บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. <u>พลาสมาของคน</u>

ตลอดการศึกษานี้ใช้พลาสมาของคนซึ่งได้รับอนุเคราะห์ จากศูนย์บริจาคโลหิตสภากาชาดไทย เก็บเข้าตู้เย็นในช่องแข็งที่อุณหภูมิประมาณ 0-5°ซ จนกว่าจะถูกนำมาใช้

2. <u>สารเคมี</u> สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ตลอดการศึกษามีดังนี้

2.1 ยาที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้

2.1.1 พาราเซตามอล (Paracetamol, working standard) Lot no. IR 246/33, ร้อยละความบริสุทธิ์ = 100.65 ผลิตจากประเทศจีน

2.1.2 มีโทรนิดาโซล (Metronidazole, working standard) Lot no. IR 142/34, ร้อยละความบริสุทธิ์ = 98.92 ผลิตจากประเทศโปแลนด์

2.1.3 ฟีนายโตอิน โซเดียม (Phenytoin Sodium, working standard) Lot no. IR 735/33, ร้อยละความบริสุทธิ์=99.45 ผลิตจากประเทศเยอรมัน

2.1.4 โพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ (Propranolol Hydrochloride, working standard) Lot no. IR 205/34, ร้อยละความบริสุทธิ์ = 99.68 ผลิตจากประเทศอินเดีย

2.1.5 ไนโตรฟิวแรนโตอิน (Nitrofurantoin, working standard) Lot no. 827385, ร้อยละความบริสุทธิ์ = 99.24 ผลิตจากประเทศจีน

2.1.6 ไนเฟดิพีน (Nifedipine for Pellets, USP XXI, Primary standard) Lot no. 8812 H010, Siegfriend (AG-4800 Zofinger)

2.1.7 ไกลเบนคลาไมด์ (Glibenclamide, working, standard) Lot no. IR-156/33, ร้อยละความบริสุทธิ์ = 99.43 ผลิตจากประเทศจีน

2.2 สารเคมีอื่น ๆ

2.2.1 เมทานอล เกรด HPLC (Methanol, HPLC; J.T. Baker, Phillpsburg, USA)

2.2.2 แอซีโตรไนไตรล์ เกรด HPLC (Acetonitrile, HPLC; J.T. Baker, Phillpsburg, USA)

2.2.3 เอทานอล เกรด AR (Ethanol,AR;E.Merck, Darmstadt, Germany)

2.2.4 อะซีโตน เกรด AR (Acetone, AR; E.Merck, Darmstadt, Germany)

2.2.6 คลอโรฟอร์ม เกรด AR (Chloroform, AR; E.Merck, Darmstadt, Germany)

2.2.7 กรดไฮโดรคลอริก เกรด AR (Hydrochloric acid, HCl, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.2.8 กรดอะซิติกล้วน เกรด AR (Glacial acetic acid AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.2.9 กรดไตรคลอโรอะซิติก เกรด AR (Trichloroacetic acid, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.2.10 กรดเปอร์คลอริก เกรด AR (Perchloric acid, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.2.11 กรดซัลฟูริก เกรด AR (Sulfuric acid, H_2SO_4, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.2.12 กรดฟอสฟอริก เกรด AR (Phosphoric acid, H_3SO_4, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.2.13 โซเดียมไฮดรอกไซด์ เกรด AR (Sodium hydroxide, NaOH, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.2.14 แอมโมเนียมอะซิเตท เกรด AR (Ammonium acetate, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.2.15 โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เกรด AR (Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4, AR; May & Baker, Dagenham, England)

2.2.16 โซเดียมทั้งสเตท เกรด AR(Sodium tungstate, Na_2WO_4, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.2.17 ซิงค์ซัลเฟต เกรด AR (Zinc sulfate,$ZnSO_4$, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.2.18 คอปเปอร์ซัลเฟต เกรด AR(Copper sulfate, $CuSO_4$, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

3. <u>เครื่องมือ</u> เครื่องมือทั้งหมดที่ใช้ตลอดการศึกษามีดังนี้

3.1 เครื่องชั่งสำหรับการวิเคราะห์ (Precisa(R) 300 A, No. 194769, Switzerland)

3.2 เครื่องชั่งสำหรับการวิเคราะห์ (Mettler® B5H26, Zuerich, Switzerland)

3.3 เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Buchi melting point apparatus, Nach Dr. Tottoli, Buchi, Switzerland)

3.4 เครื่องวัด pH (Consort® Microcomputer,P307, Ser. no 017595)

3.5 อัลตราไวโอเลตสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Ultraviolet Spectrophotometer; Shimudzu, model UV-180 double beam, Shimadzu, Japan)

3.6 ไฮเปอร์ฟอร์แมนลิควิดโครมาโทรกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

3.6.1 HPLC (Millipore Water Chromatography Division, Milford, Massachusetts, USA) ที่ใช้กับ UV ดีเทกเตอร์ ประกอบด้วย

3.6.1.1 Model 680 automated gradient controller

3.6.1.2 Model 6000A solvent delivery system

3.6.1.3 Model 510 solvent delivery system

3.6.1.4 Water 740 data module

3.6.1.5 Water 484 tunable absorbance detector

3.6.2 HPLC (LKB, Bromma, Sweden) ที่ใช้กับฟลูออเรสเซนต์ ดีเทกเตอร์ ประกอบด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6.2.1 LC controller LKB 2152-020

3.6.2.2 Solvent condition LKB 2156

3.6.2.3 HPLC pump LKB 2150

3.6.2.4 HPLC column oven with injector LKB 2155

3.6.2.5 ฟลูออเรสเซนต์ ดีเทคเตอร์ (Fluorescence Detector, FP-210, Spectroflurometric Detector, Jasco, ser.no.20349, Tokyo, Japan)

3.6.2.6 อินทริเกรเตอร์ (Integrator; SP 4290 integrator, Spectra-Physics California, USA)

3.7 อินเจคเตอร์ (Injector,Rheodyne 7125 injection port, Rheodyne California, USA)

3.8 โครมาโทกราฟิกคอลัมน์ (Chromatographic column) แบบเหล็กกล้าไร้สนิม ขนาดความยาว 30 ซ.ม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3.9 มม. บรรจุด้วย μ-Bondapak C_{18} ขนาดอนุภาค 10 ไมครอน ที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นของ Phenomenex(R) (California, USA) และ Water(R) Associates (Massachusetts, USA)

3.9 การ์ดคอลัมน์ (Guard-column) เป็นคอลัมน์แบบเหล็กกล้าไร้สนิม ขนาดความยาว 5 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.0 มม. บรรจุด้วย Bondapak(R) C_{18} / coracil (Water Associates, Massachusetts, USA) ขนาดอนุภาค 37-50 ไมครอน

3.10 เครื่องผสมวอร์เทกซ์ (Vortex mixer;Vortex-Genie, Scienfic Industries. Inc, New York, USA.)

3.11 เครื่องหมุนเหวี่ยงเซนตริฟิวก์ (Gallenkamp Senior Centrifuge, Gallenkamp, England)

3.12 ไมโครปิเปต (Micropipet; Pipetman(R),Gilson, U.K.) ขนาด 20 และ 1000 ไมโครลิตร

ขั้นตอนและวิธีการ

วิธีการศึกษา แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 คัดเลือกสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณในพลาสมาโดยใช้เทคนิควิธี HPLC

ขั้นตอนที่ 2 สร้างสภาวะการทดลองทาง HPLC ที่เหมาะสมสำหรับแต่ละตัวยาที่ศึกษา

ขั้นตอนที่ 3 การใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนต่างๆ ที่คัดเลือก เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณยาแต่ละตัวที่ศึกษาในพลาสมา โดยใช้สภาวะทาง HPLC ที่สร้างขึ้นในขั้นตอนที่ 2

ขั้นตอนที่ 4 การสรุปการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนกับการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนแตกต่างกัน

ขั้นตอนที่ 1 คัดเลือกสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโดยใช้เทคนิควิธี HPLC

โดยทำการทดลองเติมสารต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติแยกพลาสมาโปรตีนลงในแบลงค์พลาสมาเพื่อศึกษาลักษณะการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากพลาสมา

018926

1.1 สารแยกพลาสมาโปรตีนต่าง ๆ ที่นำมาคัดเลือกเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแต่ละตัวยาในพลาสมาโดยใช้เทคนิควิธี HPLC มีดังนี้

ก. สารละลายกรด ได้แก่ สารละลายกรดเปอร์คลอริก 6% (w/vในน้ำ), สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 5% (w/v ในน้ำ) และสารผสมของสารละลายโซเดียมทังสเตท 10% (w/v ในน้ำ) กับสารละลายกรดซัลฟูริกในน้ำความเข้มข้น 0.67 นอร์มอล ในอัตราส่วน 1:1

ข. สารละลายของโลหะหนัก ได้แก่ สารผสมของสารละลายซิงค์ซัลเฟต 5% (w/v ในน้ำ) กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในน้ำความเข้มข้น 0.5 นอร์มอลในอัตราส่วน 1:1 และสารผสมของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 5% (w/v ในน้ำ) กับสารละลายโซเดียมทังสเตท 6% (w/v ในน้ำ) ในอัตราส่วน 1:1

ค. ตัวทำละลายอินทรีย์ ที่รวมตัวกับน้ำได้ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล อะซีโตน และแอซีโตรไนไตรล์

1.2 วิธีการทดลอง

ผสมตัวอย่างพลาสมา 0.5 มิลลิลิตร กับสารแยกพลาสมาโปรตีนในข้อ 1.1 จำนวน 2.0 มิลลิลิตรในหลอดเซนตริฟิวก์ วอร์เทกซ์นาน 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำมาเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวก์ที่ 3,000 รอบ/นาที นาน 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

1.3 เกณฑ์ในการคัดเลือกสารแยกพลาสมาโปรตีน

ก. การแยกพลาสมาโปรตีน สารแยกพลาสมาโปรตีนที่ดี เมื่อเติมลงไปตัวอย่างพลาสมา พลาสมาโปรตีนจะแยกจากส่วนอื่น ๆ ของพลาสมาอย่างรวดเร็ว (Hill and Van Slyke, 1922)

ในการศึกษาครั้งนี้ จะสังเกตการแยกตัวอย่างพลาสมาโปรตีน เมื่อเติมสารในข้อ 1.1 ลงในตัวอย่างพลาสมาแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที พลาสมาโปรตีนในรูปตะกอนตกลงสู่ก้นหลอดในเวลาที่ต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสารแยกพลาสมาโปรตีน

การศึกษานี้จะคัดเลือกสารแยกพลาสมาโปรตีน โดยสังเกตความเร็วของการแยกซึ่งจะเรียงลำดับความเร็วในการแยกพลาสมาโปรตีนจากสารที่แยกพลาสมาโปรตีนได้ช้าไปยังสารที่แยกพลาสมาโปรตีนได้รวดเร็ว

ข. ลักษณะตะกอนพลาสมาโปรตีน สารแยกพลาสมาโปรตีนที่ดีควรแยกพลาสมาโปรตีนให้อยู่ในรูปตะกอนที่อัดแน่นเป็นก้อน ซึ่งแสดงถึงการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากส่วนอื่น ๆ ของพลาสมาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (Hill and Van Slyke, 1922)

ในการศึกษาครั้งนี้จะดูลักษณะตะกอนหลังจากเซนตริฟิวก์ตัวอย่างพลาสมาที่เติมสารแยกพลาสมาโปรตีน การเรียงลำดับการให้ลักษณะตะกอนแบบต่าง ๆ ของสารแยกพลาสมาโปรตีน จะเรียงลำดับจากตะกอนเป็นก้อนเบา (floccule) ไปยังตะกอนที่อัดกันแน่นเป็นก้อนขนาดใหญ่ (solid mass)

ค. ลักษณะสารละลายส่วนใส เมื่อพลาสมาโปรตีนแยกออกจากตัวอย่างพลาสมา จะได้สารละลายส่วนใสนำไปวิเคราะห์หาปริมาณได้ต่อไป สารแยกพลาสมาโปรตีนที่ดีควรให้สารละลายส่วนใสที่ใสสะอาดและมีปริมาตรมาก ความใสสะอาดแสดงได้ว่าพลาสมาโปรตีนแยกออกจากส่วนอื่นๆ ของพลาสมาอย่างชัดเจน (Henry, 1984) และปริมาตรสารละลายส่วนใสที่มาก แสดงถึงการจับตัวกันแน่นของตะกอนพลาสมาโปรตีน (Hill and Van Slyke, 1922) นอกจากนี้สำหรับวิธีทาง HPLC Lim (1988) กล่าวถึงการนำสารละลายส่วนใสฉีดเข้า HPLC โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนอื่นๆ ที่ต้องเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมอีกครั้งก่อนฉีดเข้า HPLC เช่น การกรอง การสกัด หรือการปรับความเป็นกรด-

ด่างของสารละลายส่วนใส สำหรับคอลัมน์ธรรมดาที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน คือ octadecyl (C_{18}) การฉีดสารละลายส่วนใสเข้า HPLC สารละลายส่วนใสจะต้องมีความใสสะอาด, pH ของสารละลายส่วนใสอยู่ในช่วงที่เหมาะสมที่ไม่ทำให้โครมาโทกราฟิกคอลัมน์เกิดความเสียหาย อายุการใช้งานสั้นลง Szepesi (1990) รายงานช่วง pH ที่เหมาะสมสำหรับคอลัมน์ธรรมดานี้ควรอยู่ในช่วง pH 3-8 และปริมาตรส่วนใสที่มากทำให้ทำการวิเคราะห์ได้มากครั้ง ทำให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องแน่นอนยิ่งขึ้น

ในการศึกษาครั้งนี้ จะดูลักษณะสารละลายส่วนใสหลังจากเซนติฟิวก์ตัวอย่างพลาสมาที่เติมสารแยกพลาสมาโปรตีน โดย

- ความใสสะอาด สังเกตด้วยตา การเรียงลำดับความใสสะอาดจะเรียงจากขุ่นเล็กน้อยไปยังสะอาดมาก

- ปริมาตรส่วนใส วัดปริมาตรด้วยไปเปตที่มีขีดบอกปริมาตรอย่างละเอียด (measuring pipet) โดยใช้ Griffin(R) pipette filler ช่วยในการไปเปต การเรียงลำดับปริมาตรส่วนใสจะเรียงจากปริมาตรส่วนใสน้อยไปมาก

- pH ส่วนใส วัดด้วย pH paper ที่ใช้ทดสอบการเปลี่ยนแปลง pH ทีละ 1 หน่วย จาก pH 1 ถึง pH 14 ทั้งนี้เนื่องจากในห้องทดลองไม่มีอิเลคโทรดขนาดเล็ก ๆ ที่สามารถวัด pH ของสารละลายที่มีปริมาตรน้อย ๆ ได้ การรายงานผลจะรายงานเป็นค่า pH ของสารละลายส่วนใสที่วัดได้ เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนแต่ละตัว

1.4 อัตราส่วนปริมาตรของพลาสมาต่อปริมาตรของสารแยกพลาสมาโปรตีน

จากการศึกษาของ Blanchard (1981) อัตราส่วนปริมาตรของสารแยกพลาสมาโปรตีนต่อปริมาตรของพลาสมา 1 มิลลิลิตร ที่ทำให้การแยก

พลาสมาโปรตีนเกิดได้มากกว่า 95% จะขึ้นอยู่กับชนิดของสารแยกพลาสมาโปรตีนชนิดนั้นๆ แต่มีรายงาน (Freeman, 1979; Chu, 1980) กล่าวว่าการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนในปริมาณที่น้อย เช่นในอัตราส่วน 1 : 1 หรือ 2 : 1 ลักษณะของตะกอนที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็นตะกอนเล็กมาก (micro-precipitates) สารละลายส่วนใสไม่ใสสะอาดแม้จะเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวก์ก็ตาม สารละลายนี้เมื่อฉีดเข้า HPLC ทำให้โครมาโทกราฟิกคอลัมน์อุดตันอายุการใช้งานจิงต่ำและอินเจคเตอร์วาล์ว (injector values) เสีย Henry (1964) Nation (1978) และ Rouan (1985) แนะนำว่าเพื่อให้การแยกพลาสมาโปรตีนเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ที่สุด ควรใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนในปริมาณมากเกินพอ จากการศึกษาของ Blanchard (1981) อัตราส่วนปริมาตรสารแยกพลาสมาโปรตีนต่อปริมาตรพลาสมา 1 มิลลิลิตร ที่ทำให้การแยกพลาสมาโปรตีนเกิดได้อย่างสมบูรณ์ที่สุดในสารแยกพลาสมาโปรตีนทุกตัวคือ อัตราส่วน 4:1 ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้อัตราส่วน 4:1 ในการทดลองเปรียบเทียบลักษณะการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมา เมื่อเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนชนิดต่าง ๆ ลงในตัวอย่างพลาสมา

ขั้นตอนที่ 2 สร้างสภาวะการทดลองทาง HPLC ที่เหมาะสมสำหรับแต่ละตัวยาที่ศึกษา

ตัวยาต่าง ๆ ที่ทำการศึกษา ได้แก่ พาราเซตามอล มีโทรนิดาโซล ไนโตรฟิวแรนโตอิน ฟินายโตอิน โพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ ไนเฟดิพีน และไกลเบนคลาไมด์ (ซึ่งทำการศึกษาเพิ่มเติม) ที่ผ่านการตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ และการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย UV สเปตรัมและ IR สเปกตรัมแล้ว จะนำมาสร้างสภาวะการทดลองทาง HPLC โดย อาศัยข้อมูลรายงานการวิเคราะห์ทาง HPLC ของยานั้น ๆ ก่อน ถ้าไม่มีหรือไม่เหมาะสมจึงจะทำการศึกษาพัฒนาขึ้นเอง

ในการศึกษาครั้งนี้เทคนิควิธี HPLC ที่ใช้สำหรับยาแต่ละตัวจะเริ่มใช้จาก isocratic reversed-phase HPLC ก่อน เพื่อความสะดวกและความคล่องตัวสำหรับการทดลอง

โครมาโทกราฟิกคอลัมน์

โดยทั่วไปคอลัมน์ที่นิยมใช้สำหรับ reversed-phase HPLC คือ octadecylsilane หรือ ODS (C_{18}) เพราะใช้ได้ดีสำหรับการวิเคราะห์ยาหลาย ๆ ชนิด ดังนั้นในการศึกษานี้จะใช้ C_{18}-คอลัมน์ขนาดความยาว 30 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3.9 มม. ชนิดของคอลัมน์ที่ใช้คือคอลัมน์แบบเหล็กกล้าไร้สนิม ภายในบรรจุ μ-Bondapak$^{(R)}$-C_{18} ขนาดอนุภาค 10 ไมครอน ของ Phenomenex$^{(R)}$ และ Water$^{(R)}$

การ์ดคอลัมน์

สำหรับการ์ดคอลัมน์ (guard column) เป็นคอลัมน์ขนาดความยาว 5 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.0 มม. ชนิดของคอลัมน์ที่ใช้คือคอลัมน์แบบเหล็กกล้าไร้สนิม ภายในบรรจุ μ-Bondapak$^{(R)}$ C_{18}/Coracil ขนาดอนุภาค 37-50 ไมครอน

ส่วนประกอบของโมบายเฟส

ส่วนประกอบของโมบายเฟสสำหรับยาแต่ละตัว ถ้ามีข้อมูลจากรายงานจะนำมาดัดแปลงจนเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ยานั้น ๆ ในพลาสมา ถ้าไม่มีจึงจะทำการศึกษาพัฒนาขึ้นเอง

ดีเทกเตอร์

ดีเทกเตอร์ที่ใช้สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ใช้ UV ดีเทกเตอร์ ถ้ายาที่ทำการศึกษามีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลต ถ้าไม่เหมาะสม

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จึงจะพิจารณาดีเทกเตอร์อื่น ๆ เช่นฟลูออเรสเซนต์ ดีเทกเตอร์

วิธีทดลอง

- ศึกษาหาสภาวะการทดลองทาง HPLC ของยาต่าง ๆ ในเมทานอล ให้ได้รูปพีค (peak) ยาที่ดี มีความสมมาตร และมีค่า retention time ที่เหมาะสม

- ศึกษาหาสภาวะการทดลอง HPLC ที่เหมาะสมสำหรับยาแต่ละตัว โดยการเติมตัวยาลงในพลาสมาและใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนที่คัดเลือกไว้แล้วจากขั้นตอนที่ 1 ได้แก่ เมทานอลหรือเอทานอลหรือแอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง สภาวะการทดลองที่เหมาะสมพิจารณาจาก

  - ลักษณะโครมาโทแกรมของยาที่ได้ ไม่มีการรบกวนจาก endogenous substance ที่มีอยู่ในพลาสมา
  - รูปพีคยามีความสมมาตร และแคบ
  - มีค่า retention time ที่เหมาะสม

ในการศึกษานี้สภาวะทาง HPLC จะถูกปรับให้เป็นสภาวะการทดลองที่ใช้ได้กับสารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัวโดยปรับให้เหมาะสมที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้และจะใช้สภาวะการทดลองเดียวกันนี้กับสารแยกพลาสมาโปรตีนแต่ละชนิด เพื่อสามารถนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกันได้

ขั้นตอนที่ 3 การใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนต่างๆ ที่คัดเลือก เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณยาแต่ละตัวที่ศึกษาในพลาสมา โดยใช้สภาวะทาง HPLC ที่สร้างขึ้นในขั้นตอนที่ 2

จากสารแยกพลาสมาโปรตีนที่คัดเลือกแล้วในขั้นตอนที่ 1 ได้แก่เมทานอล เอทานอล และแอซีโตรไนไตรล์ นำมาใช้วิเคราะห์หาปริมาณยาแต่ละตัวที่เติม

ลงในพลาสมา ได้แก่ พาราเซตามอล มีโทรนิดาโซล ฟินายโตอิน ไนโตร-ฟิวแรนโตอิน โพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ ไนเฟดิพีน และไกลเบนคลาไมด์ (ซึ่งทำการศึกษาเพิ่มเติม) โดยใช้พลาสมา 0.5 มล. ต่อสารแยกพลาสมาโปรตีน 2.0 มล. และเพื่อให้ผลการทดลองที่ได้จากการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัว ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาแต่ละตัวในพลาสมาสามารถเปรียบเทียบกันได้ จึงทำการวิเคราะห์โดยใช้วิธีวิเคราะห์เดียวกันดังนี้

ผสมพลาสมา 0.5 มล. กับสารละลายความเข้มข้นต่างๆ* ในเมทานอล จำนวน 20 มคล. ในหลอดเซนตริฟิวก์

↓

เติมสารแยกพลาสมาโปรตีน (เมทานอล หรือเอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์) จำนวน 2.0 มล. , วอร์เทกซ์นาน 30 วินาที

↓

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

↓

เหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 3000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

↓

สารละลายส่วนใสส่วนบนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงนำมาฉีดเข้า HPLC จำนวน 20 มคล.

* ความเข้มข้นของแต่ละตัวยาที่เตรียม คลอบคลุมช่วงความเข้มข้นของยาที่จะตรวจพบในพลาสมาจากร่างกาย เมื่อรับประทานยานั้นๆในขนาดปกติที่ใช้กันโดยเตรียมทั้งหมด 5 ความเข้มข้นต่อหนึ่งตัวยา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทำการวิเคราะห์ปริมาณยาแต่ละตัวในพลาสมา โดยบันทึกลักษณะปรากฏ ลักษณะโครมาโทแกรม และทำการ validate วิธีวิเคราะห์ เมื่อใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนแต่ละตัว

ก. <u>ลักษณะปรากฏ</u> หลังการเติมสารแยกพลาสมาโปรตีน ในแต่ละขั้นตอนของการวิเคราะห์ ได้แก่

- ลักษณะตะกอนพลาสมาโปรตีน
- ลักษณะสารละลายส่วนใส: ความใสสะอาด, ปริมาตรและpH

ข. <u>ลักษณะโครมาโทแกรม</u> ลักษณะโครมาโทแกรมที่ดี พีคของยาจะมีความสมมาตรและแคบ นอกจากนี้ต้องมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) พีคของยาไม่ถูกรบกวนจากพีคของ endogenous substance หรือพีคของสารอื่น ๆ ที่จะมีผลต่อการวิเคราะห์

ค. <u>การ Validate วิธีวิเคราะห์</u>

การ validate วิธีการวิเคราะห์สำหรับแต่ละตัวยา จะเรียงลำดับตามหัวข้อต่าง ๆ ดังนี้

1. Linearity
2. การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ Lower Limit of Detection
3. ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ Specificity
4. ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ Accuracy ได้แก่
   ก) Physical Recovery
   ข) Analytical Recovery
5. ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ Precision ได้แก่
   ก) Within-run Precision
   ข) Between-run Precision

โดยทั่วไปถ้าพีคของยามีความสมมาตรและแคบ สามารถที่จะใช้ได้ทั้งค่าพื้นที่พีคหรือค่าความสูงพีค ถ้าพีคของยาไม่สมมาตรหรือกว้าง การใช้ค่าพื้นที่พีคจะให้ค่าที่ถูกต้องมากกว่าค่าความสูงพีค (Snyder and Kirkland, 1979) แต่ในทางปฏิบัติทั่วไป จะใช้ internal standard เพื่อควบคุมความแปรปรวนต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นในแต่ละขั้นตอนของการวิเคราะห์ การเลือกใช้ค่าพื้นที่พีคหรือความสูงพีคต้องพิจารณา internal standard เพราะต้องนำค่าอัตราส่วนพื้นที่พีค (Peak Area Ratio) หรืออัตราส่วนความสูงพีค (Peak Height Ratio) ระหว่างพีคของยากับพีคของ internal standard มาทำการคัดเลือก

ในการศึกษาครั้งนี้ ต้องการดูผลของสารแยกพลาสมาโปรตีนต่อตัวยาเพียงอย่างเดียว จึงใช้วิธี External standard ถ้าลักษณะโครมาโทแกรมมีความสมมาตรและแคบ จะ Validate ทั้งค่าพื้นที่พีคและค่าความสูงพีค

1. Linearity

ทำการทดลองเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่พีคของตัวยาหรือความสูงพีคของยากับความเข้มข้นของยาในพลาสมาโดยเตรียมชุดของสารละลายมาตรฐานของยาแต่ละตัวขึ้นเพื่อใช้ในการสร้างแคลิเบรชั่น เคิร์ฟ (calibration curve) โดยจะเตรียมทั้ง 5 ความเข้มข้น ซึ่งคลอบคลุมช่วงความเข้มข้นของยาแต่ละตัวที่จะตรวจพบในร่างกาย ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ ผลที่ได้นำมาเขียนกราฟระหว่างพื้นที่พีคของยากับความเข้มข้นของยาในพลาสมา และกราฟระหว่างความสูงของพีคของยากับความเข้มข้นของยา

การเตรียมสารละลายมาตรฐานของยาเพื่อใช้ในการสร้างแคลิเบรชั่น เคิร์ฟ

พาราเซตามอล :-

ชั่งยาพาราเซตามอลจำนวน 50 มก. อย่างแม่นยำละลายในเมทานอลและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. ในฟลาสค์ปรับปริมาตร ได้สารละลายสต๊อคของยาพาราเซตามอลในเมทานอล ความเข้มข้น 0.50 มก/มล.

เตรียมชุดของสารละลายมาตรฐานจากสารละลายสต๊อกโดยเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 0.025, 0.0625, 0.125, 0.250 และ 0.500 มก/มล ตามลำดับ เมื่อเติมสารละลายเหล่านี้จำนวน 20 มคล. ลงพลาสมา 0.50 มล. จะได้ความเข้มข้นของยาในพลาสมา 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 แล 20.0 มคก/มล. ตามลำดับ

มีโทรนิดาโซล :-

ชั่งยามีโทรนิดาโซลจำนวน 125 มก. อย่างแม่นยำละลายในเมทานอลและปรับปริมาตรให้ครบ 50 มล. ในฟลาสค์ปรับปริมาตร ได้สารละลายสต๊อคของยามีโทรนิดาโซลในเมทานอล ความเข้มข้น 2.5 มก/มล

เตรียมชุดของสารละลายมาตรฐานจากสารละลายสต๊อกโดยเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 0.0125, 0.025 , 0.125 , 0.250 และ 0.750 มก/มล ตามลำดับ เมื่อเติมสารละลายเหล่านี้จำนวน 20 มคล. ลงในพลาสมา 0.50 มล. จะได้ความเข้มข้นของยาในพลาสมา 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 แล 30.0 มคก/มล. ตามลำดับ

ไนโตรฟิวแรนโตอิน :-

ชั่งยาไนโตรฟิวแรนโตอินจำนวน 50 มก. อย่างแม่นยำ ละลายในเมทานอล และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล.ในฟลาสค์ปรับปริมาตร ได้สารละลายสต๊อคของยาไนโตรฟิวแรนโตอินในเมทานอล ความเข้มข้น 0.50 มก/มล

เตรียมชุดของสารละลายมาตรฐานจากสารละลายสต๊อก โดยเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 0.0125, 0.025, 0.125, 0.250 และ 0.500 มก/มล ตามลำดับ เมื่อเติมสารละลายเหล่านี้จำนวน 20 มคล. ลงในพลาสมา 0.50 มล. จะได้ความเข้มข้นของยาในพลาสมา 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 แล 20.0 มคก/มล. ตามลำดับ

ฟีนายโตอิน :-

ยาที่ได้รับอยู่ในรูปเกลือโซเดียม ซึ่งไม่สามารถใช้ทำการศึกษาได้ เนื่องจากให้ลักษณะ baseline ของโครมาโทแกรม drip สูงขึ้นเรื่อย ๆ แม้เวลาผ่านไปนาน 3 ชั่วโมง ก็ไม่คงที่ จึงทำการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปฟีนายโตอินเบส โดยใช้วิธีจาก USP XXI

ชั่งยาฟีนายโตอินจำนวน 125 มก. อย่างแม่นยำละลายในเมทานอล และปรับปริมาตรให้ครบ 50 มล. ในฟลาสค์ปรับปริมาตร ได้สารละลายสต๊อคของยาฟีนายโตอินในเมทานอล ความเข้มข้น 2.5 มก/มล

เตรียมชุดของสารละลายมาตรฐานจากสารละลายสต๊อก โดยเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 0.025, 0.050, 0.150, 0.250 และ 0.500 มก/มล ตามลำดับ เมื่อเติมสารละลายเหล่านี้จำนวน 20 มคล. ลงในพลาสมา 0.50 มล. จะได้ความเข้มข้นของยาในพลาสมา 1.0, 2.0, 6.0, 10.0, และ 20.0 มคก/มล. ตามลำดับ

โพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ :-

ชั่งยาโพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ให้มีน้ำหนักสมมูลย์กับโพรพราโนลอล 12.5 มก. อย่างแม่นยำละลายในเมทานอล และปรับปริมาตรให้ครบ 200 มล. ในฟลาสค์ปรับปริมาตร ได้สารละลายสต๊อคของยาโพรพราโนลอลในเมทานอล ความเข้มข้น 0.0625 มก/มล

เตรียมชุดของสารละลายมาตรฐานจากสารละลายสต๊อก โดยเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 0.25, 0.625, 1.25, 2.50 และ 6.25 มคก/มล ตามลำดับ เมื่อเติมสารละลายเหล่านี้จำนวน 20 มคล. ลงในพลาสมา 0.50 มล. จะได้ความเข้มข้นของยาในพลาสมา 10, 25, 50, 100 และ 250 นนก/มล. ตามลำดับ

ไนเฟดิพีน :-

ชั่งยาไนเฟดิพีน 62.5 มก. อย่างแม่นยำละลายในเมทานอล และปรับปริมาตรให้ครบ 25 มล. ในฟลาสค์ปรับปริมาตร ได้สารละลายสต๊อคของยาไนเฟดิพีน ในเมทานอล ความเข้มข้น 2.50 มก/มล

เตรียมชุดของสารละลายมาตรฐานจากสารละลายสต๊อก โดยเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 และ 8.00 มคก/มล ตามลำดับ เมื่อเติมสารละลายเหล่านี้จำนวน 20 มคล. ลงในพลาสมา 0.50 มล. จะได้ความเข้มข้นของยาในพลาสมา 20, 40, 80, 160 และ 240 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

2. การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ที่จะสามารถวิเคราะห์ปริมาณที่น้อยที่สุดของยาในพลาสมา (Lower Limit of Detection)

หลักเกณฑ์ทั่วไปทางโครมาโทกราฟีกล่าวว่าปริมาตรที่น้อยที่สุดของสารที่ถือว่ายังสามารถวิเคราะห์ได้ต้องให้สัญญานของสารอย่างน้อยเป็น 2 เท่าของสัญญานรบกวนปกติของการวิเคราะห์ (Signal to noise ratio, S/N $\geq$ 2:1) (Smith and Stewart, 1981) ซึ่งจะคำนวณโดยใช้อัตราส่วนของครึ่งหนึ่งของความสูงพีคยา (หน่วยเป็น มม.) กับครึ่งหนึ่งของความสูงของสัญญานรบกวน (noise, หน่วยเป็น มม.)

วิธีทดลอง :-

ทำการทดลองตามวิธีวิเคราะห์ โดยเตรียมตัวอย่างยาต่างๆ ในพลาสมาให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ หลายความเข้มข้น แล้ววิเคราะห์หาว่าความเข้มข้นใดให้โครมาโทแกรมที่ให้อัตราส่วนสัญญานของยาต่อสัญญานรบกวนไม่น้อยกว่า 2:1 เมื่อใช้เอนเทนูเอชั่นของเครื่องบันทึกเป็น 2^° ทำการทดลองโดยใช้ความเข้มข้นนั้นใหม่อีก 10 ตัวอย่าง คำนวณหา % ของสัมประสิทธิความแปรปรวน (% CV) ของการทดลอง ค่าความเข้มข้นที่จะเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์ได้ ควรให้ % สัมประสิทธิความแปรปวน ไม่มากกว่า 10%

3. ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

พิจารณาจากลักษณะโครมาโทแกรมของพลาสมาเมื่อไม่มียาอยู่เลย (plasma blank) เปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของพลาสมาเมื่อมียานั้น ๆ เพื่อพิจารณาถึงการรบกวนของ endogenous substance หรือสารอื่นๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา และเปรียบเทียบค่า retention time ของยาเมื่ออยู่ในตัวทำละลายเมทานอล และเมื่ออยู่ในพลาสมา

4. ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

ก) เปอร์เซนต์การกลับคืนของยา Physical Recovery

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณยาต่าง ๆ ที่เติม (spike) ลงไปในพลาสมาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เทียบกับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของยาต่าง ๆ ในเมทานอลที่มีความเข้มข้นเท่ากัน โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานทำเช่นเดียวกันกับหัวข้อ Validation (หน้า25) แต่ใช้น้ำจำนวน 0.5 มล. แทนพลาสมา คำนวณเปอร์เซนต์การกลับคืนของยา ทำซ้ำแต่ละความเข้มข้นจำนวน 12 ตัวอย่าง (n = 12)

การคำนวณเปอร์เซนต์การกลับคืนของยา :- เมื่อปริมาตรตัวอย่างพลาสมาและสารละลายมาตรฐานที่ฉีดเข้า HPLC มีจำนวนเท่ากันจะได้

$$\text{เปอร์เซนต์การกลับคืนของยา} = \frac{(PA1 \text{ หรือ } PH1) \times 100}{PA2 \text{ หรือ } PH2} \quad ...(1)$$

เมื่อ PA1 หรือ PH2 เป็นพื้นที่ของพีคหรือความสูงของพีคของยาที่แยกจากตัวอย่างพลาสมา

PA2 หรือ PH2 เป็นพื้นที่ของพีคหรือความสูงของพีคของยาในสารละลายมาตรฐาน

ข) เปอร์เซนต์การกลับคืนของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Recovery)

ตัวอย่างถูกเตรียมเลียนแบบตัวอย่างพลาสมาจริง ๆ ในความเข้มข้นต่าง ๆ 3 ความเข้มข้นต่อตัวยาแต่ละตัว วิเคราะห์หาความเข้มข้นของยาโดยเทียบจาก แคลิเบรชั่น เคิร์ฟ ซึ่งเตรียมขึ้นโดยใช้วิธีเดียวกับ

การทดลองใน หัวข้อValidation(หน้า25) ทำซ้ำแต่ละความเข้มข้น จำนวน 3 ตัวอย่าง (n = 3)

5. การศึกษาความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ (Precision)

ทำการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณยาต่างๆ ในพลาสมาโดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้ง 3 ตัว โดยเตรียมชุดความเข้มข้นของยาแต่ละตัวในพลาสมาในทำนองเดียวกับการทดลองในหัวข้อValidation(หน้า25) ในการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ใน 1 วัน (within-run precision) ใช้ชุดความเข้มข้นของยาในช่วงดังกล่าว 6 ชุด (n = 6) และทำการวิเคราะห์ปริมาณยาให้เสร็จภายในวันเดียวกัน ส่วนในการศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์ระหว่างวัน (between-run precision) ทำการวิเคราะห์ยาในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวในแต่ละวัน โดยทำการทดลอง จำนวน 3 วัน (n = 3) บันทึกค่าพื้นที่พีคและความสูงของพีคในแต่ละความเข้มข้น ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์พิจารณาจากค่า % สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (% coefficient of variation, % CV) ของค่าพื้นที่พีค และความสูงพีคจากผลการทดลองที่ได้ ซึ่งค่า % CV ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาควรมีค่าไม่มากกว่า 10% (Smith and Stewart, 1981)

สำหรับยาไกลเบนคลาไมด์ ซึ่งทำการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อใช้ตอบคำถามสำหรับยาในเฟดิพีน จะทำการศึกษาลักษณะปรากฏ, ลักษณะโครมาโทแกรม และเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสมา ตามวิธีในหัวข้อ Validation (หน้า 29) โดยชุดความเข้มข้นของยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสมาเตรียมได้ดังนี้

ชั่งยาไกลเบนคลาไมด์จำนวน 62.5 มก. อย่างแม่นยำ ละลายในเมทานอล และปรับปริมาตรให้ครบ 25 มล. ในฟลาสค์ปรับปริมาตร ได้สารละลายสต๊อคของยาไกลเบนคลาไมด์ ในเมทานอล ความเข้มข้น 2.50 มก/มล

เตรียมชุดความเข้มข้นของยาในเมทานอลจากสารละลายสต๊อก โดยเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 0.50, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.0 มคก/มล ตามลำดับ เมื่อเติมสารละลายเหล่านี้จำนวน 20 มคล. ลงในพลาสมา 0.50 มล. จะได้ความเข้มข้นของยาในพลาสมา 20, 50, 100, 200 และ 400 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

สารละลายไกลเบนคลาไมด์ในเมทานอลที่ความเข้มข้นเท่ากัน จะเตรียมโดยวิธีเดียวกัน แต่ใช้น้ำแทนพลาสมา 0.50 มล.

ง. <u>เกณฑ์ในการคัดเลือกสารแยกพลาสมาโปรตีน</u>

เกณฑ์ในการคัดเลือกสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยาแต่ละตัวในพลาสมา มีดังนี้

- ลักษณะปรากฏของสารละลายส่วนใส และตะกอนพลาสมาโปรตีน
- ลักษณะโครมาโทแกรมของพีคยา
- เปอร์เซนต์การกลับคืนของยา

1. ลักษณะปรากฏของสารละลายส่วนใส และตะกอนพลาสมาโปรตีน

สารละลายส่วนใสต้องใสสะอาด มี pH เป็นกลาง และมีปริมาตรมากแยกจากตะกอนพลาสมาโปรตีนอย่างสมบูรณ์ โดยตะกอนพลาสมาโปรตีนต้องจับกันแน่นเป็นก้อนแยกจากตัวอย่างพลาสมาอย่างรวดเร็ว

2. ลักษณะโครมาโทแกรมของพีคยา

พีคของยาต้องมีความสมมาตร, แคบ และมีความจำเพาะเจาะจงดี ไม่ถูกรบกวนด้วย endogenous substance

3. เปอร์เซนต์การกลับคืนของยา

เปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาควรมีค่าไม่ต่ำกว่า 75-80% วิธีวิเคราะห์นั้น ๆ จึงเป็นวิธีที่ยอมรับได้ (Silva, 1985) ในบางรายงานไม่ต่ำกว่า 60% (Smith and Stewart, 1981)

ในการศึกษาครั้งนี้จะกำหนดเปอร์เซนต์การกลับคืนเฉลี่ยของยาไม่ต่ำกว่า 90% เพื่อเลือกสารแยกพลาสมาโปรตีนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนที่ 4 การสรุปการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนกับการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนแตกต่างกัน

จากการวิเคราะห์ยาที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนในระดับต่าง ๆ กันคือ พาราเซตามอล มิโทรนิดาโซล ไนโตรฟิวแรนโตอิน ฟีนายโตอิน โพรพราโนลอล ไฮโดรคลอไรด์ และไนเฟดิพีน ด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน เมทานอลหรือเอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์อย่างใดอย่างหนึ่ง โดยพิจารณาจากลักษณะปรากฏ ลักษณะโครมาโทแกรม และเปอร์เซนต์การกลับคืนของยาเนื่องจากสารแยกพลาสมาโปรตีนที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ยาหนึ่ง ๆ มีมากกว่า 1ชนิด การจะสรุปว่าตัวยาที่มีค่าการจับของยากับพลาสมาโปรตีนต่าง ๆ กันจะวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมา ด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนได้หรือไม่นั้น จะต้องดูผลว่า การใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนหนึ่ง ๆ ในการวิเคราะห์แต่ละตัวยาให้ผลแตกต่างกันหรือไม่ และการวิเคราะห์ยาหนึ่งด้วยเมทานอล หรือ เอทานอล หรือ แอซีโตรไนไตรล์ ให้ผลแตกต่างกันหรือไม่ การศึกษานี้จะใช้ Two-way Analysis of Variance โดยอาศัยค่าเปอร์เซนต์การกลับคืนของยา ในการเปรียบเทียบ ถ้าผลการศึกษามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จะทำการทดสอบทางสถิติต่อ โดยใช้ One-way Analysis of Variance และเปรียบเทียบพหุคูณ (multiple comparison) ด้วยวิธีของ SCHEFFE ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย