0.2983	
r^2	0.99998	0.99968	0.99994			
ข.ความสูงพีค(มม.)						
1.0	5.0	4.9	4.2	4.7	0.4	9.27
2.0	9.6	9.6	8.2	9.1	0.8	8.85
6.0	28.2	27.5	25.4	27.0	1.5	5.39
10.0	47.3	47.1	41.4	45.3	3.4	7.40
20.0	94.2	94.0	82.8	90.3	6.5	7.22
slope	4.7	4.7	4.1	4.6	0.2	4.03
intercept	0.2	0.0	0.1	0.1	0.1	
r^2	0.99994	0.99995	0.99997			

เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่พีค หรือค่าความสูงพีคที่ได้จากการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล และแอซีโตร-ไนไตรล์ โดยการหา linearity เช่นเดียวกับหัวข้อ Validation(หน้า25) ได้ผลความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงโดยมีค่าความชันของกราฟ (slope), จุดตัดแกน y (intercept) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) แสดงในตารางความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

จากชุดเส้นกราฟมาตรฐาน เมื่อใช้พื้นที่พีคและความสูงพีค ได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของความชันของกราฟ (slope) และจุดตัดแกน y (intercept) ที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่า %CV ของค่าความชันของกราฟอยู่ระหว่าง 0.21-7.27% ดังนั้นไม่ว่าจะทำการวิเคราะห์ใน 1 วัน หรือระหว่างวัน ก็ให้ผลการวิเคราะห์ไม่ต่างกัน

จากการ validate วิธีวิเคราะห์ การใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเมทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ เมื่อใช้พื้นที่พีคและความสูงพีคในการคำนวณ ให้ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy) และความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (precision) ดีโดยมีค่า %CV ระหว่าง 1-4% และ 1-9% ตามลำดับ และมีความผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นที่ทำการศึกษาน้อย สำหรับเอทานอลการ validate เกือบทุกหัวข้ออยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ยกเว้น การใช้พื้นที่พีค ให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาแปรตามความเข้มข้น

ดังนั้นการจากการพิจารณาลักษณะปรากฏของตะกอนพลาสมาโปรตีนและสารละลายส่วนใส ลักษณะโครมาโทแกรมพีคของยา และการ validate วิธีวิเคราะห์ สารแยกพลาสมาโปรตีนที่ใช้วิเคราะห์ยา

ฟีนายโตอินในพลาสมาได้เมื่อยึดตามเกณฑ์ในการศึกษานี้ ได้แก่เมทานอล และแอซีโตรไนไตรล์

การวิเคราะห์หาปริมาณยาฟีนายโตอินในพลาสมาที่มีรายงานการวิเคราะห์ด้วยวิธีทาง HPLC ที่มีรายงานการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน ได้แก่การใช้แอซีโตรไนไตรล์ (Soldin and Hill, 1976; Slonek, Peng and Chiou, 1978), อะซีโตน (Szabo and Browne, 1982) และสารผสมระหว่างแอซีโตรไนไตรล์กับโพรพรานอล ทุกรายงานไม่มีการรายงานความ ถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ และค่าความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์รายงานเป็นค่าเฉลี่ยรายงานที่ใช้อะซีโตน ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และไม่รายงานขีด จำกัดของวิธีวิเคราะห์ ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ทำการศึกษา การใช้สาร แยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ที่ทำการศึกษา จึงเป็นวิธีที่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ยาฟีนายโตอินในพลาสมาโดยใช้ได้ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

5. <u>โพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์</u>

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมาได้ผลเรียงลำดับ แต่ละหัวข้อดังนี้

ก. <u>ลักษณะปรากฏ</u>

ลักษณะปรากฏของตัวอย่างพลาสมาที่ spike ยาโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ และใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือเอทานอลหรือแอซีโตรไนไตรล์ อย่างใดอย่างหนึ่ง จะให้ลักษณะตะกอนพลาสมาโปรตีนและสารละลายส่วนใสแสดงดังตารางที่ 58

ตารางที่ 58 ลักษณะปรากฏเมื่อเติม สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์ ลงในพลาสมาที่ spike ยาโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์

ลักษณะปรากฏ	สารแยกพลาสมาโปรตีน		
	เมทานอล	เอทานอล	แอซีโตรไนไตรล์
1. เมื่อเติมสารแยก-พลาสมาโปรตีน			
-ลักษณะและสีของตะกอน	ตะกอนขุ่นขาว, เบา		ตะกอนขุ่นขาว, หนัก
-ความเร็วในการแยกตัวออกจากพลาสมา	แยกตัวอย่างรวดเร็ว	แยกตัวอย่างรวดเร็ว	แยกตัวทันที
2. หลังวอเทกซ์			
-ลักษณะตะกอน	เบา	เบา	ก้อนขนาดใหญ่
-สีตะกอน	ขาว-เหลือง	ขาว-เหลือง	เหลืองเข้ม
-ความเร็วของตะกอนในการตกลงสู่ก้นหลอด	ค่อยๆตกลงสู่ก้นหลอด	ค่อยๆตกลงสู่ก้นหลอด	ตกลงสู่ก้นหลอดทันที
3. หลังเซนตริฟิวก์			
-ตะกอน			
-ลักษณะและความอัดแน่นของตะกอน	อนุภาคเล็กๆอัดตัวกันแน่น	อนุภาคเล็กๆอัดตัวกันแน่น	ก้อนตะกอนขนาดใหญ่อัดตัวกันแน่น
-สีของตะกอน	ขาว	ขาว	เหลือง-น้ำตาล
-สารละลายส่วนใส			
-ความใส	ใสสะอาด	ใสสะอาด	ใสสะอาด
-สีของสารละลาย	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน
-ปริมาตร (มล.)	2.05-2.15	2.05-2.15	2.30-2.40
-pH	7.0	7.0	7.0

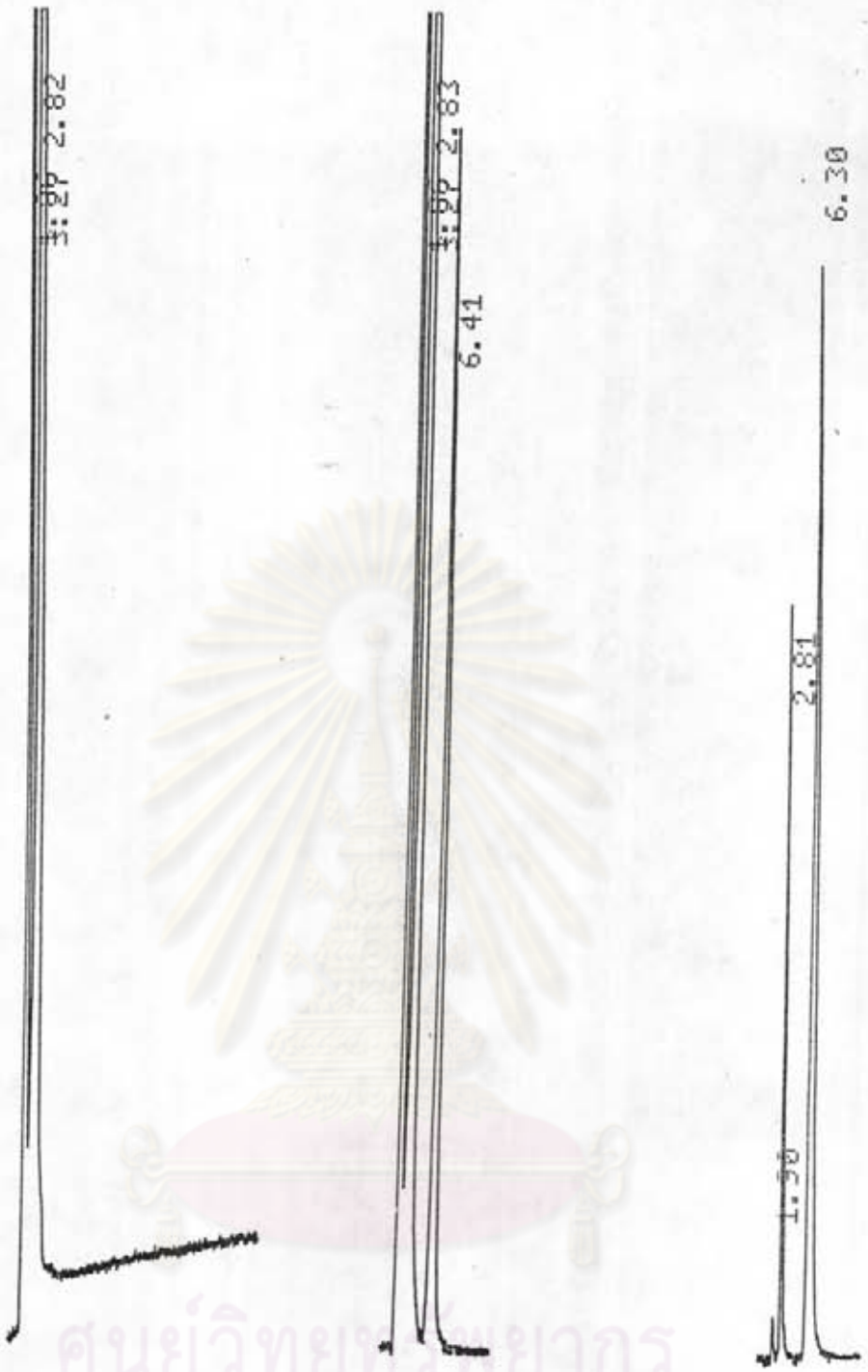
แอซีโตรไนไตรล์ให้ลักษณะปรากฏในแต่ละขั้นตอนของการวิเคราะห์ดีที่สุด เมทานอล และเอทานอลให้ลักษณะที่ปรากฏที่คล้ายกัน แต่ทั้ง 3 ตัว ให้ลักษณะตะกอนที่อัดแน่นแยกจากสารละลายส่วนใสอย่างชัดเจน และสารละลายส่วนใส ใสสะอาด ปริมาตรมากและมี pH เป็นกลาง = 7.0 จึงฉีดเข้า HPLC วิเคราะห์หาปริมาณได้ทันที

ข. ลักษณะโครมาโทแกรม

ลักษณะโครมาโทแกรมของยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ แสดงในรูปที่ 25, 26 และ 27 ตามลำดับ

จากการศึกษาลักษณะโครมาโทแกรม สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวให้ลักษณะโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมาที่สะอาด พีคของยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ มีความสมมาตร, แคบ, ไม่ถูกรบกวนด้วยพีคของ endogenous substance หรือสารอื่นๆ และค่า retention time ของพีคยาในสารละลายมาตรฐานในเมทานอล และในพลาสมามีค่าเหมือนกัน แสดงว่าการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ สำหรับยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ มีความจำเพาะเจาะจงสูง

การปรากฏของ endogenous substance ในโครมาโทแกรม เมื่อใช้เมทานอล มี 3 พีค โดยมีค่า retention time ที่ 1.86, 2.82 และ 3.21 นาที ส่วนเมื่อใช้เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์มีจำนวน 1 พีคเท่ากัน โดย endogenous substance มีค่า retention time 4.11 นาที และ 2.83 นาที ตามลำดับ



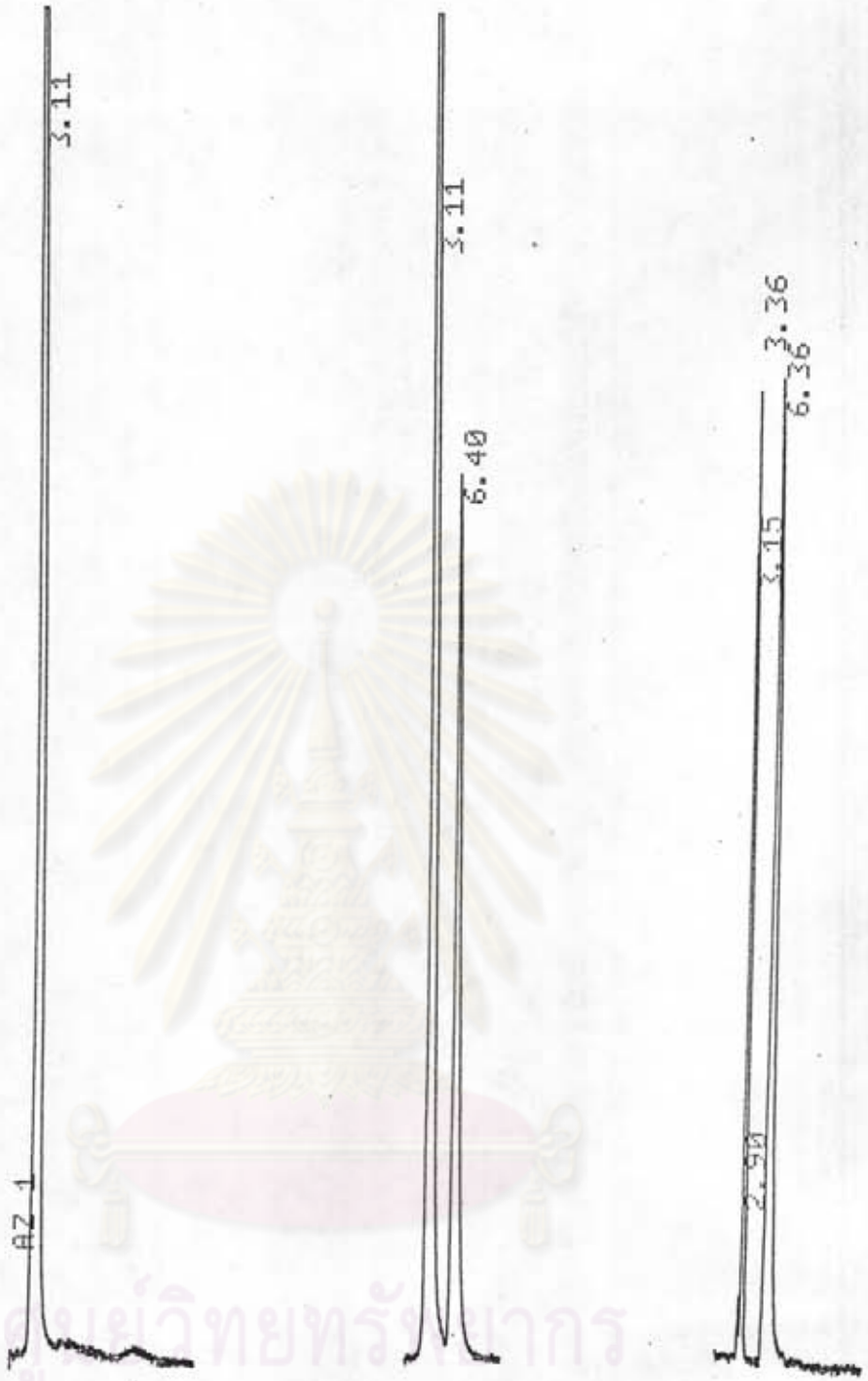
ก ข ค

รูปที่ 25 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ (250.0 นนก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ในเมทานอล (250.0 นนก/มล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



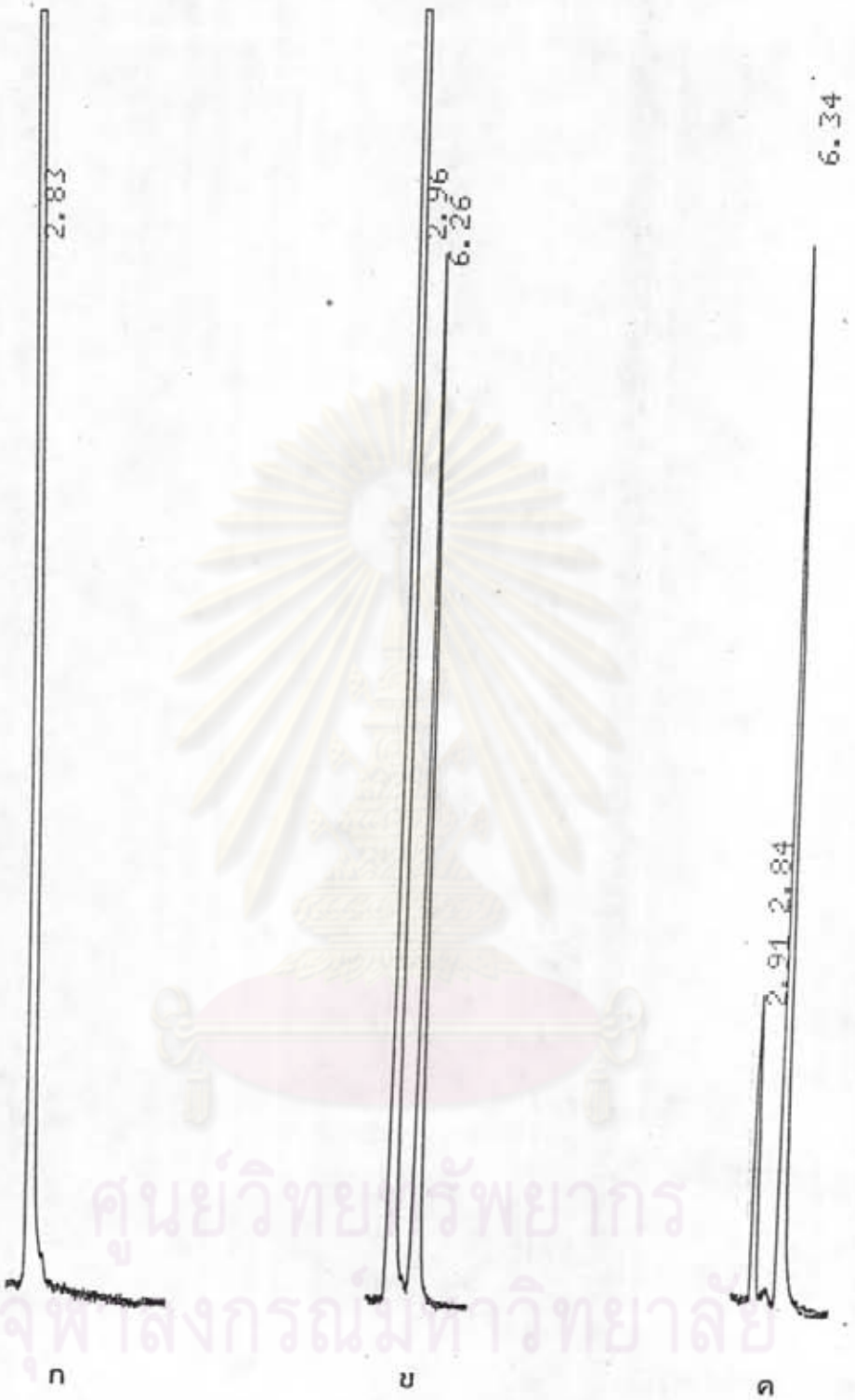
ก ข ค

รูปที่ 26 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ (250.0 นนก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ในเมทานอล (250.0 นนก/มล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 27 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ (250.0 นนก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ในเมทานอล (250.0 นนก/มล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล หรือ เอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ เติมในสารละลายมาตรฐานของโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ในเมทานอล จะปรากฏพีคของโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ในโครมาโทแกรมที่เวลา 6.30, 6.36 และ 6.34 นาที ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกันมากับการเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนดังกล่าวในแบลงค์พลาสมาที่เติมยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ โดยพีคของยาในโครมาโทแกรม อยู่ที่เวลา 6.41, 6.40 และ 6.26 นาที ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาทั้งลักษณะปรากฏของตะกอนพลาสมาโปรตีนและสารละลายส่วนใสและลักษณะโครมาโทแกรมพีคของยา สารแยกพลาสมาโปรตีนที่ใช้วิเคราะห์ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมาได้ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ จึงทำการ validate สำหรับสารแยกพลาสมาโปรตีน แต่ละตัว

ค. <u>การ Validate วิธีวิเคราะห์</u>

ทำการ validate วิธีวิเคราะห์ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมา เมื่อใช้ เมทานอล เอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน โดย validate ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

1. <u>Linearity</u>

จากการทดลองได้ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคกับความเข้มข้นของโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมา และความสัมพันธ์ระหว่างค่าความสูงพีคกับความเข้มข้นของยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมา เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์ ในช่วงความเข้มข้นของยาที่ทำการศึกษา คือ 10-250 นนก/มล. โดยพล็อตกราฟระหว่างค่าพื้นที่พีคหรือความสูงพีค (แกน y) กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา

(แกน x) ได้ผลความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงดังแสดงในรูป 28, 29 และ 30 ตามลำดับ โดยสมการเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) แสดงในรูปดังกล่าว

2. ขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์

(Lower Limit of Detection)

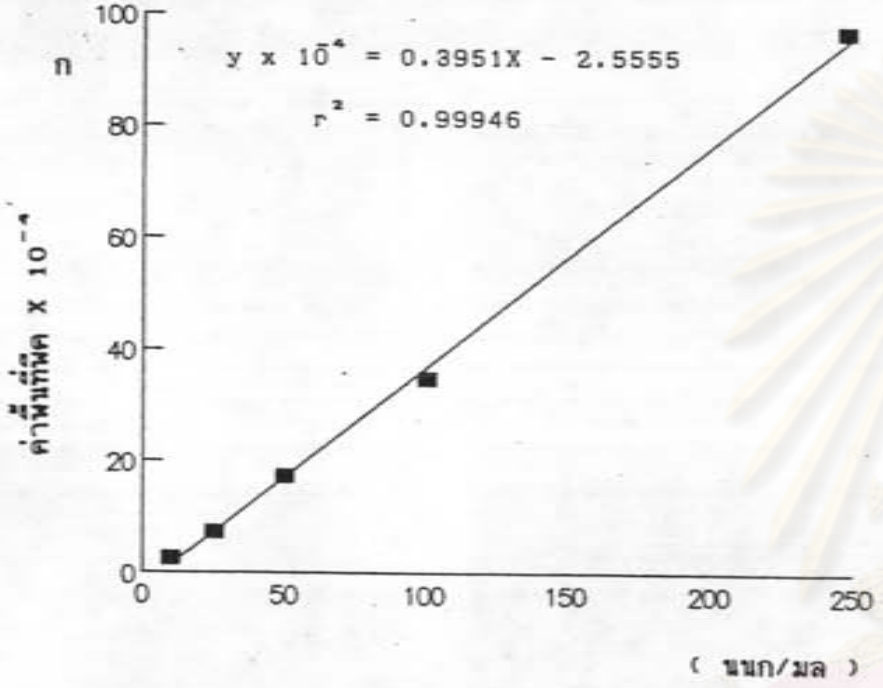
จากการทดลองเมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอล หรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ อย่างใดอย่างหนึ่ง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ ในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 โดยค่า S/N อยู่ระหว่าง 2.3-2.4 และ %CV ของค่าอัตราส่วน S/N อยู่ระหว่าง 8.61-9.67% คือ 1.8, 2.0 และ 1.8 นนก/มล. ตามลำดับ ค่า S/N และ %CV แสดงในตารางที่ 59

ขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ เมื่อใช้เมทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ ให้ค่าที่ความเข้มข้นเท่ากัน และมีค่าความเข้มข้นต่ำกว่าเมื่อใช้เอทานอล

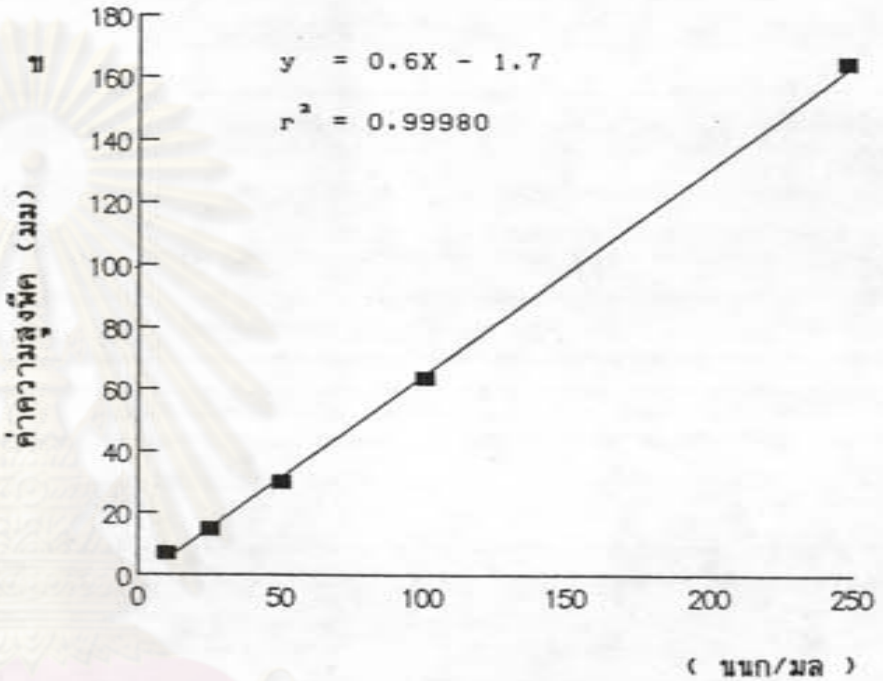
3. ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

(Specificity)

การใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่งในการวิเคราะห์หาปริมาณยาโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมา มีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังได้กล่าวแล้วในลักษณะโครมาโทแกรม ในข้อ 5.ข.



ความเข้มข้นของยาโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ ในพลาสมา



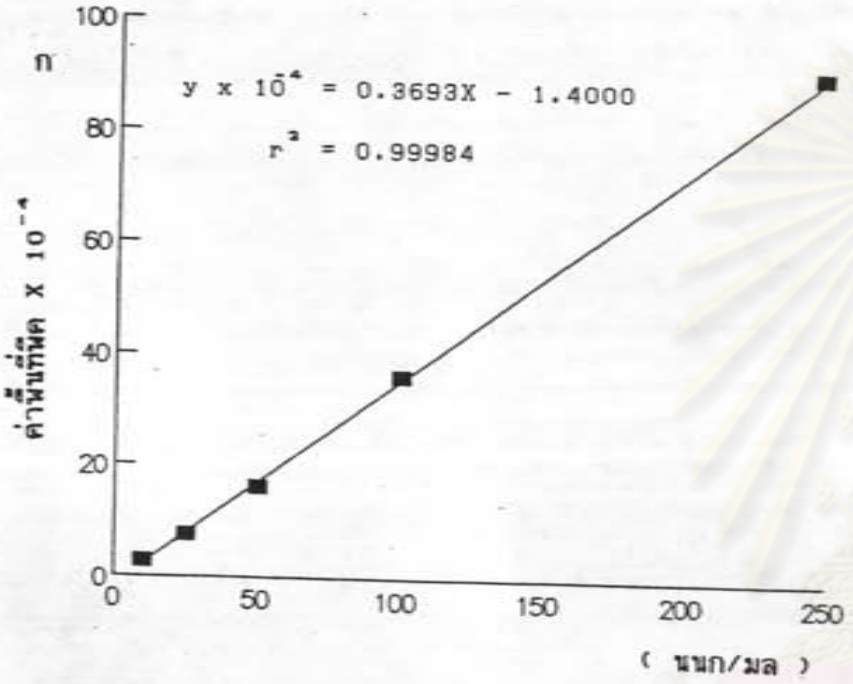
ความเข้มข้นของยาโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ ในพลาสมา

รูปที่ 29 แคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ของยาโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

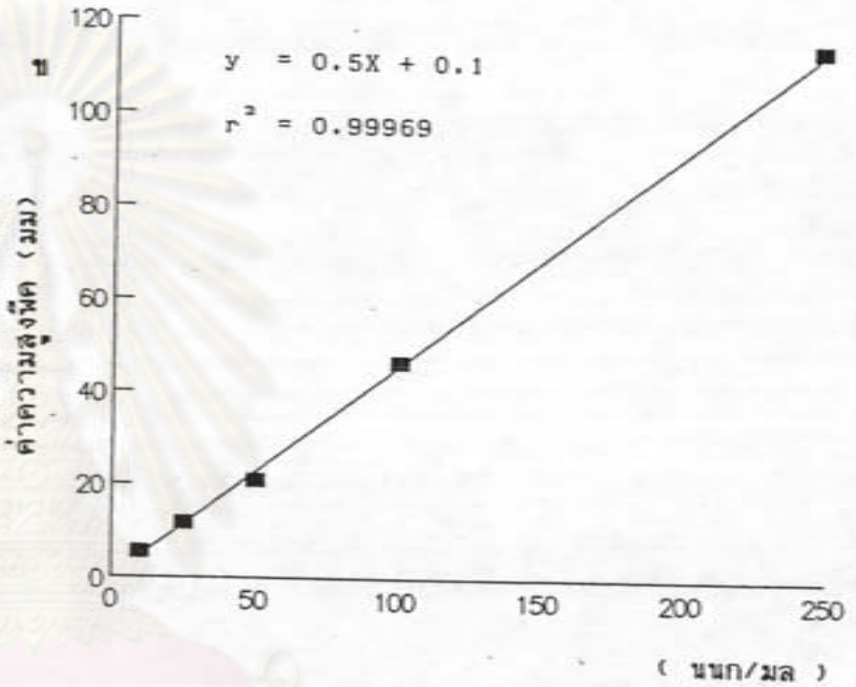
ก. พื้นที่ผิด

ข. ความสูงผิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ความเข้มข้นของยาโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ ในพลาสมา



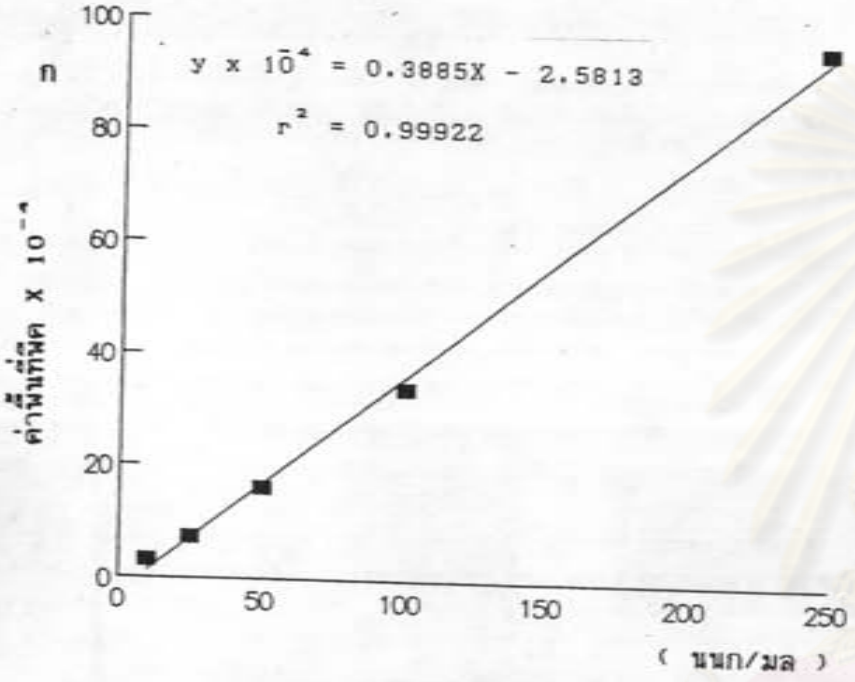
ความเข้มข้นของยาโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ ในพลาสมา

รูปที่ 28 แคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ของยาโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมา เมื่อใช้เอทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

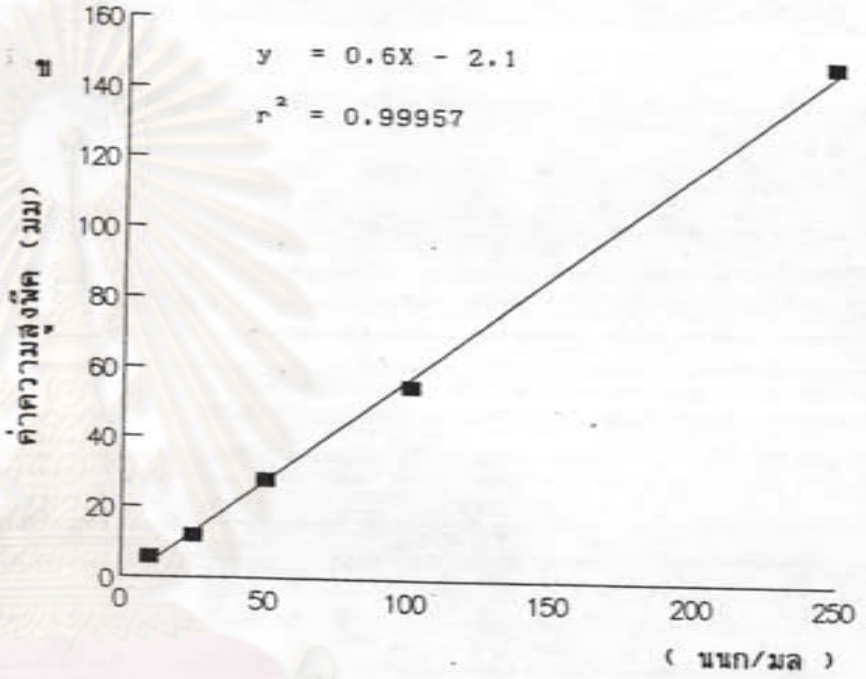
ก. พื้นที่พีค

ข. ความสูงพีค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ความเข้มข้นของยาโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ ในพลาสมา



ความเข้มข้นของยาโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ ในพลาสมา

รูปที่ 30 แคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ของยาโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมา เมื่อใช้แอซิโตรไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ก. พื้นที่พีค

ข. ความสูงพีค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 59 ค่าอัตราส่วน S/N เมื่อทำการวิเคราะห์ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมา โดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล , เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์

	S/N		
	เมทานอล ความเข้มข้น 1.80 นนก/มล	เอทานอล ความเข้มข้น 2.00 นนก/มล	แอซีโตรไนไตรล์ ความเข้มข้น 1.80นนก/มล
1.	2.4	2.4	2.8
2.	2.4	2.5	2.2
3.	2.6	2.5	2.4
4.	2.8	2.0	2.3
5.	2.2	2.1	2.1
6.	2.3	2.6	2.2
7.	2.3	2.1	2.2
8.	2.7	2.1	2.5
9.	2.5	2.2	2.0
10.	2.2	2.2	2.2
$\overline{X}$	2.4	2.2	2.3
SD	0.2	0.2	0.2
%CV	8.61	9.48	9.67

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. <u>ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์</u> (Accuracy)

ก) เปอร์เซนต์การกลับคืนของยาในการแยกออกจากพลาสมา (Physical Recovery)

ผลการทดลองหาเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ที่แยกจากพลาสมาเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ในเมทานอล ที่ความเข้มข้นเท่ากันเมื่อใช้ เมทานอลหรือ เอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน แสดงในตารางที่ 60, 61 และ 62 ตามลำดับ

เมทานอลให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยามากกว่า 100% ในทุกความเข้มข้นของยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ที่ทำการศึกษา โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 109.91-119.43% แต่ %CV แต่ละความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 1.51-4.68% ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงในการคำนวณเปรียบเทียบความผันแปรของ %CV ระหว่างพื้นที่พีคกับความสูงพีค พบว่ามีความผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นน้อย ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

แอซีโตรไนไตรล์ให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยามากกว่า 100% ในทุกความเข้มข้นของยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ที่ทำการศึกษา โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 101.21-110.26% แต่ %CV แต่ละความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 2.13-5.89% ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงในการคำนวณและมีความผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นน้อย ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

เอทานอลให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยามากกว่า 90% ในทุกความเข้มข้นของยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ของยาที่ทำการศึกษา และ %CV แต่ละความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 1.08-4.22% โดยมีความผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นน้อยทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค

ตารางที่ 60 เปอร์เซนต์การกลับคืนของ ยาโนรนราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมา เมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=12)

ก.พื้นที่พีค

ความเข้มข้น (นนก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
10.0	107.43	109.80	112.40	118.73	111.64	119.09	104.14	121.62	119.70	114.39	111.63	115.37	113.83	5.33	4.68
25.0	110.93	113.24	108.47	105.71	107.19	106.61	108.69	121.00	111.09	108.42	114.71	116.58	111.05	4.57	4.12
50.0	110.61	115.29	116.58	119.40	118.81	114.18	113.17	121.70	125.51	118.02	116.86	110.97	116.76	4.34	3.71
100.0	110.81	115.16	112.35	109.85	114.26	111.88	117.88	117.08	108.79	114.51	113.63	114.67	113.40	2.77	2.44
250.0	114.77	107.05	111.49	112.18	105.34	105.87	109.84	109.03	106.51	109.51	111.61	113.68	109.71	3.11	2.83
												จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60	112.95	4.68	4.15

ข.ความสูงพีค

ความเข้มข้น (นนก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
10.0	112.50	110.71	114.28	118.26	113.04	121.74	107.83	118.26	121.74	115.04	115.04	118.58	115.58	4.28	3.70
25.0	112.40	115.50	110.08	117.69	117.69	117.69	117.69	123.26	119.28	114.62	116.99	117.79	116.72	3.34	2.86
50.0	113.09	118.03	119.16	118.90	121.26	118.11	121.26	122.04	122.04	121.21	115.56	113.54	118.68	3.17	2.67
100.0	111.76	117.22	116.09	121.99	124.67	122.37	125.81	124.28	120.84	115.47	114.70	117.96	119.43	4.51	3.78
250.0	115.04	110.84	113.73	114.36	112.01	110.07	114.57	114.57	113.40	113.35	115.21	115.70	113.57	1.76	1.55
												จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60	116.80	4.04	3.46

ตารางที่ 61 เปอร์เซนต์การกลับคืนของ ยาโนรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมา เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=12)

ก.ขึ้นที่มีค

ความเข้มข้น (นนก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
10.0	98.99	101.13	95.43	93.67	95.34	100.43	103.90	93.67	90.72	97.22	98.43	100.92	97.50	3.85	3.95
25.0	104.11	99.21	102.62	101.99	102.98	96.71	99.45	105.88	100.27	99.36	100.55	101.38	101.21	2.49	2.46
50.0	101.45	103.23	100.86	92.63	98.77	92.68	94.52	93.98	92.51	97.69	98.58	99.69	97.22	3.81	3.92
100.0	100.29	101.98	99.85	100.61	89.12	102.31	96.59	100.62	102.80	94.13	101.31	95.48	98.84	4.05	4.10
250.0	98.74	100.69	98.09	97.30	98.57	96.29	98.80	100.38	91.06	100.77	101.11	102.04	96.65	2.93	2.97
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													98.68	3.65	3.69

ข.ความสูงนิค

ความเข้มข้น (นนก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
10.0	93.33	95.00	93.33	98.18	94.55	90.90	90.90	100.00	100.00	91.74	93.58	93.58	94.59	3.19	3.38
25.0	96.17	91.29	89.90	87.24	88.72	87.24	91.68	88.72	87.24	90.43	93.81	90.71	90.09	2.67	2.96
50.0	90.65	94.89	92.42	85.02	97.98	91.09	95.14	89.89	85.02	90.43	93.81	90.06	91.37	3.84	4.22
100.0	91.15	94.48	90.25	89.17	89.17	91.66	91.66	92.42	94.92	89.02	91.69	88.25	91.16	2.12	2.32
250.0	90.13	90.28	90.49	90.12	92.06	90.12	91.92	92.66	89.45	90.45	90.75	91.65	90.84	0.98	1.08
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													91.61	3.25	2.56

ตารางที่ 62 เปอร์เซนต์การกลับคืนของ ยาโนรนราโนลอล ไอโดรคลอไรด์ในพลาสมาเมื่อใช้ แอซิโดรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=12)

ก.พื้นที่พีค

ความเข้มข้น (นนก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
10.0	108.93	104.95	105.55	97.68	103.08	98.73	92.17	100.37	91.98	107.36	105.76	105.37	101.49	5.98	5.89
25.0	110.54	106.04	108.99	99.02	111.07	100.13	109.62	113.64	102.20	105.94	107.90	110.28	107.11	4.59	4.28
50.0	111.94	105.21	107.91	109.81	111.08	109.80	117.24	112.84	112.76	110.61	107.41	106.45	110.26	3.29	2.99
100.0	109.73	105.99	108.43	95.69	104.68	97.43	103.67	100.33	108.92	108.68	110.97	106.81	105.11	4.96	4.72
250.0	102.03	100.58	99.95	97.55	99.56	103.19	98.20	101.04	101.86	103.28	107.26	106.53	101.75	2.98	2.93
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													105.14	5.48	5.21

ข.ความสูงพีค

ความเข้มข้น (นนก/มล)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	SD	%CV
10.0	106.78	105.08	105.08	93.55	103.22	93.55	93.55	100.00	100.00	105.00	105.00	105.00	101.32	5.11	5.04
25.0	108.28	106.90	106.90	96.18	110.62	105.81	110.62	108.22	100.20	105.18	106.77	111.55	106.44	4.14	4.15
50.0	107.82	104.35	106.43	113.82	111.78	103.25	111.38	113.00	110.57	108.95	107.36	106.16	108.74	3.41	3.13
100.0	107.85	105.80	108.53	103.97	107.75	101.70	107.32	105.86	107.32	108.15	110.26	105.47	106.66	2.27	2.13
250.0	102.46	100.82	101.15	96.99	97.91	98.44	98.97	98.57	100.54	105.52	106.58	106.58	101.21	3.40	3.35
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด= 60													104.87	4.82	4.60

สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนค่าเฉลี่ยของยามากกว่า 90% โดยเอทานอลให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาอยู่ระหว่าง 90-100% แต่เมทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยามากกว่า 100% ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องจากดีเทกเตอร์ตรวจวัดสารอื่นๆในตัวอย่างรวมไปด้วย หรืออาจเกิดจากความแตกต่างของปริมาณสารละลายส่วนใสหลังแยกพลาสมาโปรตีน กับปริมาตรทั้งหมดของสารละลายมาตรฐาน และเมื่อตรวจหาสารด้วยฟลูออเรสเซนต์ ดีเทกเตอร์ซึ่งมีความไวสูง จึงได้ค่ามากกว่า 100%

ดังนั้นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่ใช้วิเคราะห์ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ได้ เมื่อดูจากค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยา ได้แก่ เอทานอล

ข) เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Recovery)

เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมา เมื่อใช้ เมทานอล หรือ เอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน แสดงในตารางที่ 63, 64 และ 65 ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่าสารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์มีความถูกต้องดี ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา และ %CV ในแต่ละความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.53-3.32% โดยไม่มีความผันแปรของ %CV ในแต่ละความเข้มข้นไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีคในการคำนวณ

ตารางที่ 63 เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ที่แยกจากพลาสมา ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ความเข้มข้นยาที่เติม (นนก/มล)	พื้นที่พีค				ความสูงพีค			
	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(นนก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}\pm SD$	%CV	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(นนก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}\pm SD$	%CV
20	19.5 20.8 20.2	97.5 104.2 100.8	100.8± 3.3	3.32	20.3 19.8 20.5	101.5 99.1 102.7	101.1 ±1.8	1.81
50	53.1 51.2 50.0	106.1 102.4 100.0	102.8± 3.1	3.00	50.8 51.0 52.2	101.7 102.6 104.6	103.0 ±1.5	1.44
100	102.0 100.3 102.0	102.0 100.3 102.0	101.4± 1.0	0.97	99.8 101.3 100.7	99.8 101.2 100.7	100.6 ±0.7	0.70
	จำนวนตัวอย่าง = 9		101.7± 2.4	2.45	จำนวนตัวอย่าง=9		101.5 ±1.6	1.62

ตารางที่ 64 เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ที่แยกจากพลาสมา ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ความเข้มข้นยาที่เติม (นนก/มล)	พื้นที่พีค				ความสูงพีค			
	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(นนก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}\pm SD$	%CV	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(นนก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}\pm SD$	%CV
10	10.1 10.0 10.1	101.0 100.0 101.0	100.7± 0.6	0.57	10.0 10.4 10.0	100.0 104.0 100.0	101.3 ±2.3	2.28
50	50.3 51.1 49.8	100.7 102.3 99.7	100.9± 1.3	1.30	49.8 50.2 50.5	99.6 100.5 100.9	100.3 ±0.7	0.66
250	251.1 252.3 249.6	100.4 100.9 99.8	100.4± 0.6	0.55	251.8 250.6 249.0	100.7 100.3 99.6	100.2 ±0.6	0.56
	จำนวนตัวอย่าง = 9		100.6± 0.8	0.80	จำนวนตัวอย่าง=9		100.6 ± 1.3	1.34

ตารางที่ 65 เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ ยาโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ ที่แยกจากพลาสมา ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้ แอซิโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ความเข้มข้นยาที่เติม (นนก/มล)	พื้นที่พีค				ความสูงพีค			
	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(นนก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}\pm SD$	%CV	ความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบ(นนก/มล)	%การกลับคืนของยา	$\bar{X}\pm SD$	%CV
25	24.7 25.0 25.4	99.0 100.0 101.6	100.2± 1.3	1.31	25.4 25.6 24.6	101.6 102.3 98.5	100.8 ±2.0	2.01
50	50.1 49.6 51.5	100.1 99.2 102.9	100.7± 1.9	1.92	50.4 52.5 50.9	100.8 105.0 101.8	102.5 ±2.2	2.14
100	99.2 101.8 102.0	99.2 101.8 102.0	101.0± 1.6	1.55	99.5 100.3 101.3	99.5 100.3 101.3	100.4 ± 0.9	0.90
	จำนวนตัวอย่าง = 9		100.6± 1.4	1.44	จำนวนตัวอย่าง=9		101.2 ± 1.8	1.83

5. <u>ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์</u> (Precision)

ผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ใน 1 วัน (within-run precision) และความเที่ยงตรงระหว่างวัน (between-run precision) เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็น เมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ อย่างใดอย่างหนึ่ง แสดงดังตารางที่ 66-71

วิธีวิเคราะห์ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมาโดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัว ให้ค่า %CV ในการวิเคราะห์ใน 1 วัน และการวิเคราะห์ระหว่างวัน อยู่ระหว่าง 1.20-6.22% และ 0.39-9.89% ตามลำดับ ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีค แสดงว่ามีความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ใน 1 วัน และระหว่างวันดี โดยมีค่าความผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นน้อย ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค การใช้เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ จึงใช้ได้ทั้งพื้นที่และความสูงพีค

เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่พีค หรือค่าความสูงพีคที่ได้จากการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ โดยการหา linearity เช่นเดียวกับหัวข้อ Validation (หน้า25) ได้ผลความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงโดยมีค่าความชันของกราฟ(slope), จุดตัดแกน y (intercept) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) แสดงในตารางความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

จากชุดเส้นกราฟมาตรฐาน เมื่อใช้พื้นที่พีคและความสูงพีค ได้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ของความชันของกราฟ (slope) และจุดตัดแกน y (intercept) ที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่า %CV ของค่าความชันของกราฟอยู่ระหว่าง 0.95-5.81% ดังนั้นไม่ว่าจะ

ตารางที่ 66 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ธาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมา ใน 1 วัน (within-run precision) เมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=6)

ก.พื้นที่พีค x 10^{-4}									
ความเข้มข้น นนก/มล)	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	SD	%CV
10.0	2.5532	2.4008	2.5609	2.2396	2.6153	2.5740	2.4906	0.1431	5.75
25.0	7.3800	7.4834	7.4428	7.5882	8.4478	7.0447	7.5645	0.4704	6.22
50.0	17.3284	17.2425	16.5713	16.4247	17.6617	18.2148	17.2406	0.6705	3.89
100.0	34.8375	36.2342	35.4805	37.3834	37.1303	34.4996	35.9276	1.1906	3.31
250.0	96.9804	91.0686	91.5275	94.9637	94.2582	92.0795	93.4797	2.3087	2.47
slopex10^{-4}	0.3951	0.3703	0.3724	0.3884	0.3820	0.3766	0.3808	0.0096	2.52
intercept $x10^{-4}$	-2.5555	-1.3336	1.6866	-2.0751	-1.2067	-1.7377	-1.7659	0.4951	
r^2	0.99946	0.99995	0.99996	0.99988	0.99999	0.99962			
ข.ความสูงพีค(มม.)									
10.0	6.8	6.5	7.0	6.2	6.8	7.0	6.7	0.3	4.65
25.0	14.8	14.8	14.8	14.8	15.5	15.0	15.0	0.3	1.88
50.0	30.2	30.8	30.0	30.8	31.0	31.0	30.6	0.4	1.40
100.0	63.8	65.2	64.0	65.8	65.0	63.2	64.5	1.0	1.53
250.0	165.2	161.8	159.0	165.5	165.5	163.8	163.5	2.6	1.60
slope	0.7	0.6	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7	0.0	1.57
intercept	-1.7	-0.8	-0.6	-1.5	-1.0	-1.2	-1.2	0.4	
r^2	0.99980	0.99991	0.99987	0.99992	0.99991	0.99998			

ตารางที่ 67 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมา ใน 1 วัน (within-run precision) เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=6)

ก.พื้นที่พีค x 10^{-4}									
ความเข้มข้น นนก/มล)	1	2	3	4	5	6	x	SD	%CV
10.0	2.8960	2.8960	3.8967	3.1567	2.8387	2.7563	2.9243	0.1501	5.13
25.0	7.5937	7.6667	7.1999	7.4039	7.8831	7.4647	7.5353	0.2351	3.12
50.0	16.1599	17.0565	16.1684	16.4894	16.3962	16.1392	16.4016	0.3516	2.14
100.0	36.2045	32.0670	36.8158	34.7573	36.2096	36.9921	35.5077	1.8600	5.24
250.0	90.8300	92.0219	89.8904	92.2348	93.7139	85.0048	90.6160	3.0414	3.36
slopex10^{-4}	0.3693	0.3719	0.3657	0.3742	0.3810	0.3879	0.3750	0.0082	2.18
intercept x10^{-4}	-1.4000	-2.0122	-1.1871	-1.7451	-1.7383	-2.0778	-1.6734	0.3454	
r^2	0.99984	0.99887	0.99961	0.99975	0.99986	0.99979			
ข.ความสูงพีค(มม.)									
10.0	5.4	5.2	5.0	5.0	5.5	5.5	5.3	0.2	4.44
25.0	11.8	12.0	11.8	12.4	12.0	11.8	12.0	0.2	1.95
50.0	21.0	24.2	22.5	23.5	22.2	21.0	22.4	1.3	5.79
100.0	46.5	46.5	46.8	47.8	48.2	49.5	47.7	1.1	2.37
250.0	114.2	117.8	119.5	119.2	120.5	117.0	118.0	2.3	1.91
slope	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.0	2.48
intercept	0.0	0.3	-0.4	0.5	-0.3	0.1	0.2	0.1	
r^2	0.99969	0.99995	0.99991	0.99998	0.99998	0.99979			

ตารางที่ 68 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ฮาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ในพลาสมา ใน 1 วัน (within-run precision) เมื่อใช้ แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=6)

ก.พื้นที่พีค x 10^{-4}									
ความเข้มข้น (นก/มล)	1	2	3	4	5	6	x	SD	%CV
10.0	3.0819	3.2525	2.9083	2.9020	3.1668	2.9021	3.0356	0.15381	5.07
25.0	7.2578	8.1408	7.3392	8.0349	8.3289	7.4905	7.7654	0.4574	5.89
50.0	16.1534	16.3410	16.0794	17.2461	16.5981	16.5876	16.5009	0.4234	2.57
100.0	34.1653	37.3751	34.7885	37.0144	35.8204	38.8897	36.3422	1.7569	4.83
250.0	95.4545	97.4589	100.9811	96.0983	98.8702	99.6778	98.0901	2.1354	2.18
slope x 10^{-4}	0.3494	0.3963	0.4128	0.3903	0.4015	0.4079	0.3930	0.0228	5.81
intercept x 10^{-4}	-0.9927	-1.9645	-3.4975	-1.6991	-2.3698	-2.3782	-2.1503	0.8358	
r^2	0.99936	0.99966	0.99867	0.99992	0.99930	0.99970			
ข.ความสูงพีค(มม.)									
10.0	5.8	6.4	5.8	5.8	6.2	6.2	6.0	0.3	4.41
25.0	12.0	13.8	13.2	13.8	13.5	12.5	13.1	0.7	5.61
50.0	28.0	27.5	25.4	27.4	27.8	27.2	27.2	0.9	3.43
100.0	55.0	57.0	53.8	56.8	56.0	56.8	55.9	1.3	2.27
250.0	147.8	149.2	150.0	150.8	150.2	153.2	150.2	1.8	1.20
slope	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.0	1.35
intercept	-2.1	-1.3	-3.1	-1.9	-1.8	-2.7	-2.2	0.6	
r^2	0.99957	0.99973	0.99896	0.99968	0.99956	0.99946			

ตารางที่ 69 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ในพลาสมา ระหว่างวัน (between-run precision) เมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ความเข้มข้น (นนก/มล)	1	2	3	X	SD	%CV
ก.พื้นที่พีค $\times 10^{-4}$						
10.0	2.3898	2.4008	2.4336	2.4081	0.0228	0.95
25.0	7.9671	7.4834	7.3529	7.6011	0.3236	4.26
50.0	17.3031	17.2425	16.1784	16.9080	1.5914	3.74
100.0	35.4902	36.2342	33.1822	34.9689	1.5914	4.55
250.0	92.9087	91.0686	94.8303	92.9359	1.8810	2.02
slope $\times 10^{-4}$	0.3773	0.3703	0.3867	0.3781	0.0082	2.17
intercept $\times 10^{-4}$	-1.6022	-1.3335	-2.8443	-1.9267	0.8059	
r^2	0.99995	0.99995	0.99909			
ข.ความสูงพีค(มม.)						
10.0	6.2	6.5	6.5	6.4	0.2	2.71
25.0	14.9	14.8	14.8	14.8	0.1	0.39
50.0	31.1	30.8	28.6	30.2	1.4	4.52
100.0	62.3	65.2	59.7	62.4	2.8	4.41
250.0	161.0	161.8	166.6	163.1	3.0	1.86
slope	0.6	0.6	0.7	0.7	0.1	1.76
intercept	-1.2	-0.8	-3.2	-1.7	1.3	
r^2	0.99992	0.99991	0.99897			

ตารางที่ 70 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ในพลาสมา ระหว่างวัน (between-run precision) เมื่อใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ก.พื้นที่พีค $x10^{-4}$						
ความเข้มข้น (นนก/มล)	1	2	3	X	SD	%CV
10.0	3.2567	2.8967	3.0355	3.0630	0.1816	5.93
25.0	8.0343	7.6667	7.5483	7.7498	0.2534	3.27
50.0	16.6874	17.0565	16.9697	16.9045	0.1930	1.14
100.0	32.8552	32.0670	35.7238	33.5487	1.9245	5.74
250.0	86.5388	92.0219	91.0636	89.8748	2.9285	3.26
slope $x10^{-4}$	0.3476	0.3719	0.3684	0.3626	0.0131	2.17
intercept $x10^{-4}$	-0.7653	-2.0122	-1.1154	-1.2977	0.6429	
r^2	0.99981	0.99887	0.99990			
ข.ความสูงพีค(มม.)						
10.0	5.7	5.2	5.1	5.3	0.3	6.03
25.0	13.1	12.0	12.5	12.5	0.6	4.39
50.0	26.9	24.2	25.0	25.4	1.4	5.47
100.0	53.9	46.5	48.0	49.5	3.9	7.91
250.0	127.2	117.8	121.2	122.1	4.8	3.90
slope	0.5	0.5	0.5	0.5	0.0	1.21
intercept	-0.3	-0.3	-0.4	-0.4	0.0	
r^2	0.99967	0.99995	0.99996			

ตารางที่ 71 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ในพลาสมา ระหว่างวัน (between-run precision) เมื่อใช้ แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ก.พื้นที่พีค $x10^{-4}$						
ความเข้มข้น (นนก/มล)	1	2	3	X	SD	%CV
10.0	3.9066	3.2525	3.3797	3.5129	0.3468	9.87
25.0	9.2852	8.1408	7.9422	8.4561	0.7249	8.57
50.0	18.1741	16.3410	16.2509	16.9220	1.0853	6.41
100.0	40.4904	37.3751	37.2955	38.3870	1.8220	4.75
250.0	96.8022	97.4589	94.3798	96.2136	1.6217	1.68
slope $x10^{-4}$	0.3896	0.3963	0.3832	0.3897	0.0066	1.68
intercept $x10^{-4}$	-0.1593	-1.9645	-1.4869	-1.2036	0.9354	
r^2	0.99961	0.99966	0.99970			
ข.ความสูงพีค(มม.)						
10.0	6.2	6.4	6.3	6.3	0.1	1.59
25.0	15.5	13.8	13.4	14.2	1.1	7.83
50.0	30.0	27.5	27.0	28.2	1.6	5.71
100.0	62.0	57.0	57.5	58.8	2.8	4.68
250.0	153.5	149.2	151.5	151.4	2.2	1.42
slope	0.6	0.6	0.6	0.6	0.0	0.95
intercept	0.0	-1.3	-1.9	-1.1	1.0	
r^2	0.99997	0.99973	0.99963			

ทำการวิเคราะห์ใน 1 วันหรือระหว่างวัน ก็ให้ผลการวิเคราะห์ไม่ต่างกัน

จากการ validate วิธีวิเคราะห์ เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ ให้ค่า %CV ของความถูกต้อง (accuracy) และความเที่ยงตรง (precision) ของวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด คือน้อยกว่า 10% และมีความผันแปรของ %CV ระหว่างความเข้มข้นที่ทำการศึกษา เมื่อใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีคในการคำนวณน้อย แต่เมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยา เอทานอลให้ค่าอยู่ระหว่าง 90-100% แต่เมทานอลและแอซีโตรไนไตรล์ให้ค่ามากกว่า 100% ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค จึงไม่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมา แม้ว่าการ validate ในขั้นตอนอื่น ๆ อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

จากการพิจารณาลักษณะปรากฏของตะกอนพลาสมาโปรตีนและสารละลายส่วนใส, ลักษณะโครมาโทแกรมพีคของยา และการ validate วิธีวิเคราะห์ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัว ให้ลักษณะปรากฏและลักษณะโครมาโทแกรมดี มีความจำเพาะเจาะจงสูง นอกจากนี้ยังมีความเที่ยงตรง (precision) ในการวิเคราะห์ใน 1 วันและระหว่างวันดี แต่เมื่อพิจารณาเปอร์เซนต์การกลับคืนของยา เมทานอลและแอซีโตรไนไตรล์ให้ค่าที่เกินกว่าที่กำหนด ดังนั้นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่ใช้วิเคราะห์ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ได้ เมื่อยึดถือตามหลักเกณฑ์ในการศึกษา ได้แก่เอทานอล

จากการวิเคราะห์ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ จะเห็นได้ว่าการเลือกสารแยกพลาสมาโปรตีน การดูเฉพาะลักษณะปรากฏและลักษณะโครมาโทแกรม อาจไม่เพียงพอในการตัดสินใจเลือกใช้ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณยาหนึ่งๆ ต้องทำการวิเคราะห์หาเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาในพลาสมา

ด้วย เพื่อให้มั่นใจว่าสารแยกพลาสมาโปรตีนนั้นๆให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง

การวิเคราะห์หาปริมาณยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ในพลาสมาโดยการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนที่มีรายงานการวิเคราะห์โดยวิธีทาง HPLC สารแยกพลาสมาโปรตีนที่ใช้คือ แอซีโตรไนไตรล์ (Lo and Riegelman, 1980) และการใช้แอซีโตรไนไตรล์ร่วมกับสารผสมระหว่างเกลือโซเดียมคลอไรด์ คาร์บอเนต (Albani, Riva and Baruzzi, 1982) การ validate วิธีวิเคราะห์ในรายงานไม่สมบูรณ์และไม่ชัดเจน โดยไม่รายงานค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยา, ไม่แสดงค่าความถูกต้องและความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ และไม่บอกจำนวนตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์

เปรียบเทียบลักษณะโครมาโทแกรมของยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ที่ทำการศึกษากับที่มีในรายงานทั้งสอง พบว่าแบลงค์พลาสมาในการศึกษานี้สะอาดกว่าและใช้เวลาในการวิเคราะห์วิเคราะห์น้อยกว่า

6. <u>ไนเฟดิพีน</u>

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณยาไนเฟดิพีน ในพลาสมา ได้ผลเรียงลำดับแต่ละหัวข้อดังนี้

ก. <u>ลักษณะปรากฏ</u>

ลักษณะปรากฏของตัวอย่างพลาสมาที่ spike ยาไนเฟดิพีน และใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง จะให้ลักษณะปรากฏของตะกอนพลาสมาโปรตีนและสารละลายส่วนใสแสดงดังตารางที่ 72

จากการศึกษาสารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวแยกพลาสมาโปรตีนอยู่ในรูปตะกอนอัดตัวกันแน่น แยกจากสารละลายส่วนใสอย่างชัดเจน และสารละลายส่วนใสมีความใสสะอาด มีปริมาตรมาก และมีค่า pH เป็นกลาง= 7.0 จึงสามารถนำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยฉีดเข้า HPLC ได้ทันที

ตารางที่ 72 ลักษณะปรากฏเมื่อเติม สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล หรือ แอซิโตรไนไตรล์ ลงในพลาสมาที่ spike ยาไนเฟดีน

ลักษณะปรากฏ	สารแยกพลาสมาโปรตีน		
	เมทานอล	เอทานอล	แอซิโตรไนไตรล์
1. เมื่อเติมสารแยก-พลาสมาโปรตีน			
-ลักษณะและสีของตะกอน	ตะกอนขุ่นขาว, เบา		ตะกอนขุ่นขาว, หนัก
-ความเร็วในการแยกตัวออกจากพลาสมา	แยกตัวอย่างรวดเร็ว	แยกตัวอย่างรวดเร็ว	แยกตัวทันที
2. หลังวอเทกซ์			
-ลักษณะตะกอน	เบา	เบา	ก้อนขนาดใหญ่
-สีตะกอน	ขาว-เหลือง	ขาว-เหลือง	เหลืองเข้ม
-ความเร็วของตะกอนในการตกลงสู่ก้นหลอด	ค่อยๆตกลงสู่ก้นหลอด	ค่อยๆตกลงสู่ก้นหลอด	ตกลงสู่ก้นหลอดทันที
3. หลังเซนตริฟิวก์			
-ตะกอน			
-ลักษณะและความอัดแน่นของตะกอน	อนุภาคเล็กๆอัดตัวกันแน่น	อนุภาคเล็กๆอัดตัวกันแน่น	ก้อนตะกอนขนาดใหญ่อัดตัวกันแน่น
-สีของตะกอน	ขาว	ขาว	เหลือง-น้ำตาล
-สารละลายส่วนใส			
-ความใส	ใสสะอาด	ใสสะอาด	ใสสะอาด
-สีของสารละลาย	เหลืองอ่อน สีเข้มขึ้นตามความเข้มข้น	เหลืองอ่อน สีเข้มขึ้นตามความเข้มข้น	เหลืองอ่อน สีเข้มขึ้นตามความเข้มข้น
-ปริมาตร (มล.)	2.05-2.15	2.05-2.15	2.30-2.40
-pH	7.0	7.0	7.0

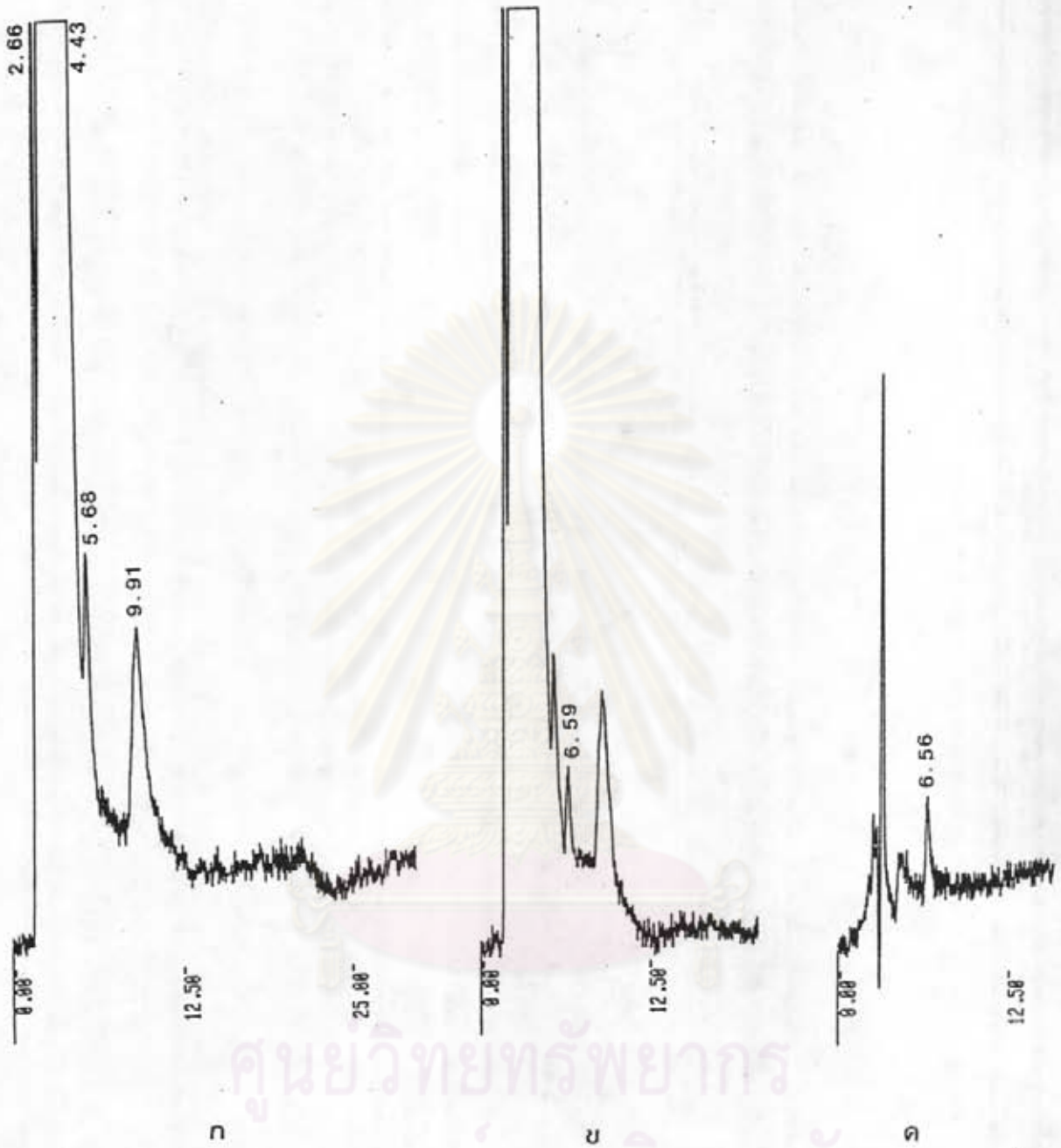
ข. ลักษณะโครมาโทแกรม

ลักษณะโครมาโทแกรม เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอล หรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง แสดงในรูปที่ 31, 32 และ 33 ตามลำดับ

จากลักษณะโครมาโทแกรม สารแยกพลาสมาโปรตีนเมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ ให้ลักษณะพีคของยาไนเฟดิพีนในสารละลายมาตรฐานในเมทานอลและในพลาสมาที่สมมาตร, แคบ และไม่ถูกรบกวนด้วย endogenous substance หรือสารอื่น ๆ นอกจากนี้ค่า retention time ของยาไนเฟดิพีนในสารละลายมาตรฐานในเมทานอลและในในพลาสมามีค่าเหมือนกัน แสดงว่าการใช้สารแยกพลาสมาทั้ง 3 ตัว ในการวิเคราะห์ยาไนเฟดิพีนในพลาสมา มีความจำเพาะเจาะจงดีมาก

การปรากฏของ endogenous substance ในโครมาโทแกรม เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล, เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ มีจำนวน 4, 5 และ 3 พีคตามลำดับ เมื่อใช้เมทานอล จะมีค่า rentention time ที่ 2.66, 4.43, 5.68 และ 9.91 นาที เมื่อใช้เอทานอล พีค endogenous substance ปรากฏที่เวลา 2.39, 4.31, 5.44, 9.00 และ 10.51 นาที สำหรับแอซีโตรไนไตรล์ ค่า retention time ของพีค endogenous substance อยู่ที่ 3.23, 5.48 และ 10.44 นาที

เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ เติมในสารละลายมาตรฐานของไนเฟดิพีนในเมทานอล จะปรากฏพีคของไนเฟดิพีนในโครมาโทแกรมที่เวลา 6.56,6.53 และ 6.49 นาที ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกันมากกับการเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนดังกล่าวใน

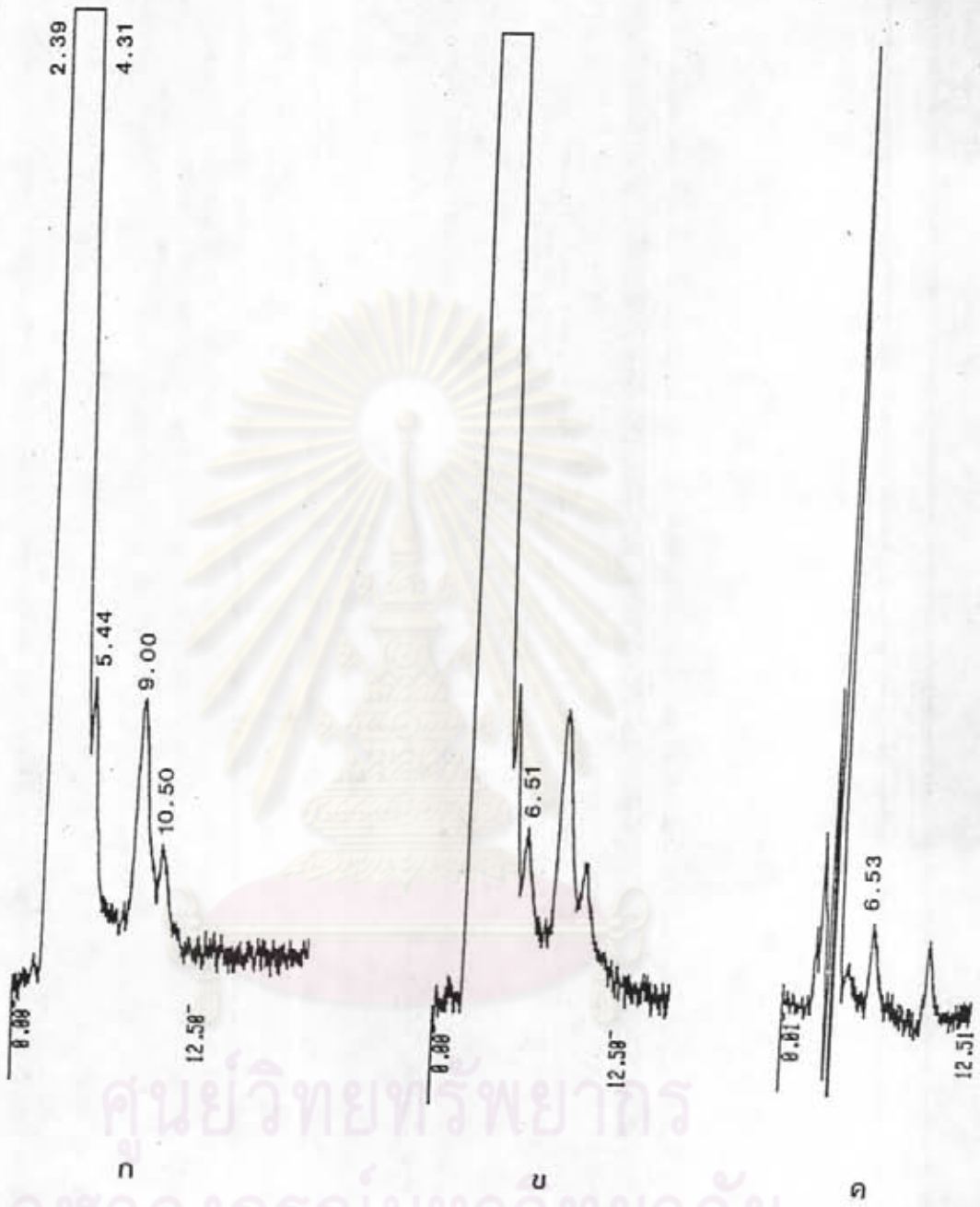


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 31 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาไนเฟดิพีน ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยาไนเฟดิพีน (240.0 นนก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาไนเฟดิพีนในเมทานอล (240.0 นนก/มล)

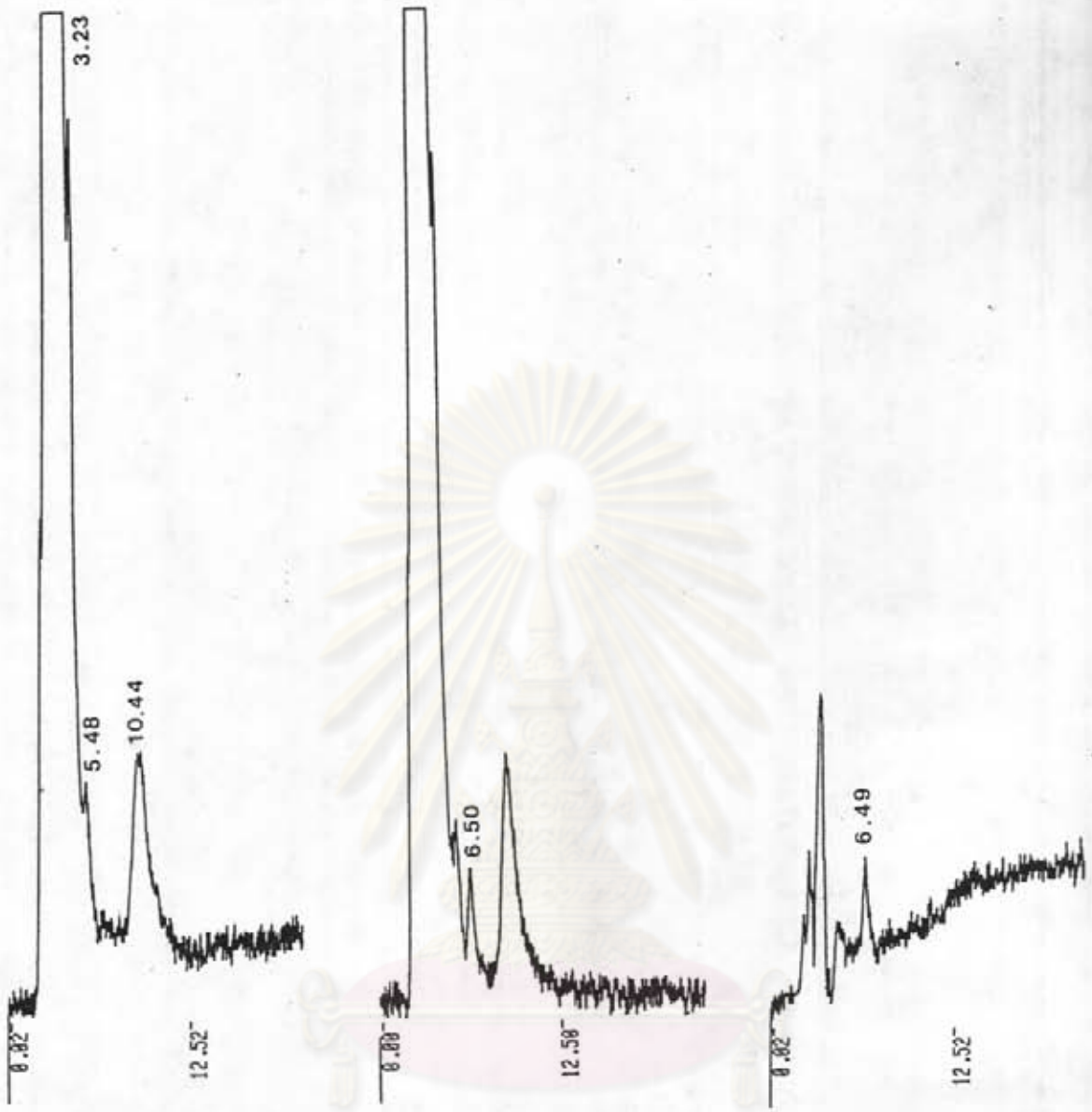


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 32 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาไนเฟดิพีน ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยาไนเฟดิพีน (240.0 นนก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาไนเฟดิพีนในเมทานอล (240.0 นนก/มล)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 33 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาไนเฟดิพีน ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยาไนเฟดิพีน (240.0 นนก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาไนเฟดิพีนในเมทานอล (240.0 นนก/มล)

แบลงค์พลาสมาที่เติมยาไนเฟดิพีน โดยพีคของยาในโครมาโทแกรม อยู่ที่เวลา 6.59, 6.51 และ 6.50 นาที ตามลำดับ

จากลักษณะปรากฏของตะกอนและสารละลายส่วนใส และลักษณะโครมาโทแกรมพีคของยาแสดงให้เห็นว่าสารแยกพลาสมาโปรตีนเมทานอล เอทานอล และ แอซีโตรไนไตรล์ เหมาะที่จะใช้ในการวิเคราะห์ไนเฟดิพีนในพลาสมาได้ จึงทำการ validate สำหรับสารแยกพลาสมาโปรตีนแต่ละตัว

ค. <u>การ Validate วิธีวิเคราะห์</u>

ทำการ validate วิธีวิเคราะห์ยาไนเฟดิพีนในพลาสมา เมื่อใช้ เมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน โดย validate ทั้งพื้นที่พีค และความสูงพีค

1. <u>Linearity</u>

จากการทดลองไม่สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคกับความเข้มข้นของยาไนเฟดิพีนในพลาสมา และความสูงพีคกับความเข้มข้นของยาไนเฟดิพีนในพลาสมา ในช่วงความเข้มข้น 20-240 นนก/มล โดยมีเมทานอลหรือเอทานอลหรือแอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาพลาสมาโปรตีน ทั้งนี้เพราะยาไนเฟดิพีนมีขนาดการรับประทานต่ำมาก (5-20 mg) ระดับความเข้มข้นยาที่อยู่ในช่วงที่จะตรวจพบในร่างกายได้ จากรายงานตามวารสารอยู่ในช่วงที่ได้ศึกษาคือ 20-240 นนก/มล ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่ต่ำมาก เกินกว่าที่วิธีการแยกพลาสมาโปรตีนจะใช้วิเคราะห์ยาได้

2. <u>ขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์</u>

(Lower Limit of Sensitivity)

ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่ได้ทำการทดลองหาขีดจำกัด

ของวิธีวิเคราะห์ เพราะที่ความเข้มข้นสูงสุดของยาไนเฟดิพีนในพลาสมา ที่ทำการศึกษาคือ 240.0 นนก/มล เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ จะให้ค่าอัตราส่วน S/N น้อยกว่า 2:1

3. ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

การใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เป็น เมทานอล หรือ เอทานอลหรือแอซีโตรไนไตรล์ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาไนเฟดิพีนในพลาสมา มีความจำเพาะเจาะจงสูง เมื่อใช้ความเข้มข้นของยาในการศึกษา = 240.0 นนก/มล ดังได้กล่าวแล้วในลักษณะโครมาโทแกรม ในข้อ 6.ข.

4. ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

ก) เปอร์เซนต์การกลับคืนของยาในการแยกออกจากพลาสมา (Physical Recovery)

ผลการทดลองหาเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาไนเฟดิพีนที่แยกจากพลาสมาเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานไนเฟดิพีนในเมทานอลที่ความเข้มข้นเท่ากันเมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ แสดงในตารางที่ 73, 74 และ 75 ตามลำดับ

จากการทดลอง เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ ให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาในแต่ละความเข้มข้นแตกต่างกันมาก พิจารณาจาก % CV ที่มีค่ามาก และ % CV ระหว่างความเข้มข้นมีความแปรปรวนสูง โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำการศึกษา คือ 20 นนก/มล ไม่สามารถตรวจพบได้ แสดงว่าการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวดังกล่าวไม่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ยาไนเฟดิพีนในพลาสมา ในช่วงความเข้มข้นยาที่จะตรวจพบในร่างกายคือ 20-240 นนก/มล.

ตารางที่ 73 เปอร์เซนต์การกลับคืนของยา ไนเฟดิปีน ที่แยกจากพลาสมา (physical recovery) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ก.พื้นที่พีค						
ความเข้มข้น (นนก/มล)	1	2	3	X	SD	%CV
20.0	*	*	*	-	-	-
40.0	41.71	28.15	63.29	44.38	17.72	39.93
80.0	45.72	111.4	78.17	78.43	32.85	41.88
160.0	94.04	85.35	60.56	79.92	17.48	21.88
240.0	73.14	87.48	80.34	80.32	7.17	8.93
ข.ความสูงพีค(มม.)						
20.0	*	*	*	-	-	-
40.0	86.96	70.16	86.96	81.36	9.70	11.92
80.0	100.0	114.3	85.71	99.99	14.28	14.28
160.0	97.78	97.78	87.11	94.22	6.16	6.54
240.0	70.45	82.39	82.39	78.41	6.89	8.79

หมายเหตุ เครื่องหมาย * หมายถึง ตรวจไม่พบสาร

ตารางที่ 74 เปอร์เซนต์การกลับคืนของยา ไนเฟดิพีน ที่แยกจากพลาสมา (physical recovery) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ความเข้มข้น (นนก/มล)	1	2	3	X	SD	%CV
ก.พื้นที่พีค						
20.0	*	*	*	-	-	-
40.0	188.2	31.49	70.71	96.81	81.57	84.26
80.0	242.6	*	131.0	186.8	-	-
160.0	106.0	57.85	*	81.94	-	-
240.0	71.11	69.00	105.0	81.69	20.17	24.70
ข.ความสูงพีค(มม.)						
20.0	*	*	*	-	-	-
40.0	130.4	78.26	95.65	101.4	26.56	26.18
80.0	140.0	*	100.0	120.0	-	-
160.0	115.3	88.23	*	101.8	-	-
240.0	101.71	101.70	110.78	104.73	5.21	4.97

หมายเหตุ เครื่องหมาย * หมายถึง ตรวจไม่พบสาร

ตารางที่ 75 เปอร์เซนต์การกลับคืนของยา ไนเฟดิพีน ที่แยกจากพลาสมา (physical recovery) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ความเข้มข้น (นนก/มล)	1	2	3	X	SD	%CV
ก.พื้นที่พีค						
20.0	127.9	*	*	-	-	-
40.0	93.13	*	126.3	110.7	-	-
80.0	*	123.2	115.1	119.1	-	-
160.0	93.47	106.5	65.92	88.64	20.73	23.38
240.0	90.52	106.6	116.7	104.6	13.21	12.63
ข.ความสูงพีค(มม.)						
20.0	166.7	200.0	200.0	188.9	19.24	10.19
40.0	100.0	62.50	100.0	87.50	21.65	24.74
80.0	*	66.66	115.6	91.11	-	-
160.0	61.73	49.38	43.21	51.44	9.43	18.33
240.0	90.91	96.00	98.18	95.03	3.73	3.92

หมายเหตุ เครื่องหมาย * หมายถึง ตรวจไม่พบสาร

ค่าพื้นที่พีค เป็นค่าที่ได้จากการ intregrate ของเครื่องอินทริเกรเตอร์

จากค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาดังกล่าวจึงมิได้ทำการ validate เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ และความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

จากผลการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ยาไนเฟดิพีนในพลาสมา แสดงให้เห็นว่า เมื่อระดับความเข้มข้นยาที่ต้องการตรวจพบในร่างกายค่อนข้างต่ำ วิธีการแยกพลาสมาโปรตีนไม่เหมาะกับการวิเคราะห์ยานั้น ๆ ในพลาสมา เพราะการเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนในตัวอย่างพลาสมาจะทำให้ตัวอย่างมีปริมาตรมากขึ้น จึงเจือจางความเข้มข้นของยาในพลาสมานั้น ความไวในการตรวจพบสารจึงลดลง เมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดแยกยาออกจากพลาสมาด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ปริมาตรของตัวอย่างก่อนฉีดเข้า HPLC จะมีปริมาตรน้อยกว่าวิธีการแยกพลาสมาโปรตีนเมื่อใช้ตัวอย่างพลาสมาจำนวนเท่ากัน ความเข้มข้นของยาในตัวอย่างเมื่อฉีดเข้า HPLC จึงมากความไวในการตรวจวิเคราะห์จึงสูงกว่า

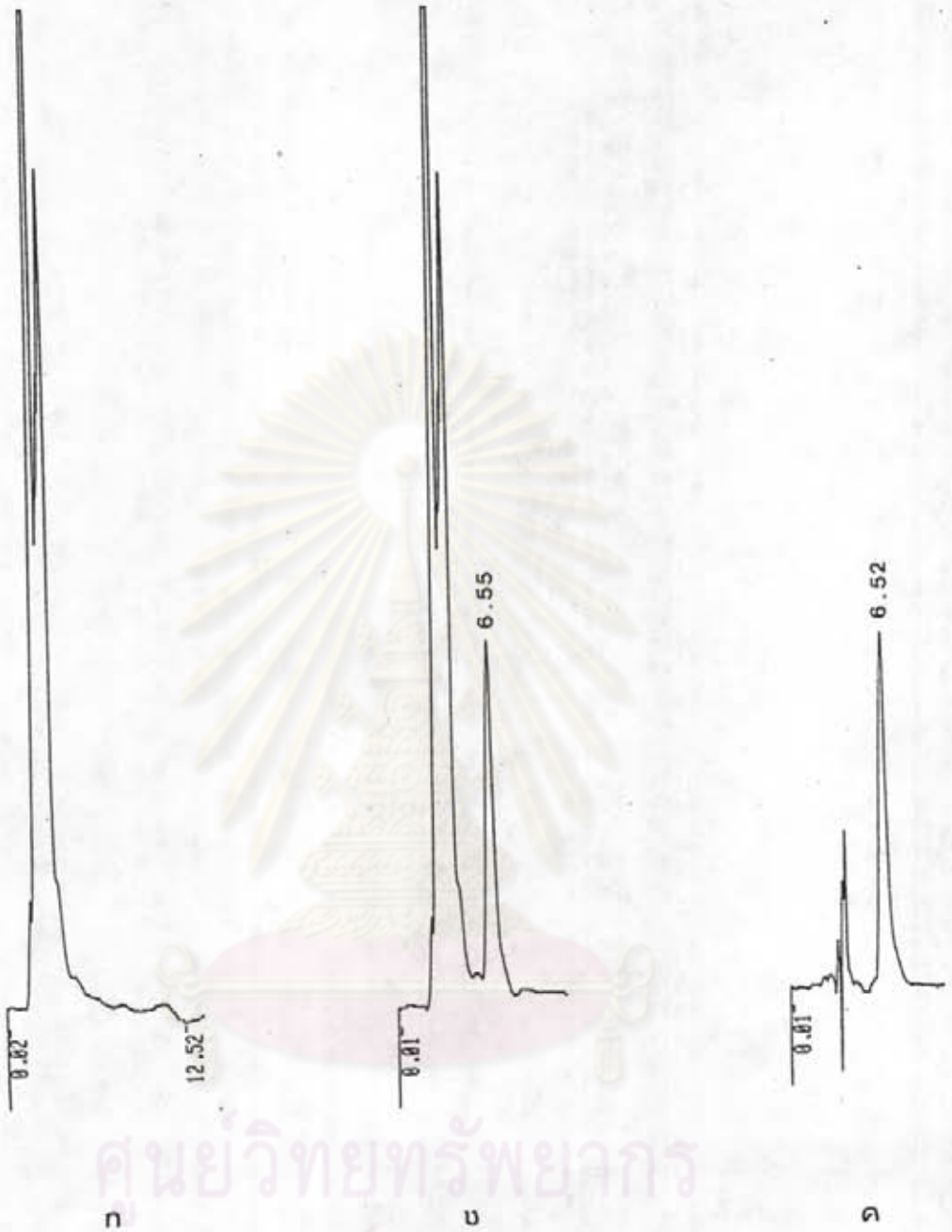
เนื่องจากผลการศึกษาเบื้องต้นโดยใช้ความเข้มข้น 240.0 นนก/มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสูดของยาไนเฟดิพีนในพลาสมา เมื่อพิจารณาจากลักษณะปรากฏ ดังแสดงในตารางที่ 72 และ ลักษณะโครมาโทแกรม ดังแสดงในรูปที่ 31-33 แสดงให้เห็นว่า ยาไนเฟดิพีนน่าจะวิเคราะห์โดยวิธีการแยกพลาสมาโปรตีนได้ แต่เพราะความเข้มข้นของยาในพลาสมาถูกเจือจาง เมื่อฉีดเข้า HPLC ดังได้กล่าวแล้ว ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองว่าถ้าระดับยาไนเฟดิพีนในพลาสมาอยู่ในระดับใกล้เคียงกับตัวยาอื่นๆ ที่ได้ทำการศึกษามาคือ 0.50-20.0 มคก/มล จะมีปัญหาของการแยกพลาสมาโปรตีนหรือไม่ จึงได้ทำการวิเคราะห์ยาไนเฟดิพีนในพลาสมา ด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน โดยทำที่ความเข้มข้นมากกว่าเดิม คือ 0.50-20.0 มคก/มล. ในสภาวะการทดลองเดิม เพื่อพิสูจน์ว่าความเข้มข้นที่ต่ำของยาในพลาสมาจะมีผลต่อการตรวจหาสาร ดังได้มีผู้รายงานไว้ (Bruke and Thenot, 1985; Szepesi, 1990)

ลักษณะปรากฏของตัวอย่างพลาสมาที่ spike ยาไนเฟดิพีน ในช่วงความเข้มข้น 0.50-20.0 มคก/มล. และใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ อย่างใดอย่างหนึ่ง จะให้ลักษณะปรากฏของตะกอนพลาสมาโปรตีน และสารละลายส่วนใสเช่นเดียวกับ การศึกษาเบื้องต้นซึ่งแสดงดังตารางที่ 72 และ ได้ลักษณะโครมาโทแกรมแสดงในรูปที่ 34, 35 และ 36 ตามลำดับ

จากลักษณะโครมาโทแกรม เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอล หรือเอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์ เติมในสารละลายมาตรฐานของไนเฟดิพีนในเมทานอล จะปรากฏพีคของไนเฟดิพีนในโครมาโทแกรมซึ่งมีความสมมาตรดีที่เวลา 6.52, 6.50 และ 6.54 นาที ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกันมากกับการเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนดังกล่าวในแบลงค์พลาสมาที่เติมตัวยาไนเฟดิพีน โดยพีคของยาในโครมาโทแกรมอยู่ที่เวลา 6.55, 6.48 และ 6.52 นาที ตามลำดับ โดยพีคของยามีความสมมาตรดีเช่นกัน และการปรากฏของ endogenous substance ในโครมาโทแกรมเหมือนกับการศึกษาในเบื้องต้น จึงมีความจำเพาะเจาะจงดี

ทำการหาเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาในช่วงความเข้มข้น 0.50-20.0 มคก/มล ตามวิธีในหัวข้อ Validation(หน้า29) ได้ผลการทดลองหาค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาไนเฟดิพีนที่แยกจากพลาสมาเมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนเป็นเมทานอลหรือเอทานอลหรือแอซีโตรไนไตรล์ แสดงในตารางที่ 76

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาเมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล และ แอซีโตรไนไตรล์ ให้ค่ามากกว่า 90% ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค สำหรับเอทานอลที่



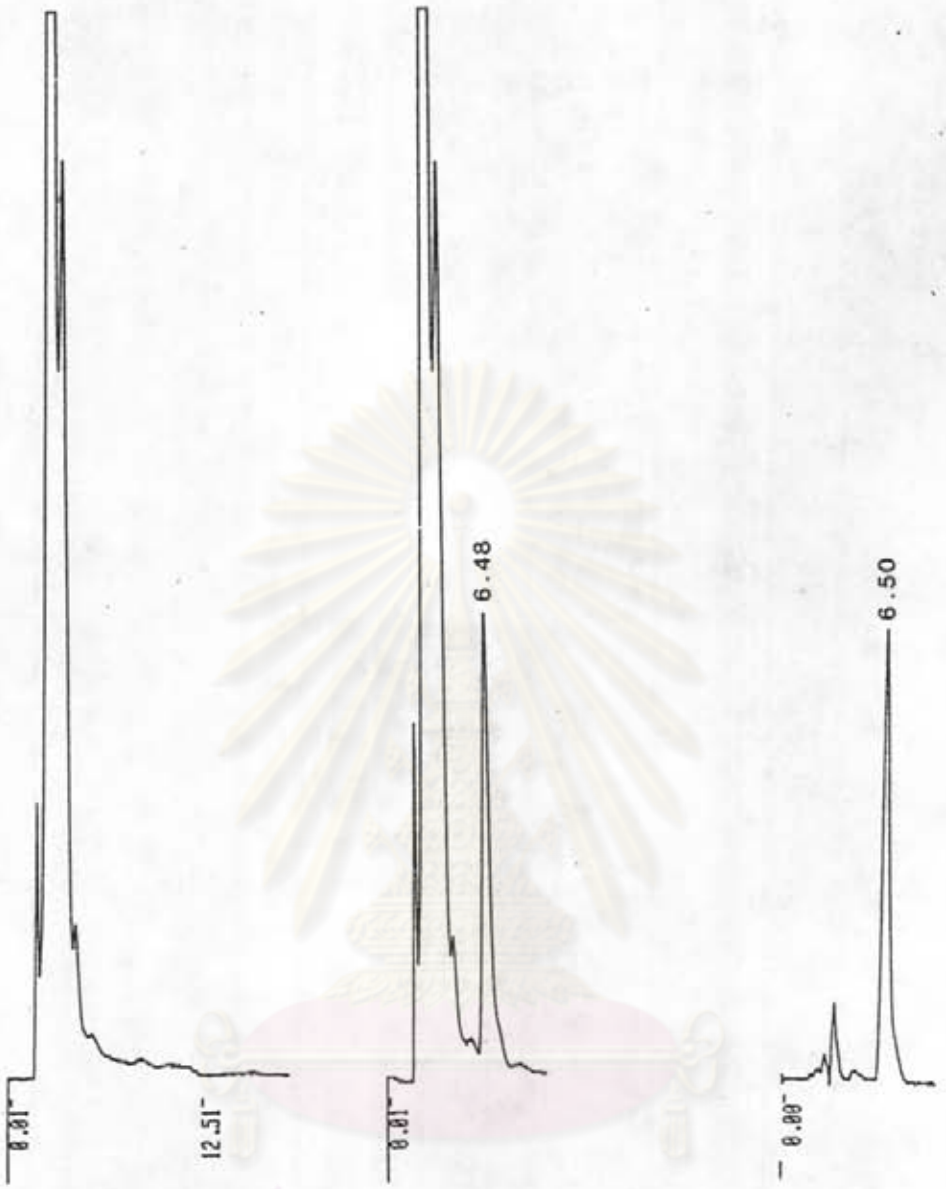
ก ข ค

รูปที่ 34 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาไนเฟดิพีน ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยาไนเฟดิพีน (10.0 มคก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาไนเฟดิพีนในเมทานอล (10.0 มคก/มล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

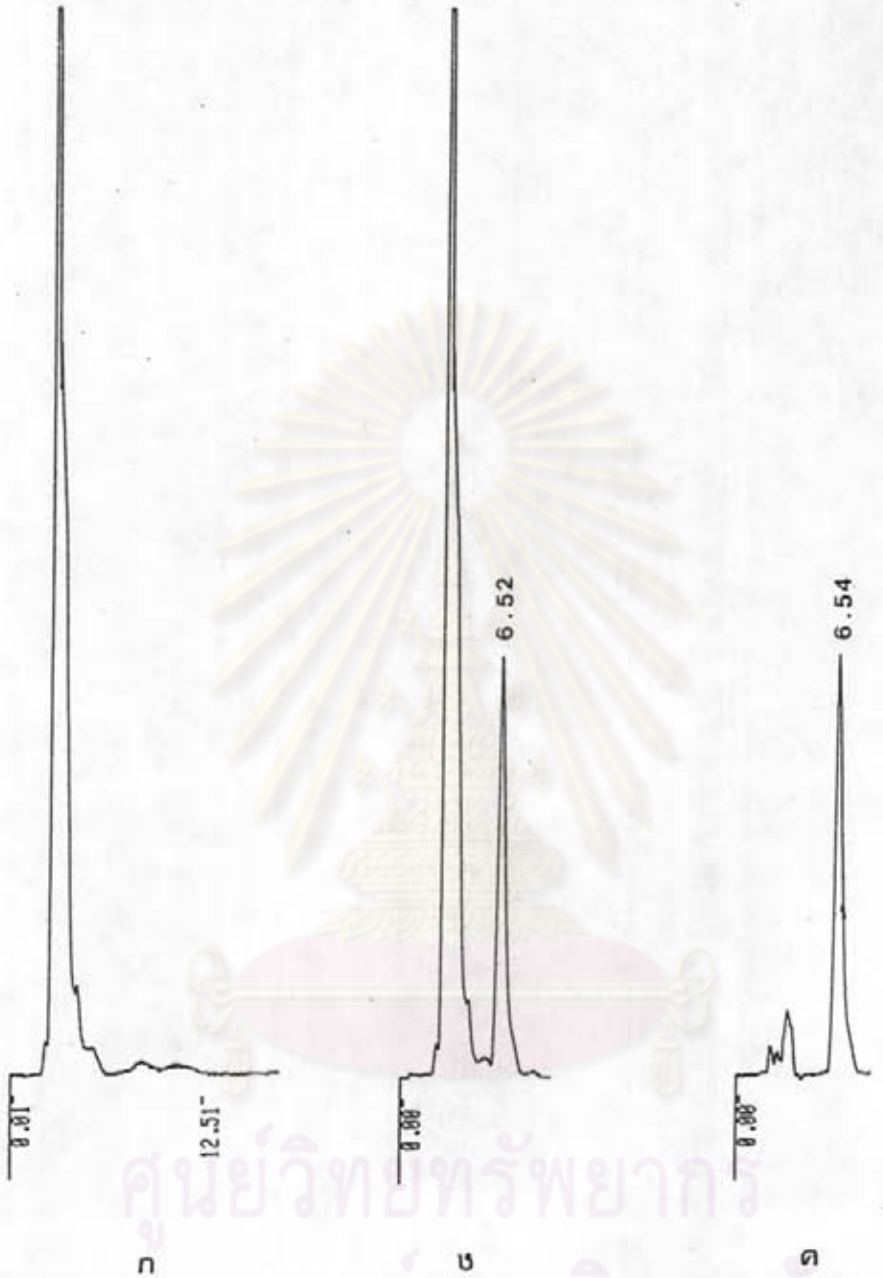


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 35 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาไนเฟดิพีน ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยาไนเฟดิพีน (10.0 มคก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาไนเฟดิพีนในเมทานอล (10.0 มคก/มล)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 36 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาไนเฟดิพีน ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยาไนเฟดิพีน (10.0 มคก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาไนเฟดิพีนในเมทานอล (10.0 มคก/มล)

ตารางที่ 76 เปอร์เซนต์การกลับคืนของยา ไนเฟดิพีน ที่แยกจากพลาสมา (physical recovery) ที่ความเข้มข้น 0.5-20.0 มคก/มล เมื่อใช้ เมทานอล หรือเอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน(n=2)

ความเข้มข้นของยาในพลาสมา (มคก/มล)	เมทานอล					
	พื้นที่พีค			ความสูงพีค		
	1	2	X	1	2	X
0.5	95.83	87.98	91.90	97.22	88.89	93.06
1.0	100.4	96.61	98.52	96.88	96.88	96.88
5.0	99.00	99.97	99.48	101.3	101.3	101.3
10.0	96.15	97.72	96.94	96.93	97.10	97.02
20.0	98.80	99.12	98.96	101.5	101.3	101.4
	เอทานอล					
0.5	90.94	83.09	87.02	90.00	90.00	90.00
1.0	85.09	86.71	85.90	91.53	93.22	92.38
5.0	97.35	95.92	96.64	101.8	100.7	101.3
10.0	98.99	106.6	102.8	100.6	106.9	103.8
20.0	98.03	98.90	98.46	100.9	101.6	101.2
	แอซีโตรไนไตรล์					
0.5	90.90	93.88	92.39	97.78	97.78	97.78
1.0	93.23	91.70	92.46	101.2	98.97	100.1
5.0	91.38	89.95	90.66	95.47	98.76	97.12
10.0	90.08	92.11	91.09	96.60	99.40	98.00
20.0	99.90	99.41	99.66	103.31	99.14	101.2

ความเข้มข้นต่ำให้ค่ามากกว่า 85% เมื่อใช้พื้นที่พีค เมื่อความเข้มข้นสูงในช่วง 5.0-20.0 มคก/มล ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยามากกว่า 90% ส่วนความสูงพีคมีค่ามากกว่า 90% ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา แสดงว่า วิธีการวิเคราะห์ยาไนเฟดิพีนในพลาสมา โดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ สามารถใช้ได้ในช่วงความเข้มข้นของยาที่สูงขึ้น แต่อย่างไรก็ดีในการศึกษาไม่ได้ทำการ validate วิธีวิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นที่สูงขึ้นคือ 0.50-20.0 มคก/มล นี้ เพราะในทางปฏิบัติไม่สามารถนำวิธีนี้ไปใช้ได้จริง เนื่องจากความเข้มข้นของยาไนเฟดิพีนในพลาสมาจะอยู่ในช่วง 20-240 นนก/มล

จากการศึกษาการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ ในการวิเคราะห์หาปริมาณไนเฟดิพีนในพลาสมา เนื่องจากความเข้มข้นของยาไนเฟดิพีนในพลาสมามีค่าต่ำมาก เปอร์เซนต์การกลับคืนของยาจึงมีความแปรปรวนมาก และลักษณะโครมาโทแกรมพีคของยาก็มีขนาดเล็กมาก โดยไม่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการจับของยาไนเฟดิพีนกับพลาสมาโปรตีนในพลาสมาอย่างเหนียวแน่น เพราะเมื่อทำการทดลองเพิ่มความเข้มข้นของยาให้สูงขึ้น สามารถทำการวิเคราะห์หาปริมาณยาไนเฟดิพีนในพลาสมาโดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวได้ดี เปอร์เซนต์การกลับคืนของยา >90% และโครมาโทแกรมมีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังนั้นข้อจำกัดข้อหนึ่งสำหรับการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา คือ ความเข้มข้นที่ต่ำมากของยาในพลาสมา

เพื่อเป็นการยืนยันว่า ยาที่มีระดับความเข้มข้มในพลาสมาต่ำอาจวิเคราะห์โดยการแยกพลาสมาโปรตีนไม่ได้ การศึกษานี้จึงคัดเลือกตัวยาอื่นๆที่มิได้กำหนดไว้ในโครงการศึกษานี้อีก 1 ตัว ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับยาไนเฟดิพีน คือ ยาไกลเบนคลาไมด์ ที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่าง

เหนียวแน่น = 99% และความเข้มข้นของยาในพลาสมาต่ำเช่นเดียวกับยาไนเฟดิพีน คืออยู่ในระหว่าง 20-400 นนก/มล. มาทำการวิเคราะห์โดยการแยกพลาสมาโปรตีนเช่นเดียวกับยาไนเฟดิพีน

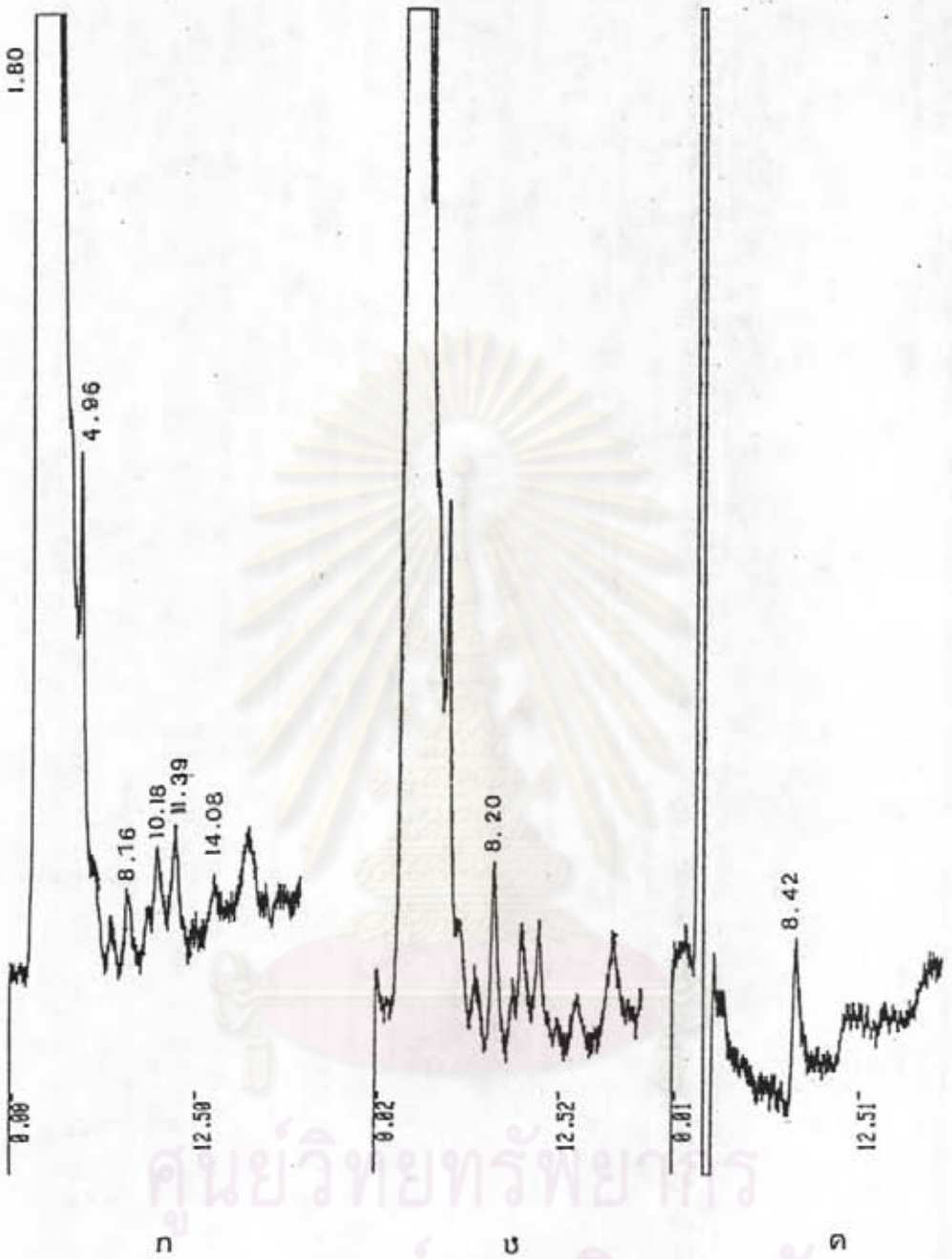
ตัวยาที่คัดเลือกมาศึกษาเพิ่มเติมคือไกลเบนคลาไมด์ ถึงแม้ว่ามีตัวยาอื่นๆอีกหลายตัวที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีน และความเข้มข้นของยาในพลาสมาใกล้เคียงกับยาไนเฟดีพีน คือไนตร้าซีแพม, เวอร์ราพามิล, ไกล์พิไซด์, ฮาโลเพอริดอล, โบรโมคริบตีน และอะมิทริบทาลีน แต่ตัวยาเหล่านี้เป็นยาที่ผลิตจากต่างประเทศ จึงไม่สามารถนำมาศึกษาได้

จากการศึกษา ลักษณะปรากฏเมื่อเติมสารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์ ลงในพลาสมาที่ spike ยาไกลเบนคลาไมด์ ได้ผลแสดงในตารางที่ 77 แอซีโตรไนไตรล์ ให้ลักษณะปรากฏที่ดีที่สุด แต่สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัว แยกพลาสมาโปรตีนอยู่ในรูปตะกอนอัดตัวกันแน่นแยกจากสารละลายส่วนใสอย่างชัดเจน และสารละลายส่วนใสมีความใสสะอาด มีปริมาตรมาก และมีค่า pH เป็นกลาง = 7.0 จึงสามารถนำสารละลายส่วนใส ไปวิเคราะห์หาปริมาณ โดยฉีดเข้า HPLC ได้ทันที และโครมาโทแกรมเมื่อใช้เมทานอล หรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ แสดงในรูปที่ 37, 38 และ 39 ตามลำดับ

พิจารณาลักษณะโครมาโทแกรม เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล หรือเอทานอล เติมในสารละลายมาตรฐานของไกลเบนคลาไมด์ ในเมทานอลจะปรากฏพีคของไกลเบนคลาไมด์ซึ่งมีลักษณะสมมาตรและแคบที่เวลา 8.42 และ 8.38 นาที ตามลำดับ ซึ่งให้ค่าแตกต่างกันกับเมื่อเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนดังกล่าวในแบลงค์พลาสมาที่เติมลงไกลเบนคลาไมด์ พีคของยาในโครมาโทแกรม อยู่ที่เวลา 8.20 และ 8.28 นาทีตามลำดับ เพราะพีค

ตารางที่ 77 ลักษณะปรากฏเมื่อเติม สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์ ลงในพลาสมาที่ spike ยาไกลเบนคลาไมด์

ลักษณะปรากฏ	สารแยกพลาสมาโปรตีน		
	เมทานอล	เอทานอล	แอซีโตรไนไตรล์
1. เมื่อเติมสารแยก-พลาสมาโปรตีน			
-ลักษณะและสีของตะกอน	ตะกอนขุ่นขาว, เบา		ตะกอนขุ่นขาว, หนัก
-ความเร็วในการแยกตัวออกจากพลาสมา	แยกตัวอย่างรวดเร็ว	แยกตัวอย่างรวดเร็ว	แยกตัวทันที
2. หลังวอเทกซ์			
-ลักษณะตะกอน	เบา	เบา	ก้อนขนาดใหญ่
-สีตะกอน	ขาว-เหลือง	ขาว-เหลือง	เหลืองเข้ม
-ความเร็วของตะกอนในการตกลงสู่ก้นหลอด	ค่อยๆตกลงสู่ก้นหลอด	ค่อยๆตกลงสู่ก้นหลอด	ตกลงสู่ก้นหลอดทันที
3. หลังเซนตริฟิวก์			
-ตะกอน			
-ลักษณะและความอัดแน่นของตะกอน	อนุภาคเล็กๆอัดตัวกันแน่น	อนุภาคเล็กๆอัดตัวกันแน่น	ก้อนตะกอนขนาดใหญ่อัดตัวกันแน่น
-สีของตะกอน	ขาว	ขาว	เหลือง-น้ำตาล
-สารละลายส่วนใส			
-ความใส	ใสสะอาด	ใสสะอาด	ใสสะอาด
-สีของสารละลาย	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน
-ปริมาตร (มล.)	2.05-2.15	2.05-2.15	2.30-2.40
-pH	7.0	7.0	7.0

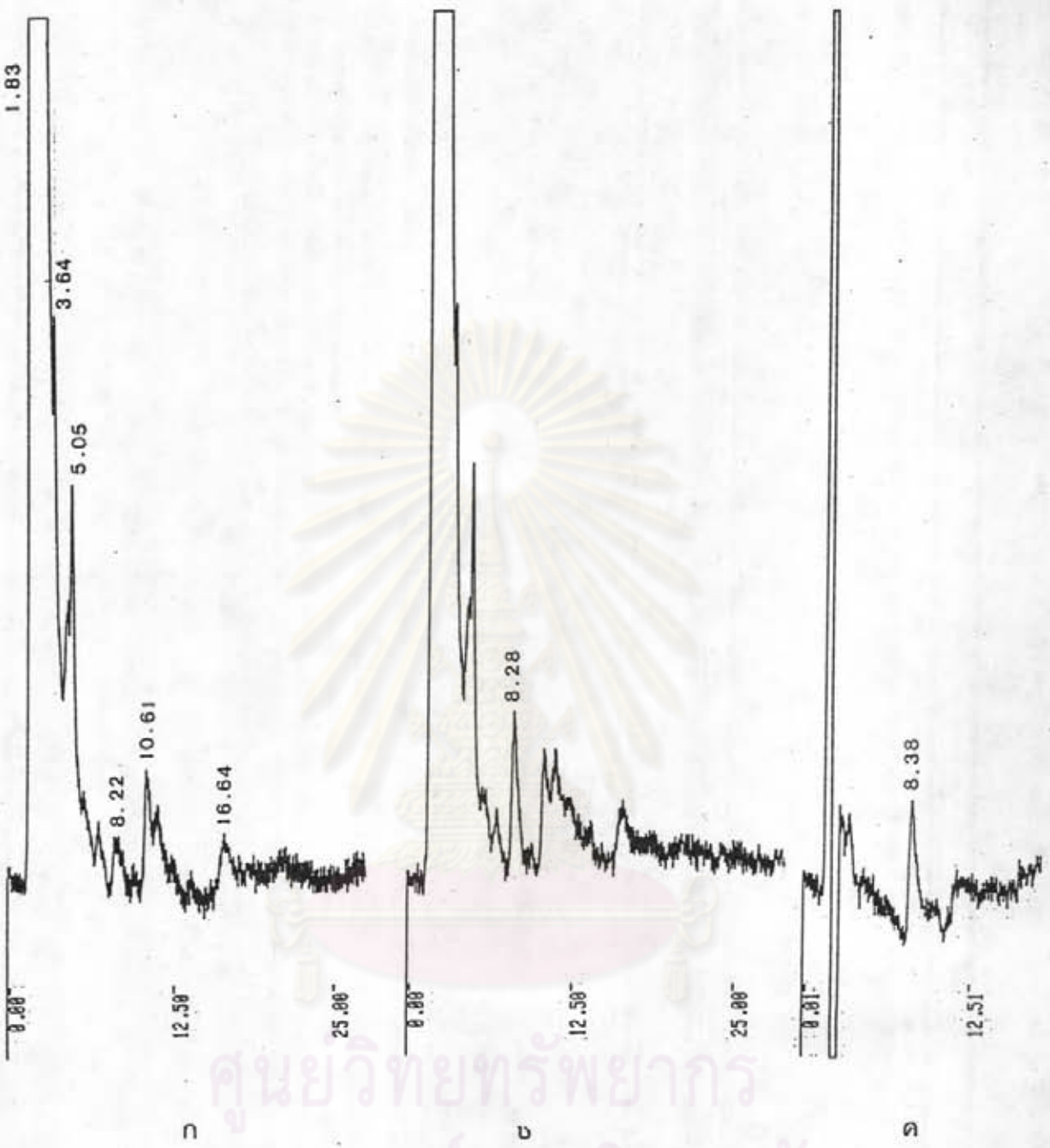


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 37 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาไกลเบนคลาไมด์ ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยาไกลเบนคลาไมด์ (400 นนก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาไกลเบนคลาไมด์ ในเมทานอล (400 นนก/มล)

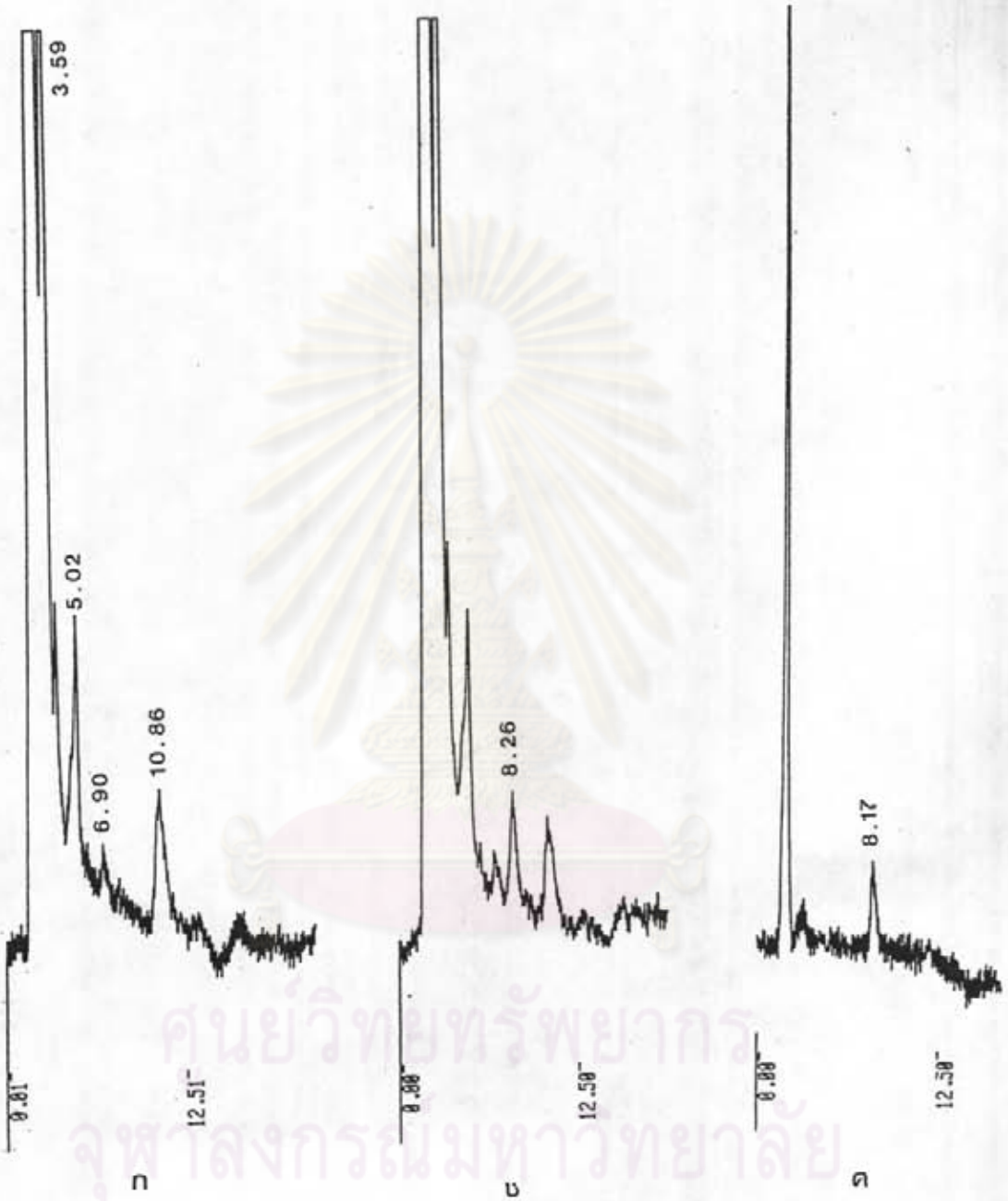


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 38 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาไกลเบนคลาไมด์ ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยาไกลเบนคลาไมด์ (400 นนก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาไกลเบนคลาไมด์ ในเมทานอล (400 นนก/มล)



รูปที่ 39 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์ ยาไกลเบนคลาไมด์ ที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้ แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

รูป ก และ ข เป็นโครมาโทแกรมของ แบลงค์พลาสมา และ ของพลาสมาที่เติมยาไกลเบนคลาไมด์ (400 นนก/มล) ตามลำดับ

รูป ค เป็นโครมาโทแกรม ของสารละลายมาตรฐาน ยาไกลเบนคลาไมด์ ในเมทานอล (400 นนก/มล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ของยาไกลเบนคลาไมด์ถูกรบกวนด้วยพีคของ endogenous substance ซึ่งมีจำนวน 6 พีค โดยเมื่อใช้เมทานอล จะมีค่า retention time ที่ 1.80, 4.96, 8.16, 10.18, 11.39 และ 14.08 นาที สำหรับเอทานอล พีคของ endogenous subtance ปรากฏที่เวลา 1.83, 3.64, 5.05, 8.22, 10.61 และ 16.64 นาที การใช้เมทานอล และเอทานอล จึงไม่มีความจำเพาะเจาะจง

เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน แอซีโตรไนไตรล์ เติมในสารละลายมาตรฐานของไกลเบนคลาไมด์ในเมทานอล จะปรากฏพีคของไกลเบนคลาไมด์ในโครมาโมแกรมซึ่งมีลักษณะสมมาตรและแคบ ที่เวลา 8.17 นาที ซึ่งใกล้เคียงกันกับการเติมแอซีโตรไนไตรล์ในแบลงค์พลาสมาที่เติมยาไกลเบนคลาไมด์ โดยพีคของยาในโครมาโทแกรมอยู่ที่เวลา 8.26 นาที และพีคของยามีลักษณะสมมาตรและแคบดี

การปรากฏของ endogenous substance ในโครมาโทแกรมเมื่อใช้แอซีโตรไนไตรล์ มีจำนวน 4 พีค โดยมี retention time ที่ 3.59, 5.02, 6.90 และ 10.86 นาที ซึ่งไม่รบกวนพีคของยาไกลเบนคลาไมด์ การใช้แอซีโตรไนไตรล์ จึงมีความจำเพาะเจาะจงดี

จากลักษณะปรากฏและลักษณะโครมาโทแกรม แอซีโตรไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่ให้ลักษณะปรากฏดีที่สุดและพีคของยาไกลเบนคลาไมด์มีความจำเพาะเจาะจงดี จึงทำการหาค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาที่แยกจากพลาสมา โดยคำนวณจากค่าพื้นที่พีคและค่าความสูงพีค ได้ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 78

ตารางที่ 78 เปอร์เซนต์การกลับคืนของยา ไกลเบนคลาไมด์ ที่แยกจากพลาสมา (physical recovery) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้แอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (n=3)

ความเข้มข้น (นนก/มล)	1	2	3	X	SD	%CV
ก.พื้นที่พีค						
20.0	*	*	*	-	-	-
50.0	122.2	70.48	152.6	115.1	41.52	36.07
100.0	64.06	256.0	232.0	184.0	104.5	56.83
200.0	131.7	185.9	132.3	150.3	30.81	20.50
400.0	129.6	136.2	119.4	128.4	8.48	6.60
ข.ความสูงพีค(มม.)						
20.0	*	*	*	-	-	-
50.0	86.67	103.8	95.09	95.18	8.56	8.99
100.0	104.8	137.1	123.8	121.9	16.27	13.55
200.0	103.4	112.6	97.70	104.6	7.54	7.20
400.0	118.5	124.4	118.5	117.2	8.05	6.87

หมายเหตุ เครื่องหมาย * หมายถึง ตรวจไม่พบสาร

ผลการศึกษาค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาที่แยกจากพลาสมาเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานไกลเบนคลาไมด์ในเมทานอล เมื่อใช้แอซีโตร-ไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน พบว่าค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาในแต่ละความเข้มข้นแตกต่างกันมาก พิจารณาจากค่า % CV ที่มีค่ามาก และ % CV ระหว่างความเข้มข้นมีความแปรปรวนสูง โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำการศึกษา คือ 20 นนก/มล ตรวจไม่พบสาร การใช้แอซีโตรไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน จึงไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสมาซึ่งมีช่วงความเข้มข้นของยาในพลาสมาอยู่ระหว่าง 20-240 นนก/มล

จากผลของการใช้วิธีการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสมายิ่งย้ำให้เห็นว่า ระดับความเข้มข้นของยาในพลาสมาเป็นข้อจำกัดข้อหนึ่งสำหรับวิธีการแยกพลาสมาโปรตีน เพราะในความเข้มข้นที่ต่ำมาก ไม่สามารถตรวจพบสารได้ ความเข้มข้นที่ตรวจพบสารก็ให้ผลที่มีความแปรปรวนสูง เนื่องจากการตั้งเอทเทนนูเอชั่นของเครื่องอินทริเกรเตอร์ต้องใช้ระดับต่ำสุด ซึ่งสัญญาณรบกวนปกติของการวิเคราะห์ (noise and drift) ที่เกิดจากการผันแปรของการไหลของโมบายเฟสและอุณหภูมิ มีผลทำให้ความเที่ยงตรงในการวิเคราะห์ลดลง (Szepesi, 1990)

การลดปริมาตรสารแยกพลาสมาโปรตีน เพื่อให้ความเข้มข้นของยาในสารละลายส่วนใสเพิ่มขึ้น การตรวจวิเคราะห์สารมีความไวดีขึ้น แต่วิธีนี้เสี่ยงต่อการทำให้คอลัมน์เสีย เนื่องจากการแยกพลาสมาโปรตีนจะไม่สมบูรณ์ (Freeman, 1979)

ในรายงานของ Bruke และ Thenot (1985) มีผู้แนะนำให้ฉีดใส่สารละลายส่วนใสเข้า HPLC ในปริมาตรที่มากขึ้น คือ 0.1-1.0 มล. แต่มีข้อเสียคืออาจทำให้ประสิทธิภาพในการแยกสารเปลี่ยนไปอย่างมีนัยสำคัญ

เนื่องจากการรบกวนโมบายเฟสจากปริมาตรที่ฉีดเข้า HPLC และการฉีดสารละลายในปริมาตรที่มากขึ้น ปริมาตรของ endogenous substance ที่ฉีดเข้าไปก็มีมากเพิ่มขึ้นเช่นกัน พีคของ endogenous substance จะมีขนาดใหญ่ขึ้นตามไปด้วย ซึ่งอาจมีผลรบกวนพีคของยาที่ทำการวิเคราะห์ได้ และข้อสำคัญทำให้คอลัมน์เสียเร็ว

การเตรียมสารฉีดเข้า HPLC และดีเทกเตอร์ที่ใช้ตรวจหาสารมีผลต่อความสามารถในการวิเคราะห์สารด้วย HPLC ถ้าตัวอย่างสารมีความเข้มข้นมากจะวิเคราะห์หาปริมาณได้ดี แต่ถ้าตัวอย่างสารมีความเข้มข้นต่ำ หรือถ้าการเตรียมสารก่อนฉีดที่ทำให้ความเข้มข้นของสารลดลง ดังเช่นการใช้วิธีการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ยาไนเฟดิพีนและไกลเบนคลาไมด์ในพลาสมา ซึ่งความเข้มข้นของยาในพลาสมามีความเข้มข้นต่ำอยู่แล้ว เมื่อเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนความเข้มข้นของยาจะถูกเจือจาง จึงไม่สามารถวิเคราะห์โดยการตรวจวัดด้วย UV ดีเทกเตอร์ได้ แต่อย่างไรก็ดีต้องคำนึงถึงดีเทกเตอร์ที่ใช้ด้วย ถ้าดีเทกเตอร์ที่ใช้เป็นฟลูออเรสเซนต์ ดีเทกเตอร์ซึ่งมีความไว (sensitivity) สูงกว่าจะมี selectivity ดีกว่า UV ดีเทกเตอร์ ก็สามารถตรวจหาสารได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า UV ดีเทกเตอร์ ดังเช่นการวิเคราะห์ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ซึ่งมีระดับยาในพลาสมาอยู่ในระดับเดียวกับยาไนเฟดิพีนและไกลเบนคลาไมด์ สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยานี้ในพลาสมาได้โดยใช้ฟลูออเรสเซนต์ ดีเทกเตอร์ ทั้งนี้ยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์มีคุณสมบัติเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ได้ด้วยตัวเอง ถ้าใช้ UV ดีเทกเตอร์ก็ไม่สามารถตรวจหาปริมาณยานี้ได้เช่นเดียวกันกับไนเฟดิพีนและไกลเบนคลาไมด์

จากการวิเคราะห์หาปริมาณยาฟีนายโตอิน, โพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ และไนเฟดิพีน แสดงให้เห็นว่า การใช้วิธีการแยกพลาสมาโปรตีน

ออกจากตัวอย่างพลาสมา ตัวยาจะไม่ตกตะกอนร่วมไป (occluse) กับพลาสมาโปรตีน แม้ว่ายาจะมีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างเหนียวแน่นก็ตาม endogenous substance เป็นสิ่งที่ควรคำนึงถึงอีกประการหนึ่งสำหรับวิธีการแยกพลาสมาโปรตีน เพราะทำให้การวิเคราะห์ไม่มีความจำเพาะเจาะจง ต้องปรับโมบายเฟสให้เหมาะสม ที่พีคของยาจะไม่ถูกรบกวนด้วยพีคของ endogenous substance แต่บางกรณีไม่สามารถปรับให้เหมาะสม อาจต้องเพิ่มขั้นตอนการสกัดแยก endogenous substance ออกจากตัวยา เพื่อให้วิธีวิเคราะห์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

ขั้นตอนที่ 4 การสรุปการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนกับการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนแตกต่างกัน

จากการวิเคราะห์หาปริมาณยาต่างๆ ในพลาสมาได้แก่ พาราเซตามอล, มีโทรนิดาโซล ไนโตรฟิวแรนโตอิน ฟีนายโตอิน โพรพราโนลอล และไนเฟดิพีน ในขั้นตอนที่ 3 พบว่ายาเกือบทุกตัว ยกเว้นไนเฟดิพีน สามารถทำการวิเคราะห์โดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนได้ โดยให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาต่าง ๆ กัน ซึ่งจากการทดสอบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาจากการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนแต่ละตัวกับแต่ละตัวยาที่ทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ได้ผลดังนี้

ก. เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาด้วย Two-way Analysis of Variance

ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาต่าง ๆ เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล หรือ

แอซีโตรไนไตรล์ ด้วย Two-way Analysis of Variance แสดงดังตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนในตารางที่ 79

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

1. ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาทุกตัวที่ทำการศึกษามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อยาที่วิเคราะห์มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนแตกต่างกัน ไม่ว่าจะใช้ค่าพื้นที่พีคหรือความสูงพีคในการคำนวณ โดยมีค่า F = 47.320 และ 54.952 ตามลำดับ และค่าของ P = 0.000 และ 0.000 ตามลำดับ

2. ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาทุกตัวที่ทำการศึกกษามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนที่แตกต่างกัน ไม่ว่าจะใช้ค่าพื้นที่พีคหรือค่าความสูงพีคในการคำนวณ โดยมีค่า F = 75.346 และ 71.230 ตามลำดับ และค่าของ P = 0.000 และ 0.000 ตามลำดับ

3. มีผลกระทบร่วมระหว่างตัวยาที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนแตกต่างกัน กับการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนที่แตกต่างกัน ต่อค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ทั้งค่าพื้นที่พีคและความสูงพีค โดยมีค่า F = 27.931 และ 26.224 ตามลำดับ และค่าของ P = 0.000 และ 0.000 ตามลำดับ จึงพิจารณาค่าเฉลี่ยจากผลของปัจจัยทั้งสอง เมื่อใช้ค่าพื้นที่พีคและความสูงพีค ได้ค่า F = 38.869 และ 49.275 ตามลำดับ และค่าของ P = 0.000 และ 0.000 ตามลำดับ แสดงว่าค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาเฉลี่ย ระหว่างตัวยาที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนแตกต่างกัน และชนิดของสารแยกพลาสมาโปรตีนแต่ละชนิด มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากผลการทดสอบ ทุกปัจจัยมีผลให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 79 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนก 2 ทาง (Two-way ANOVA) ของค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยา กับสารแยกพลาสมาโปรตีน

	พื้นที่พีค					ความสูงพีค				
Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Signif of F	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Signif of F
Main Effects	5575.241	6	929.207	49.807	.000	3552.751	6	592.125	72.325	.000
DRUG	3531.221	4	882.805	47.320	.000	1799.562	4	449.891	54.952	.000
AGENT	2811.303	2	1405.651	75.346	.000	1166.310	2	583.155	71.230	.000
2-way Interactions	3126.509	6	521.085	27.931	.000	1288.167	6	214.695	26.224	.000
DRUG AGENT	3126.509	6	521.085	27.931	.000	1288.167	6	214.695	26.224	.000
Explained	8701.751	12	725.146	38.869	.000	4840.918	12	403.410	49.275	.000
Residual	14309.144	767	18.656			6279.402	767	8.187		
Total	23010.895	779	29.539			11120.320	779	14.275		

Drug = ยาที่ทำการทดสอบ ได้แก่ พาราเซตามอล, มีโทรนิดาโซล, ไนโตรฟิวแรนโตอิน, ฟีนายโตอิน และ โพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์

Agent= สารแยกพลาสมาโปรตีนที่ทำทดสอบได้แก่ เมทานอล, เอทานอล และ แอซีโตรไนไตรล์

ข. เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาด้วย One-Way Analysis of Variance

จากผลการทดสอบด้วย Two-way Analysis of Variance ทุกปัจจัยมีผลต่อค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยา จึงทำการทดสอบความแตกต่างของค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาด้วย One-way Analysis of Variance โดยในการทดสอบจะตัดชุดข้อมูลที่ให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาเกิน 100%

1. ทดสอบความแตกต่างของค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาแต่ละตัวเมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนหนึ่ง ๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนจะคำนวณในทำนองเดียวกันกับตัวอย่างในตารางที่ 80 และได้ผลเรียงตามสารแยกพลาสมาโปรตีนแต่ละตัวดังนี้

ก) เมทานอล

เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การกลับคืนของยา 4 ตัวได้แก่ พาราเซตามอล มีโทรนิดาโซล ไนโตรฟิวแรนโตอิน และ ฟีนายโตอิน เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล สำหรับยาโพรพราโนลอล ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยมากกว่า 100% จะไม่นำมาทดสอบเพราะเป็นค่าที่ไม่ถูกต้อง

ผลการทดสอบ ยาทั้ง 4 ตัว มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค โดยมีค่าของ F = 61.1254 และ 47.5901 ตามลำดับ และค่าของ P = 0.0000 และ 0.0000 ตามลำดับ จึงเปรียบเทียบหุคูณด้วยวิธีของ SCHEFFE พบว่าเมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ยาพาราเซตามอลและไนโตรฟิวแรนโตอิน ที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างหลวม และ

ตารางที่ 80 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนกทางเดียว (One-way ANOVA) ของค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยา พาราเซตามอล,มิโทรนิดาโซล, ไนโตรฟิวแรนโตอิน และ ฟีนายโตอิน เมื่อใช้ เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

พื้นที่ผิว

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	3	1600.9110	533.6370	60.9771	.0000
Within Groups	236	2065.3390	8.7514		
Total	239	3666.2500			

Multiple Range Test

Scheffe Procedure
Ranges for the .050 level -

3.98 3.98 3.98

Group	G G G G r r r r p p p p 4 2 3 1
Grp 4	
Grp 2	
Grp 3	* *
Grp 1	* *

The ranges above are table ranges.
The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..
2.0918 * Range * Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

ค่าความสูงผิว

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	3	1195.4038	398.4679	50.6273	.0000
Within Groups	236	1857.4634	7.8706		
Total	239	3052.8672			

Multiple Range Test

Scheffe Procedure
Ranges for the .050 level -

3.98 3.98 3.98

Group	G G G G r r r r p p p p 4 2 3 1
Grp 4	
Grp 2	*
Grp 3	* *
Grp 1	* *

The ranges above are table ranges.
The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..
1.9838 * Range * Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

(*) Denotes pairs of groups significantly different at the .050 level

ปานกลางตามลำดับ มีค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ทั้งค่าพื้นที่พีคและความสูงพีค โดยมีเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาอยู่ระหว่าง 97.80-99.21% และยามีโทรนิดาโซลและฟีนายโตอิน ที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างหลวมและอย่างเหนียวแน่นตามลำดับ มีค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อใช้พื้นที่พีค โดยเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยา = 94.20 และ 93.41 % ตามลำดับ แต่เมื่อใช้ความสูงพีค ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยา = 95.65 และ 92.71% ตามลำดับ ดังนั้นยาที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างหลวมและปานกลาง จึงมีแนวโน้มที่จะวิเคราะห์หาปริมาณยาด้วยเมทานอล ได้ดีกว่ายาที่จับกับพลาสมาโปรตีนอย่างเหนียวแน่น

ข) เอทานอล

เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การกลับคืนของยา 5 ตัวได้แก่ พาราเซตามอล มีโทรนิดาโซล ไนโตรฟิวแรนโตอิน ฟีนายโตอิน และโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ เมื่อใช้เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ผลการทดสอบยาทั้ง 5 ตัว มีค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค โดยมีค่าของ F = 40.0095 และ 51.7292 ตามลำดับ และค่าของ P = 0.0000 และ 0.0000 ตามลำดับ จึงเปรียบเทียบหุคูณด้วยวิธีของ SCHEFFE พบว่าเมื่อใช้เอทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ยาพาราเซตามอลและไนโตรฟิวแรนโตอิน ซึ่งมีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างหลวม และปานกลาง มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค โดยเปอร์เซนต์การ

กลับคืนเฉลี่ยของยาอยู่ระหว่าง 94.27-96.06% และ มีโทรนิดาโซล และโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ซึ่งมีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างหลวมและอย่างเหนียวแน่น มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 เมื่อใช้พื้นที่พีค โดยเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยา = 98.94 และ 98.68% ตามลำดับ แต่เมื่อใช้ความสูงพีคค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 โดยเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยา= 98.79 และ 91.61% ตามลำดับ สำหรับฟีนายโตอินซึ่งมีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างเหนียวแน่น มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาแตกต่างจากยาตัวอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ทั้งพื้นที่พีคและความสูงพีค โดยเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยา = 87.78 และ 93.81% ตามลำดับ ดังนั้นจึงสรุปได้ไม่แน่นอนว่า ยากลุ่มใดใช้เอทานอลในการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา ได้ดีกว่า

ค) แอซีโตรไนไตรล์

เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การกลับคืนของยา 4 ตัวได้แก่ พาราเซตามอล มีโทรนิดาโซล ไนโตรฟิวแรนโตอิน และ ฟีนายโตอิน สำหรับโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ซึ่งให้เปอร์เซนต์การกลับคืนของยามากกว่า 100% จะไม่นำมาทดสอบเพราะเป็นค่าที่ไม่ถูกต้อง

ผลการทดสอบ ยาทั้ง 4 ตัว มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างหลวม ปานกลางและอย่างเหนียวแน่น มีเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 98.11-99.03% เมื่อคำนวณจากค่าความสูงพีค โดยมีค่าของ F = 1.2354 และค่าของ P = 0.2975

เมื่อใช้พื้นที่พีค ยาทั้ง 4 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยมีค่าของ F = 3.7241 และค่าของ P = 0.0121 เมื่อเปรียบเทียบพหุคูณด้วยวิธีของ SCHEFFE พบว่า มีโทรนิดาโซล และไนโตรฟิวแรนโตอิน ซึ่งมีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างหลวม และปานกลางตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยา = 99.83% และ 97.83% ตามลำดับ, พาราเซตามอล, มีโทรนิดาโซล และฟีนายโตอิน ซึ่งมีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างหลวม, อย่างหลวม และอย่างเหนียวแน่น ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 โดยมีค่าเฉลี่ย 97.83%, 99.98% และ 98.41% ตามลำดับ และพาราเซตามอล, ไนโตรฟิวแรนโตอิน และ ฟีนายโตอิน ซึ่งมีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างหลวม, ปานกลาง และอย่างเหนียวแน่น ตามลำดับมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 แม้ว่าค่าพื้นที่พีคให้ค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน 2 กลุ่มข้อมูล แต่ค่าเฉลี่ยก็อยู่ในระดับเดียวกัน และใกล้เคียง 100% เช่นเดียวกับความสูงพีค ดังนั้นไม่ว่าตัวยามีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนพลาสมาอย่างหลวม, ปานกลางหรืออย่างเหนียวแน่น ก็สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยาด้วยแอซีโตรไนไตรล์ได้

จากผลการทดสอบ ยาที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างหลวมและปานกลาง สามารถใช้เมทานอล หรือเอทานอล หรือแอซีโตร-ไนไตรล์ วิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาได้ ส่วนยาที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างเหนียวแน่น จะใช้แอซีโตรไนไตรล์ ได้ผลที่ดีกว่าเมทานอลและเอทานอล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ทดสอบความแตกต่างของค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาหนึ่ง ๆ เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล เอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนจะคำนวณในทำนองเดียวกับตัวอย่างในตารางที่ 81 ได้ผลเรียงลำดับยาแต่ละตัวดังนี้

ก) พาราเซตามอล

เปรียบเทียบความแตกต่างเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาพาราเซตามอล เมื่อใช้เมทานอล หรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

จากผลการทดสอบ ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาพาราเซตามอลมีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ไม่ว่าจะใช้ค่าพื้นที่พีคหรือค่าความสูงพีคในการคำนวณ โดยมีค่าของ F = 14.7110 และ 11.1589 ตามลำดับ และค่าของ P = 0.0000 และ 0.0000 ตามลำดับ ทำการเปรียบเทียบพหุคูณด้วยวิธีของ SCHEFFE พบว่าเมทานอลและแอซีโตรไนไตรล์ให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีค โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 98.06-99.21% สำหรับเอทานอลให้ค่าแตกต่างจากเมทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ โดยมีค่าเฉลี่ยต่ำกว่า ดังนั้นเมทานอลและแอซีโตรไนไตรล์จึงใช้วิเคราะห์ยาพาราเซตามอลได้ดีกว่าเอทานอล

ข) มีโทรนิดาโซล

เปรียบเทียบความแตกต่างเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยามีโทรนิดาโซล เมื่อใช้เมทานอล หรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

ตารางที่ 81 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนจำแนกทางเดียว(One-way ANOVA) ของค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การกลับคืนของ ยาพาราเซตามอล เมื่อใช้เมทานอล, เอทานอล หรือแอซิโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

พื้นที่พีค

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	721.1652	360.5826	14.7110	.0000
Within Groups	177	4338.4697	24.5111		
Total	179	5059.6348			

Multiple Range Test

	Group	Grp 2	Grp 3	Grp 1
Grp 2			*	*
Grp 3				
Grp 1				

Scheffe Procedure
Ranges for the .050 level -

3.49 3.49

The ranges above are table ranges.
The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..
3.5008 * Range * Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

ความสูงพีค

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	255.8573	127.9287	11.1589	.0000
Within Groups	177	2029.1751	11.4643		
Total	179	2285.0324			

Multiple Range Test

	Group	Grp 2	Grp 1	Grp 3
Grp 2			*	*
Grp 1				
Grp 3				

Scheffe Procedure
Ranges for the .050 level -

3.49 3.49

The ranges above are table ranges.
The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..
2.3942 * Range * Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

(*) Denotes pairs of groups significantly different at the .050 level

จากผลการทดสอบ ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยามีโทรนิดาโซลมีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ไม่ว่าจะใช้ค่าพื้นที่พีคหรือค่าความสูงพีคในการคำนวณ โดยมีค่าของ F = 53.0652 และ 36.0060 ตามลำดับ และค่าของ P = 0.0000 และ 0.0000 ตามลำดับ ทำการเปรียบเทียบพหุคูณด้วยวิธีของ SCHEFFE พบว่าเอทานอลและแอซีโตร-ไนไตรล์ให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีค โดยค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 98.78-99.98% ส่วนเมทานอลให้ค่าเฉลี่ยต่างจากเอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ โดยมีค่าเฉลี่ยต่ำกว่า ดังนั้นเอทานอลและแอซีโตรไนไตรล์ใช้วิเคราะห์ยามีโทรนิดาโซลได้ดีกว่าเมทานอล

ค) ไนโตรฟิวแรนโตอิน

เปรียบเทียบความแตกต่างเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาไนโตรฟิวแรนโตอิน เมื่อใช้เมทานอล หรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

จากผลการทดสอบ ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาไนโตรฟิวแรนโตอินมีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ไม่ว่าจะใช้ค่าพื้นที่พีคหรือค่าความสูงพีคในการคำนวณ โดยมีค่าของ F = 26.0058 และ 9.7098 ตามลำดับ และค่าของ P = 0.0000 และ 0.0001 ตามลำดับ เปรียบเทียบพหุคูณด้วยวิธีของ SCHEFFE พบว่าเมทานอลและแอซีโตรไนไตรล์ให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ไม่ว่าจะใช้พื้นที่พีคหรือความสูงพีค โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 97.80-98.47% ส่วนเอทานอลให้ค่าเฉลี่ยต่างจากเมทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ โดยมีค่าเฉลี่ยต่ำกว่า ดังนั้นเมทานอลและแอซีโตรไนไตรล์ ใช้วิเคราะห์ยาไนโตรฟิวแรนโตอินได้ดีกว่าเอทานอล

ง) ฟีนายโตอิน

เปรียบเทียบสอบความแตกต่างเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาฟีนายโตอิน เมื่อใช้เมทานอล หรือเอทานอล หรือแอซีโตรไนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

จากผลการทดสอบ ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาฟีนายโตอินมีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ไม่ว่าจะใช้ค่าพื้นที่พีคหรือค่าความสูงพีคในการคำนวณ โดยมีค่าของ F = 59.0886 และ 197.4811 ตามลำดับ และค่าของ P = 0.0000 และ 0.0000 ตามลำดับ เปรียบเทียบพหุคูณด้วยวิธีของ SCHEFFE พบว่าทั้ง 3 ตัวให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แอซีโตรไนไตรล์ให้ค่าเฉลี่ยสูงกว่า เมทานอล และเอทานอล ดังนั้นแอซีโตรไนไตรล์ จึงใช้วิเคราะห์ยาฟีนายโตอิน ได้ดีกว่าเมทานอลและเอทานอล

จ) โพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์

ผลการทดสอบความแตกต่างเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ เมื่อใช้เมทานอล หรือแอซีโตร-ไนไตรล์ มีค่าเฉลี่ยมากกว่า 100% เมทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ จึงไม่ควรใช้ในการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงมีเพียงเอทานอลเท่านั้นที่ทำการวิเคราะห์ยานี้ได้ จึงไม่ทดสอบความแตกต่างของค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยา

จากผลการทดสอบเมทานอลใช้ได้ดีสำหรับการวิเคราะห์ยาพาราเซตามอล และไนโตรฟิวแรนโตอิน ซึ่งมีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างหลวมและปานกลาง ตามลำดับ เอทานอลใช้ได้ดีสำหรับการวิเคราะห์ยามิโทรนิดาโซล และโพรพราโนลอล ซึ่งมีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างหลวมและอย่างเหนียวแน่นสำหรับแอซีโตรไนไตรล์ ใช้ได้ดีกับยาเกือบทุกตัว ยกเว้นโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์

ค. การสรุปการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนกับการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนแตกต่างกัน

จากผลการใช้ค่าทางสถิติในข้อ ก และ ข ได้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกัน จึงนำผลมาพิจารณาร่วมกับลักษณะปรากฏและลักษณะโครมาโทแกรม และการ validate วิธีวิเคราะห์จากขั้นตอนที่ 3 สรุปผลการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนกับการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนแตกต่างกันได้ดังนี้

1. แอซีโตรไนไตรล์ แยกพลาสมาโปรตีนให้ลักษณะปรากฏดีที่สุด โครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมาสะอาดที่สุด พีคของยามีความจำเพาะเจาะจงดีมาก และเกือบทุกตัว พีคของยามีความสมมาตรและแคบ ยกเว้นพาราเซตามอล ซึ่งเป็นผลมาจากโมบายเฟสที่ไม่เหมาะสม การ validate วิธีวิเคราะห์ในแต่ละขั้นตอน มีความถูกต้องและเที่ยงตรง

จากผลทางสถิติ แอซีโตรไนไตรล์ใช้ได้ดีกับการวิเคราะห์ยาเกือบทุกตัวยกเว้น โพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ไม่ว่ายาจะมีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนในระดับใด ก็ให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาไม่แตกต่างกัน และมีค่าสูงใกล้เคียง 100% แต่อย่างไรก็ดีจากลักษณะโครมาแกรมของพาราเซตามอล ในสภาวะการทดลองในการศึกษานี้ แอซีโตรไนไตรล์จึงไม่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ยาพาราเซตามอลในพลาสมา

ดังนั้นแอซีโตรไนไตรล์เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ยามีโทรนิดาโซล, ไนโตรฟิวแรนโตอิน และฟีนายโตอิน ซึ่งมีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างหลวม, ปานกลาง และอย่างเหนียวแน่น ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณยาในพลาสมา ด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน แอซีโตรไนไตรล์

2. เมทานอล และเอทานอล แยกพลาสมาโปรตีน ให้ลักษณะปรากฏที่เหมือนกัน โครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมาสะอาด พีคของยามีความจำเพาะเจาะจงดี พีคของยาสมมาตรและแคบ การ validate วิธีวิเคราะห์ในแต่ละขั้นตอน มีความถูกต้องและเที่ยงตรง

จากผลทางสถิติ เมทานอล ใช้ได้ดีกับยาพาราเซตามอล และไนโตรฟิวแรนโตอิน ซึ่งมีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างหลวมและปานกลาง ตามลำดับ จึงอาจใช้ได้ดีสำหรับยา 2 กลุ่มนี้มากกว่ายาที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างเหนียวแน่น ดังเช่นยาฟีนายโตอิน อย่างไรก็ดี ค่าเฉลี่ยที่ได้ก็มีค่ามากกว่า 90% จึงสรุปได้ว่าค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา ด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอล

สำหรับเอทานอลใช้ได้ดีกับยามีโทรนิดาโซล และโพรพราโนลอล ซึ่งมีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนอย่างหลวมและอย่างเหนียวแน่น จึงบอกได้ไม่แน่นอนว่าใช้ได้ดีกับยาที่มีการจับของยากับพลาสมาโปรตีนในระดับใดได้ดีกว่า แต่สรุปได้ว่าค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีน ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโปรตีน เอทานอล

จากการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวได้แก่เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ วิเคราะห์หาปริมาณยาที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนในระดับต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการจับของยากับพลาสมาโปรตีนไม่มีผลต่อความถูกต้องของวิธีการแยกพลาสมาโปรตีน เพราะค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยามิได้ลดลงตามค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนที่เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงได้ว่ายามิได้ตกตะกอนร่วมไปกับพลาสมาโปรตีน ดังนั้นจึงปฏิเสธสมมติฐานที่ตั้งไว้ ดังนี้

"การใช้วิธีการแยกพลาสมาโปรตีนจากตัวอย่างพลาสมาในการวิเคราะห์หาปริมาณยา ไม่ขึ้นกับความสามารถในการจับของยากับพลาสมาโปรตีน"

เปรียบเทียบการใช้ เมทานอล เอทานอล และแอซีโตร-ไนไตรล์ แอซีโตรไนไตรล์ให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนระดับต่าง ๆ ใกล้เคียงกันมาก โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 97-100% ส่วนเมทานอล และเอทานอลให้ค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 93-100% และ 91-99% ตามลำดับ แอซีโตรไนไตรล์จึงให้ค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาดีกว่า เมทานอลและเอทานอล ในขณะที่ %CV มีค่าพอ ๆ กันและเมื่อพิจารณาร่วมกับลักษณะปรากฏ แอซีโตรไนไตรล์ให้ลักษณะตะกอนและสารละลายส่วนใสดีกว่าและมีโครมาโทแกรมของพลาสมาแบลงค์สะอาดกว่า แอซีโตรไนไตรล์จึงเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่ควรเลือกใช้สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาด้วยเทคนิควิธี HPLC ซึ่งนำส่วนใสฉีดโดยตรง รองลงมาคือ เมทานอล และเอทานอล ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย