

บทที่ 3

ผลการศึกษาและการวิจารณ์ผล

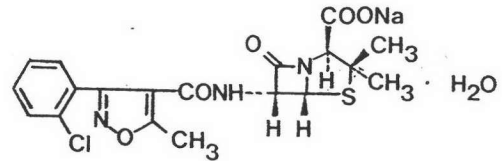
จากการศึกษาตามขั้นตอนต่าง ๆ ได้ผลเรียงตามลำดับดังต่อไปนี้

1. ผลการศึกษาตัวยาที่ถูกคัดเลือกเป็นตัวแทนในการศึกษา

ก. คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของตัวยา

1) คลอกซาซิลิน โซเดียม (Cloxacillin sodium)

สูตรโครงสร้าง :



สูตรเคมี : sodium (6R)-6-[3-(2-chlorophenyl)-
5-methylisoxazole-4-carboxamido]
penicillanate monohydrate

สูตรโมเลกุล : $C_{19}H_{17}ClN_3NaO_5S \cdot H_2O$

น้ำหนักโมเลกุล : 453.88

การละลาย : 1 ส่วนละลายในน้ำ 2.5 ส่วน

1 ส่วนละลายในแอลกอฮอล์ 30 ส่วน

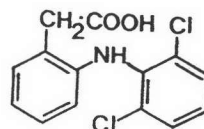
ละลายได้เล็กน้อยในคลอโรฟอร์ม

pKa : 2.7

ค่าการจับกับพลาสมาโปรตีน : 95%

2) ไดโคลฟีแนค (Diclofenac)

สูตรโครงสร้าง :



สูตรเคมี : [2-(2,6-dichloroanilino)phenyl]
acetate

สูตรโมเลกุล : $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$

น้ำหนักโมเลกุล : 296.2

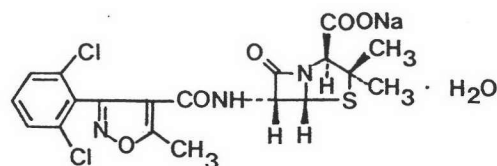
จุดหลอมเหลว : 156-158°C

pKa : 3.8

ค่าการจับกับพลาสมาโปรตีน : > 99%

3) ไดคลอกซาซิลิน โซเดียม (Dicloxacillin sodium)

สูตรโครงสร้าง :



สูตรเคมี : sodium (6R)-6-[3-(2,6-dichloro-
phenyl)-5-methylisoxazole-4-
carboxamido] penicillanate
monohydrate

สูตรโมเลกุล : $C_{19}H_{17}Cl_2N_3NaO_5S \cdot H_2O$

น้ำหนักโมเลกุล : 488.33

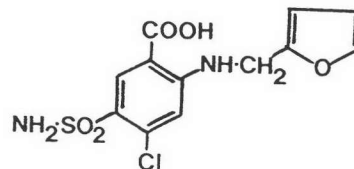
การละลาย : ละลายได้ดีมากในน้ำ

pKa : 2.7

ค่าการจับกับพลาสมาโปรตีน : 96%

4) ฟูโรซีไมด์ (Furosemide)

สูตรโครงสร้าง :



สูตรเคมี : 4-chloro-N-furfuryl-5-sulphamoylanthranilic acid

สูตรโมเลกุล : $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$

น้ำหนักโมเลกุล : 330.77

จุดหลอมเหลว : $206^{\circ}C$ (สลายตัว)

การละลาย : ไม่ละลายในน้ำ

ละลายได้น้อยมากในคลอโรฟอร์ม

1 ส่วนละลายในแอลกอฮอล์ 75 ส่วน

ละลายได้เล็กน้อยในอีเทอร์

ละลายได้ดีมากในอะซีโตน และ

ไดเมทิลฟอร์มาไมด์

ละลายได้ในเมทานอล และสารละลาย

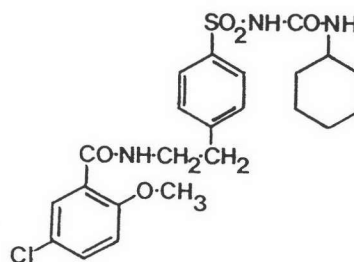
อัลคาไลไฮดรอกไซด์

pKa : 3.9

ค่าการจับกับพลาสมาโปรตีน : 95%

5) ไกลเบนคลาไมด์ (Glibenclamide)

สูตรโครงสร้าง :



สูตรเคมี : 1-{4-[2-(5-chloro-2-methoxy-
benzamide) ethyl] benzenesul-
phenyl}-3-cyclohexylurea

สูตรโมเลกุล : $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$

น้ำหนักโมเลกุล : 494.0

จุดหลอมเหลว : 172-174°C

การละลาย : ไม่ละลายในน้ำและอีเทอร์

1 ส่วนละลายในแอลกอฮอล์ 330 ส่วน

1 ส่วนละลายในคลอโรฟอร์ม 36 ส่วน

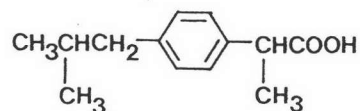
1 ส่วนละลายในเมทานอล 250 ส่วน

pKa : 5.3

ค่าการจับกับพลาสมาโปรตีน : 95%

6) ไอบูโพรเฟน (Ibuprofen)

สูตรโครงสร้าง :



สูตรเคมี : 2-(4-isobutylphenyl) propionic
acid

สูตรโมเลกุล : $C_{13}H_{18}O_2$

น้ำหนักโมเลกุล : 206.27

จุดหลอมเหลว : 75-77°C

การละลาย : ไม่ละลายในน้ำ

1 ส่วนละลายในแอลกอฮอล์ 1.5 ส่วน

1 ส่วนละลายในคลอโรฟอร์ม 1 ส่วน

1 ส่วนละลายในอีเทอร์ 2 ส่วน

1 ส่วนละลายในอะซีโตน 1.5 ส่วน

ละลายในสารละลายอัลคาไล

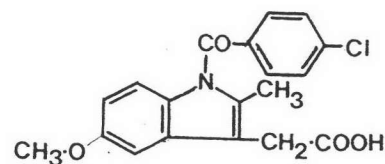
ไฮดรอกไซด์และคาร์บอเนต

pKa : 4.4

ค่าการจับกับพลาสมาโปรตีน : 99%

7) อินโดเมทาซิน (Indomethacin)

สูตรโครงสร้าง :



สูตรเคมี : [1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindol-3-yl]acetic acid

สูตรโมเลกุล : C₁₉H₁₆ClNO₄

น้ำหนักโมเลกุล : 357.81

จุดหลอมเหลว : 158-162°C

การละลาย : ไม่ละลายในน้ำ

1 ส่วนละลายในแอลกอฮอล์ 50 ส่วน

1 ส่วนละลายในคลอโรฟอร์ม 30 ส่วน

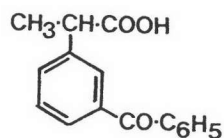
1 ส่วนละลายในอีเทอร์ 40-45 ส่วน

pKa : 4.5

ค่าการจับกับพลาสมาโปรตีน : > 90%

8) คีโตโพรเฟน (Ketoprofen)

สูตรโครงสร้าง :



สูตรเคมี : 2-(3-benzoylphenyl) propionic acid

สูตรโมเลกุล : $C_{16}H_{14}O_3$

น้ำหนักโมเลกุล : 254.29

จุดหลอมเหลว : $93-96^{\circ}C$

การละลาย : ไม่ละลายในน้ำ

ละลายได้ดีมากในแอลกอฮอล์

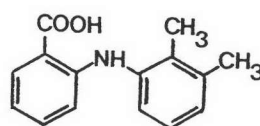
คลอโรฟอร์ม อีเทอร์

pKa : 5.9

ค่าการจับกับพลาสมาโปรตีน : 99%

9) กรดมีเพนนามิค

สูตรโครงสร้าง :



สูตรเคมี : N-(2,3-xilyl) anthranilic acid

สูตรโมเลกุล : $C_{15}H_{15}NO_2$

น้ำหนักโมเลกุล : 241.28

จุดหลอมเหลว : $230-231^{\circ}C$

การละลาย : ไม่ละลายในน้ำ

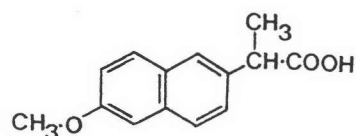
ละลายได้ดีเล็กน้อยในแอลกอฮอล์ และ
คลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในอีเทอร์

pKa : 4.2

ค่าการจับกับพลาสมาโปรตีน : 99%

10) นาโปรเซน (Naproxen)

สูตรโครงสร้าง :



สูตรเคมี : (+)-2-(6-methoxy-2-naphthyl)
propionic acid

สูตรโมเลกุล : C₁₄H₁₄O₃

น้ำหนักโมเลกุล : 230.26

จุดหลอมเหลว : 153°C

การละลาย : ไม่ละลายในน้ำ

1 ส่วนละลายในแอลกอฮอล์ 25 ส่วน

1 ส่วนละลายในคลอโรฟอร์ม 15 ส่วน

1 ส่วนละลายในอีเทอร์ 40 ส่วน

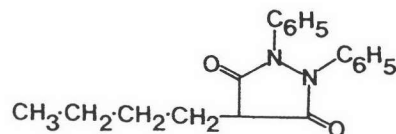
1 ส่วนละลายในเมทานอล 20 ส่วน

pKa : 4.2

ค่าการจับกับพลาสมาโปรตีน : 99%

11) ฟีนิลบิวทาโซน (Phenylbutazone)

สูตรโครงสร้าง :



สูตรเคมี : 4-butyl-1,2-diphenylpyrazolidine-3,
5-dione

สูตรโมเลกุล : $C_{19}H_{20}N_2O_2$

น้ำหนักโมเลกุล : 308.37

จุดหลอมเหลว : $104-107^{\circ}C$

การละลาย : ไม่ละลายในน้ำ

ละลายได้บ้างในแอลกอฮอล์

1 ส่วนละลายในคลอโรฟอร์ม 1.25 ส่วน

1 ส่วนละลายในอีเทอร์ 15 ส่วน

ละลายในสารละลายอัลคาไลไฮดรอกไซด์

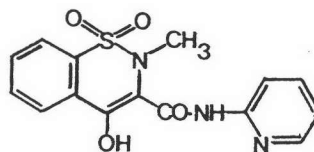
ละลายได้ดีมากในอะซีโตน

pKa : 4.5

ค่าการจับกับพลาสมาโปรตีน : 99%

12) ไพโรอกซีแคม (piroxicam)

สูตรโครงสร้าง :



สูตรเคมี : 4-hydroxy-2-methyl-N-(2-pyridyl)-
2H-1,2-benzothiazine-3-carboxa-
mide-1,1-dioxide

สูตรโมเลกุล : $C_{15}H_{13}N_3O_4S$

น้ำหนักโมเลกุล : 331.35

จุดหลอมเหลว : 198-200°C

การละลาย : ละลายได้น้อยมากในน้ำ, กรดเจือจาง
ละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์ และ
สารละลายอัลคาไลน์

pKa : 6.3

ค่าการจับกับพลาสมาโปรตีน : > 99%

ข. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของตัวยาที่เป็นตัวแบบในการศึกษา

ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของ
ตัวยาทุกตัว ตามที่ปรากฏในเอกสารอ้างอิงก่อนนำมาใช้ในการทดลอง เพื่อเป็น
การยืนยันความบริสุทธิ์ของตัวยาที่นำมาใช้ในการศึกษาทดลอง

1) ลักษณะของตัวยา (Description)

จากการสังเกตลักษณะยาที่ปรากฏให้เห็นด้วยตา ตลอดจน
สีและกลิ่น ได้ผลคล้ายคลึงกับในเอกสารอ้างอิง (USP XXII) ดังแสดงใน
ตารางที่ 2

2) จุดหลอมเหลว

จากการทดลองหาจุดหลอมเหลวของผงยา ด้วยเครื่องหา
จุดหลอมเหลว Buchi (R) ได้จุดหลอมเหลวของยาทุกตัว มีค่าใกล้เคียงกับจุด
หลอมเหลวมาตรฐานของตัวยานั้น ๆ ที่ปรากฏในเอกสารอ้างอิง (USP XXII)
ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะทั่วไปและจุดหลอมเหลวของตัวยา

| ตัวยา | ลักษณะทั่วไปของตัวยา* | จุดหลอมเหลว (°ซ) | |
|----------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|
| | | จากการทดลอง | จากเอกสารอ้างอิง** |
| คลอกลาซาลีนโซเดียม | ผงผลึกสีขาว | - | - |
| ไดโคลฟีแนค | ผงผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น | 156-158 | 156-158 |
| ไดคลอกลาซาลีนโซเดียม | ผงผลึกสีขาว | - | - |
| ฟูโรซีไมด์ | ผงผลึกสีขาวถึงเหลืองอ่อน ไม่มีกลิ่น | 207 ^o (สลายตัว) | 206 ^o (สลายตัว) |
| ไกลเบนคลาไมด์ | ผงผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น | 172-174 | 172-174 |
| ไอบูโพรเฟน | ผงผลึกสีขาว มีกลิ่นเฉพาะตัว | 76-78 | 75-77 |
| อินโดเมทาซิน | ผงผลึกสีขาวถึงเหลืองอ่อน ไม่มีกลิ่น | 159-161 | 158-162 |
| คีโตโพรเฟน | ผงผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น | 94-96 | 93-96 |
| กรดมีเฟนนามิค | ผงผลึกสีขาว ถึงเทาอ่อน ไม่มีกลิ่น | 229-231 | 230-231 |
| นาโพรเซน | ผงผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น | 152 | 153 |
| ฟิโนลิวทาโซน | ผงผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น | 105-107 | 104-107 |
| ไพรออกซิแคม | ผงผลึกสีขาวถึงเหลืองอ่อน ไม่มีกลิ่น | 198-200 | 198-200 |

* เป็นไปตาม USP XXII

** จาก USP XXII

3) คุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ต

จากการสำรวจการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตของสารละลายของตัวยาทุกตัวที่คัดเลือกมาศึกษาด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ได้ สเปคตรัมอัลตราไวโอเล็ตของแต่ละตัวยาที่เหมือนกับสเปคตรัมของตัวยานั้นในเอกสารอ้างอิง (ดังแสดงในภาคผนวก ข.)

4) คุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงอินฟราเรด

จากการสำรวจการดูดกลืนแสง ในช่วงอินฟราเรดของยาทุกตัวที่คัดเลือกมาศึกษาด้วยเครื่องอินฟราเรด สเปคตรัมอินฟราเรดของแต่ละตัวยาที่ได้เหมือนกับสเปคตรัมของตัวยาในเอกสารอ้างอิง (ดังแสดงในภาคผนวก ค.)

2. สภาวะที่ใช้ในการทดลองโดยเทคนิคทาง HPLC

จากการศึกษาทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ แต่ละตัวยาโดยเทคนิค HPLC โดยการใช้คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของแต่ละตัวยาที่ต่างก็มีคุณสมบัติ non-polar ในการเลือกใช้เทคนิค reversed-phase HPLC และเลือกใช้คอลัมน์ที่เป็น C18 กับตัวยาทุกตัวที่ทำการศึกษา เนื่องจากเป็นคอลัมน์ที่มีคุณสมบัติ non-polar มากกว่า alkyl side chain reversed-phase column ชนิดอื่น ๆ ดังกล่าวข้างต้น

จากการตรวจสอบคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของแต่ละตัวยาพบว่า ยาทุกตัวมีความสามารถในการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ต จึงเลือกใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต (UV detector) ในการตรวจวัดระดับ

ยาทุกตัวที่ทำการศึกษานี้ เนื่องจากเป็นคีโตนที่นิยมใช้และมีใช้กันโดยทั่วไปใน ห้องปฏิบัติการ โดยจะเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ตัวยานั้น ๆ มีการดูดกลืนแสงที่ เหมาะสม และสามารถให้โครมาโทแกรมที่มี baseline ที่นิ่งเรียบได้

การทดลองหาส่วนประกอบที่เหมาะสมของโม่บายเฟสของแต่ละตัวยานี้ เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์เทคนิค reversed-phase HPLC โม่บายเฟสที่ ใช้จึงประกอบด้วย ส่วนที่เป็นบัฟเฟอร์และตัวตัดแปรอินทรีย์ บัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นส่วน ประกอบของโม่บายเฟสที่นิยมใช้กันทั่วไปมีอยู่ 2 ชนิดคือ อะซีเตทบัฟเฟอร์และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในการศึกษานี้จะเลือกใช้อะซีเตทบัฟเฟอร์เป็นอันดับแรก สำหรับยาทุกตัวที่ทำการศึกษานี้ เนื่องจากเป็นบัฟเฟอร์ที่มีโอกาสสะสมหรือตกค้าง ของเกลือบัฟเฟอร์น้อยกว่าฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นอกจากนี้แล้วยังพบว่า โม่บายเฟส ที่มีส่วนผสมของอะซีเตทบัฟเฟอร์ จะให้เวลาที่รีเทนในคอลัมน์ของตัวยาที่ค่อนข้าง คงที่ (Law and chan, 1991) เมื่อเปรียบเทียบกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ยาตัวใด ที่ไม่สามารถใช้อะซีเตทบัฟเฟอร์ได้ จึงเลือกฟอสเฟตบัฟเฟอร์แทน ส่วนตัวตัด แปรอินทรีย์ที่เลือกใช้มี 2 ตัวคือ แอซีโตนไนโตรล และเมทานอล ความเข้มข้น และค่า pH ของบัฟเฟอร์ตลอดจนสัดส่วนขององค์ประกอบของโม่บายเฟสจะทำการ ทดลองโดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของแต่ละตัวยานี้เป็นหลัก จนกระทั่ง ได้โม่บายเฟสที่ทำให้วิเคราะห์ยาแต่ละตัวได้โดยมีการแยกที่ดี มีเวลาที่รีเทนใน คอลัมน์ที่เหมาะสม และไม่ถูกรบกวนด้วย endogenous substance ต่าง ๆ

จากการทดลองได้สภาวะที่ใช้ในการทดลองทาง HPLC สำหรับทุก ตัวยานี้ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทดลองทางHPLC

| ชื่อยา | โครมาโทกราฟีคอลัมน์ | โมบายเฟส | อัตราการไหล (มล./นาที) | ดีเทคเตอร์ (นาโนเมตร) | เครื่องประมวลผล | |
|-------------------------|-----------------------------------|---|---------------------------|--------------------------|-----------------|----------------|
| | | | | | แอสเพนเฮน | ความเร็วกระดาษ |
| คลอซาซิมีน โซเดียม | μ Bondapak C18 3.9x300 มม. | อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH5.60(0.02M)=70 : แอซีโตนไตรล์=30 | 1.00 P=2000psi | UV 225 | 2 ⁶ | 3มล./นาที |
| โดโคลีนีน | Bondclone10 C18 3.9x300 มม. | อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH4.20(0.10M)=45 : แอซีโตนไตรล์=55 | 1.50 P=979psi | UV 285 | 2 ² | 5นาที/ชม. |
| โดคลอซาซิมีน โซเดียม | μ Bondapak C18 3.9x300 มม. | อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH5.60(0.02M)=71 : แอซีโตนไตรล์=29 | 1.00 P=2000psi | UV 225 | 2 ⁵ | 3มล./นาที |
| ฟูโรซีไมด์ | μ Bondapak C18 3.9x300 มม. | อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH5.30(0.02M)=78 : แอซีโตนไตรล์=22 | 1.50 P=1600psi | UV 280 | 2 ³ | 5นาที/ชม. |
| ไกลเบนคลาไมด์ | μ Bondapak C18 3.9x300 มม. | ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH3.50(0.10M)=54 : แอซีโตนไตรล์=46 | 1.60 P=2000psi | UV 230 | 2 ⁰ | 5นาที/ชม. |
| ไฮโปโซเฟน | μ Bondapak C18 3.9x300 มม. | อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH4.20(0.10M)=45 : แอซีโตนไตรล์=55 | 1.50 P=1400psi | UV 220 | 2 ⁴ | 5นาที/ชม. |
| อินโดเมทาซิน | μ Bondapak C18 3.9x300 มม. | อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH4.20(0.10M)=45 : แอซีโตนไตรล์=55 | 1.50 P=1400psi | UV 260 | 2 ⁴ | 3มล./นาที |
| คีโตโซเฟน | Bondclone10 C18 3.9x300 มม. | อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH4.20(0.10M)=52 : แอซีโตนไตรล์=48 | 1.50 P=1100psi | UV 260 | 2 ⁴ | 5นาที/ชม. |

ตารางที่ 3 แสดงสภาวะที่ใช้ในการทดลองทางHPLC (ต่อ)

| ชื่อยา | โครมาโทกราฟีคอลัมน์ | โมบายเฟส | อัตราการไหล (มล./นาที) | ดีเทคเตอร์ (นาโนเมตร) | เครื่องประมวลผล | |
|---------------|--------------------------------|---|---------------------------|--------------------------|-----------------|----------------|
| | | | | | แอมเพนเอชั่น | ความเร็วกระดาษ |
| กรดมีเฟนนามิค | Bondclone10 C18 3.9x300 มม. | อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH4.20(0.10M)=45 : แอซีโตนไตรล์=55 | 1.50 P=990psi | UV 280 | 2 ² | 5นาที/ชม. |
| นาโปรเซน | μ Bondapak C18 | อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH4.20(0.10M)=52 : แอซีโตนไตรล์=48 | 1.50 P=1200psi | UV 240 | 2 ⁷ | 5นาที/ชม. |
| ฟีนอลบิวทาไมน | μ Bondapak C18 | อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH4.20(0.10M)=45 : แอซีโตนไตรล์=55 | 1.50 P=1400psi | UV 240 | 2 ⁷ | 3ชม./นาที |
| ไพโรกซิแคม | μ Bondapak C18 | ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH5.6(0.085M)=50 : เมทานอล=50 | 1.00 P=1970psi | UV 361 | 2 ⁵ | 3ชม./นาที |

3. ผลการศึกษาวิเคราะห์ยาต่าง ๆ ที่คัดเลือกโดยการแยกพลาสมาโปรตีน

การดำเนินการทดลองเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณยาที่เติมในพลาสมาของคน โดยทำการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาของยาทุกตัวด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เป็นตัวทาละลายอินทรีย์ 2 ตัวคือ แอซีโตนไนโตรล์และเมทานอลก่อน ผลการทดลองจะประเมินตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ โดยอาศัยหลักทางทฤษฎี ยาตัวใดที่ไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินดังกล่าวจะถูกทดลองเพื่อแยกพลาสมาโปรตีนต่อ โดยใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนที่ทำให้พลาสมาโปรตีนเกิดเกลือที่ไม่ละลายน้ำที่เป็นสารอนินทรีย์ที่มีประจุบวก คือ ซิงค์ซัลเฟต และ/หรือ สารอนินทรีย์ที่มีประจุลบ คือ กรดไตรคลอโรอะซิติก ตามลำดับ ยาตัวใดที่ผ่านเกณฑ์การประเมินดังกล่าวแล้วจะถูกทดลองเพื่อ validate วิธีวิเคราะห์จนครบตามหลักทางทฤษฎี ยาตัวใดเมื่อผ่านขั้นตอนทั้งหมดนี้แล้ว ยังไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินจะจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีน

3.1 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ยาคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมา

3.1.ก การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน

1) ลักษณะตัวอย่างพลาสมาหลังเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนลงในตัวอย่างพลาสมา

ก) เมื่อใช้แอซีโตนไนโตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสมาโปรตีนจับกันแน่น เป็นก้อนขนาดใหญ่สีเหลืองอมส้มเกาะติดที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณน้อย ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่า

- สารละลายใสที่แยกออกมาเป็นสีเหลือง มีความใสสะอาด มีปริมาณมาก มี pH ประมาณ 7

ข) เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกไมโครตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสติกไมโครตีน เป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อน จับกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณมาก ผิวหน้าตะกอนฟุ้งกระจายเล็กน้อย เมื่อเขย่าอย่างแรง
- สารละลายสีที่แยกออกมา เป็นสีเหลืองอ่อน มีความใสสะอาด มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่า ของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

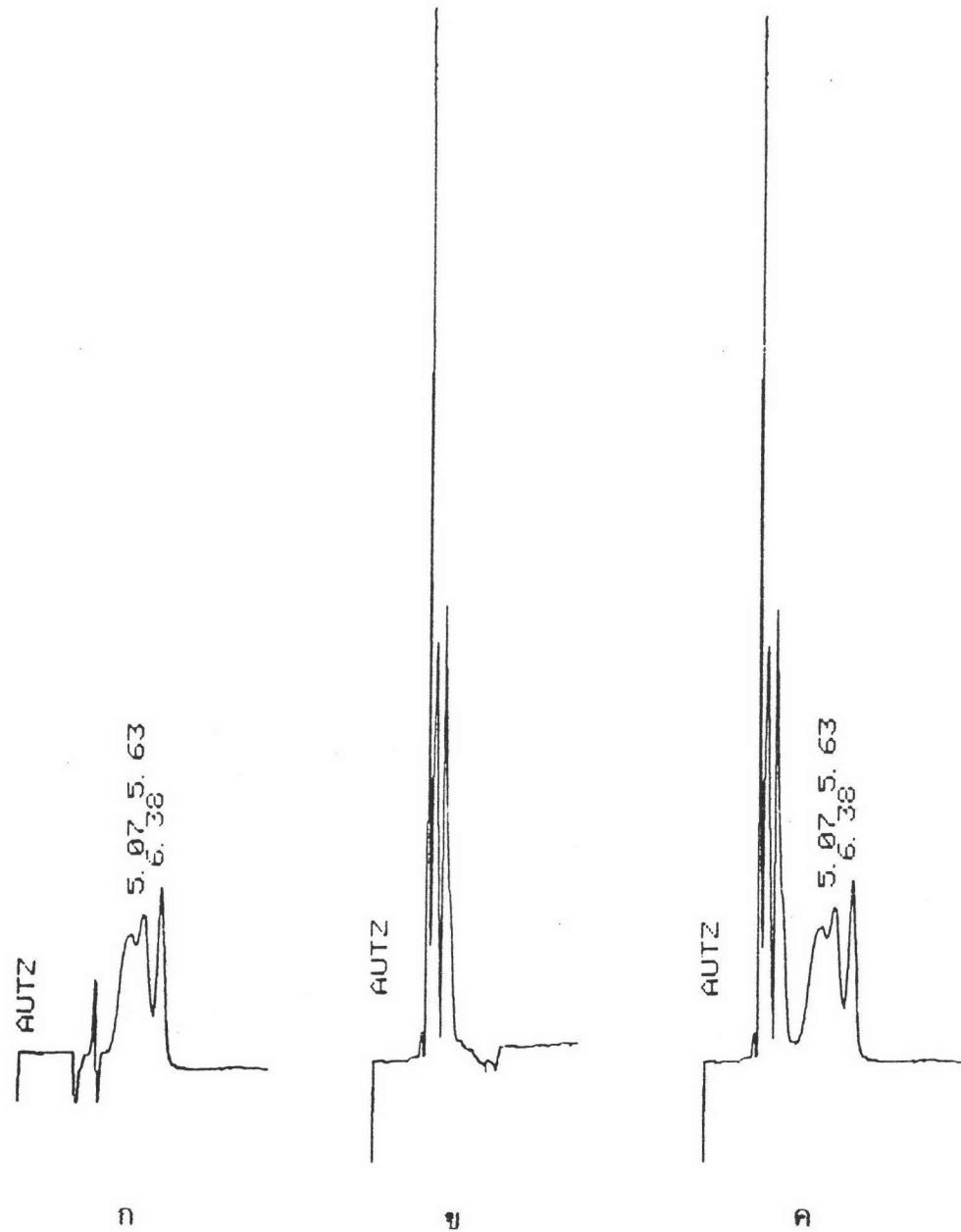
2) ลักษณะโครมาโทแกรม

ก) เมื่อใช้แอสีโตนไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกไมโครตีน

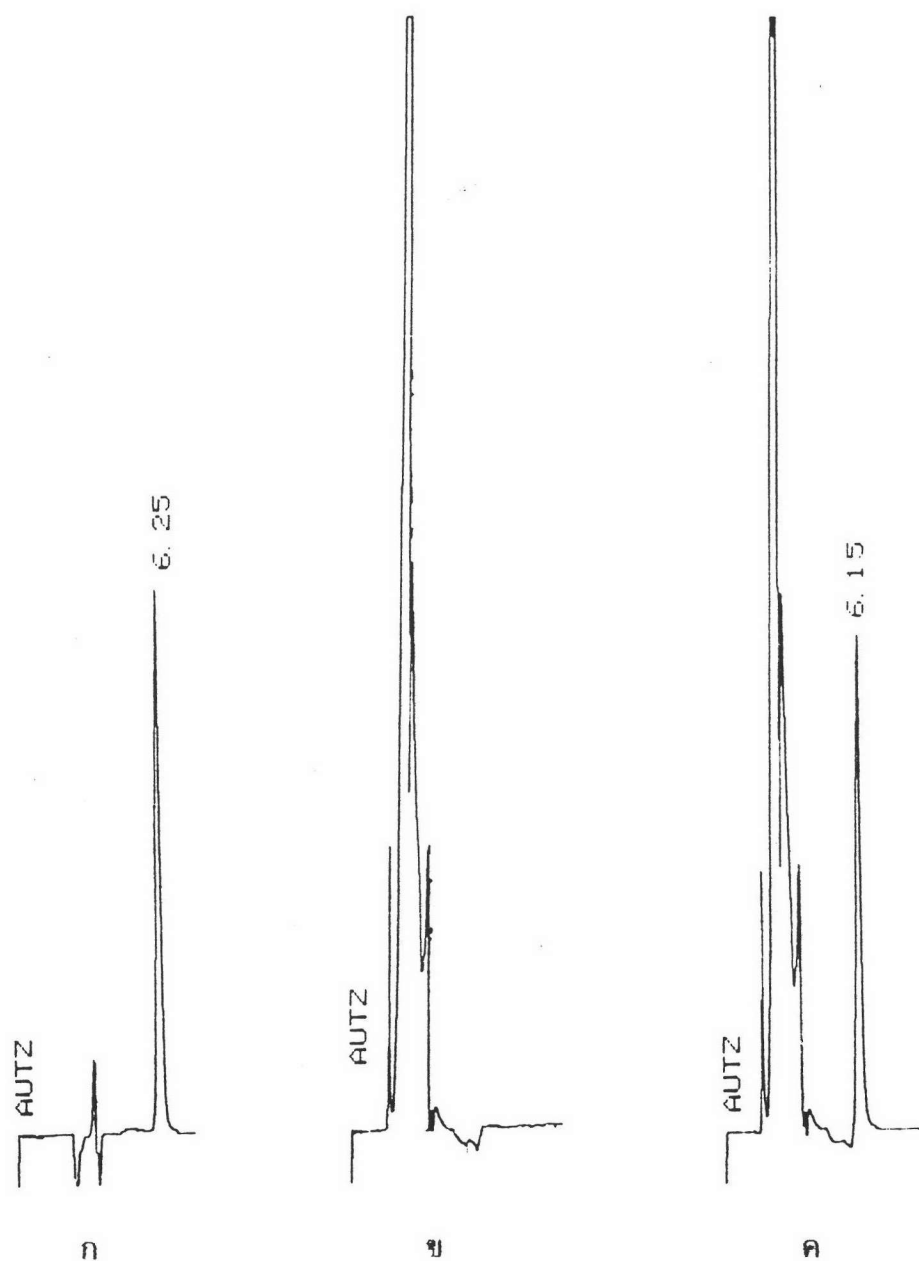
พีคของยาบนโครมาโทแกรมแยกเป็นหลายพีคไม่เป็นพีคเดี่ยว ดังแสดงในรูปที่ 4 ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะของโมบายเฟสที่ไม่เหมาะสม ทำให้ค่าความแรงของโมบายเฟสน้อยกว่าตัวที่ละลายในตัวอย่างพลาสติกไมโครตีน ซึ่งในที่นี้คือ แอสีโตนไนโตรส เป็นผลให้ได้พีคของยาบนโครมาโทแกรมในลักษณะเช่นนี้ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้จึงไม่ผ่านเกณฑ์การประเมิน

ข) เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสติกไมโครตีน

จากโครมาโทแกรมของแบลนด์พลาสติกไมโครตีนและตัวอย่างพลาสติกไมโครตีน จะเห็นว่า พีคของยาบนโครมาโทแกรม ปรากฏเป็นพีคเดี่ยวและไม่ถูกรบกวนจากพีคของ endogenous ซึ่งมีขนาดใหญ่ เนื่องจากพีคของ endogenous ถูกชะออกมาได้หมดก่อนพีคยา ดังแสดงในรูปที่ 5 พิจารณาจากพีคของยาคลอกซาซิลิน โซเดียม เมื่ออยู่ในพลาสติกไมโครตีน และเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐานของสารแยกพลาสติกไมโครตีนชนิดเดียวกันจะเห็นว่า มีลักษณะเหมือนกันและมีค่าเวลาที่รีเทนเนชันที่ใกล้เคียงกันมาก (คลอกซาซิลิน โซเดียม = 6.15 นาที และ 6.25 นาที เมื่ออยู่ในพลาสติกไมโครตีนและสารละลายมาตรฐาน ตามลำดับ) เป็นการแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์



- รูปที่ 4 โคโรมาโทแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณคลอกซาซอลิน โซเดียม ในพลาสมา
เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเอซีทีไนไตรล์ โดยเทคนิค HPLC
- ก. เป็นโคโรมาโทแกรมของคลอกซาซอลิน โซเดียมในสารละลายมาตรฐาน
 - ข. เป็นโคโรมาโทแกรมของแบลนด์พลาสมา
 - ค. เป็นโคโรมาโทแกรมของคลอกซาซอลิน โซเดียมในพลาสมา
ความเข้มข้น 84.0 มคก./มล. (ใช้แอทเทนนูเอชั่น 2^5)



รูปที่ 5 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาคลอกซาซิลิน โซเดียม ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล โดยเทคนิค HPLC

- ก. เป็นโครมาโทแกรมของคลอกซาซิลิน โซเดียมในสารละลายมาตรฐาน
- ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา
- ค. เป็นโครมาโทแกรมของคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมา ความเข้มข้น 84.0 มกค./มล. (ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^5)

ดังนั้นการทดลองขั้นต่อไปในการวิเคราะห์
ยาคลอกซาซอลิน โซเดียม ในพลาสมาจะใช้เมทานอลเพียงอย่างเดียว เป็นสาร
แยกพลาสมาโปรตีน

3) เฟอร์เซนต์การคืนกลับของยา

ผลการทดลองหาเฟอร์เซนต์การคืนกลับของยาใน
พลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ มีค่า =
 $89.89 \pm 5.04\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า = $90.44 \pm 5.96\%$
เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของพีคยาโดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา
ดังแสดงในตารางที่ 4

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการแยก
พลาสมาโปรตีนของยาคลอกซาซอลิน โซเดียม จึงทำการรวบรวมและสรุป
ดังแสดงในตารางที่ 5

3.1.ข การ validate วิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ยาคลอกซาซอลินโซเดียมในพลาสมาที่ผ่าน
การประเมินผลการแยกพลาสมาโปรตีน เป็นการใช้เมทานอลเพียงอย่างเดียว
ในการแยกพลาสมาโปรตีน

1) การศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสาร

แสดงในเทอมของเฟอร์เซนต์การคืนกลับของยา

ดังรายละเอียดในข้อ 3.1.ก.3)

2) ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่พีคยากับ

ความเข้มข้นของยาในพลาสมา

ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคยาคลอกซาซอลิน

โซเดียม กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมา

ตารางที่ 4 เปรี่เซนต์การคืนกลับของยาคลอกซาซิลิน โขเตียมานพลาสมาเมื่อใช้เมทานอล
เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (physical recovery;n=6)

| ก.พื้นที่ผิวยา | | | | | | | | |
|----------------------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 1.2 | 85.96 | 86.33 | 89.98 | 87.77 | 91.15 | 98.20 | 89.90(4.54) | 5.06 |
| 4.8 | 90.81 | 85.15 | 80.30 | 81.08 | 93.08 | 93.84 | 87.38(6.01) | 6.88 |
| 24.0 | 87.34 | 85.04 | 86.30 | 85.60 | 87.49 | 87.52 | 86.55(1.07) | 1.23 |
| 48.0 | 89.67 | 91.57 | 89.51 | 91.42 | 91.45 | 90.00 | 90.60(0.97) | 1.08 |
| 84.0 | 90.53 | 93.73 | 97.58 | 97.28 | 96.37 | 94.71 | 95.03(2.66) | 2.80 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 89.89(4.54) | 5.04 |
| ข.ความสูงพิคยา(มม.) | | | | | | | | |
| 1.2 | 92.22 | 93.89 | 96.96 | 96.81 | 93.27 | 92.23 | 94.23(2.15) | 2.28 |
| 4.8 | 90.36 | 94.46 | 92.98 | 93.79 | 92.61 | 90.39 | 92.43(1.72) | 1.86 |
| 24.0 | 95.71 | 92.42 | 90.48 | 90.05 | 92.68 | 94.68 | 92.67(2.24) | 2.41 |
| 48.0 | 85.71 | 80.00 | 81.40 | 82.93 | 89.74 | 94.87 | 85.78(5.64) | 6.57 |
| 84.0 | 81.82 | 100.00 | 90.00 | 80.00 | 88.89 | 81.82 | 87.09(7.54) | 8.66 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 90.44(5.39) | 5.96 |

* ความเข้มข้นของคลอกซาซิลิน โขเตียม

ตารางที่ 5 สรุปการวิเคราะห์ผลการแยกผลาสมาโปรตีนของยาคลอกซาซิลิน โซเดียม

| | CH ₃ CN | CH ₃ OH |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|
| Appearance | pass | pass |
| Chromatogram | fail | pass |
| %Physical Recovery (n=30) | - | pass |
| -peak area \bar{X} (SD) | | 89.89(4.54) |
| $\%CV$ | | 5.04 |
| -peak height \bar{X} (SD) | | 90.44(5.39) |
| $\%CV$ | | 5.96 |

โปรตีนที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาคือ 0.12 - 84.0 มก./มล. พลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 6 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = - 715.2092 + 15.9000 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่ฟิคยาคลอกซาซิลิน โซเดียม และ X เป็นความเข้มข้นของยาคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมา (นาโนกรัม/มล. พลาสมา) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) = 0.99978

3) ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

พิจารณาจากโครมาโทแกรมดังรูปที่ 5 แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมา โดยใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน มีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังรายละเอียดในข้อ 3.1.ก 2) ข)

4) การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์

จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยา

คลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 คือ 0.12 มก./มล. พลาสมา (S/N ratio = 3.35 ± 0.19 ; %CV = 5.69%) ดังแสดงในตารางที่ 6

5) ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน

และระหว่างวัน ดังแสดงในตารางที่ 7 และ 8 ตามลำดับ จะเห็นว่า ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาคือ 0.12-84.0 มก./มล. พลาสมา มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 0.46-2.73% และ %CV ของพื้นที่ฟิคยาอยู่ในช่วง 0.28-3.34% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 2.48-4.06% และ

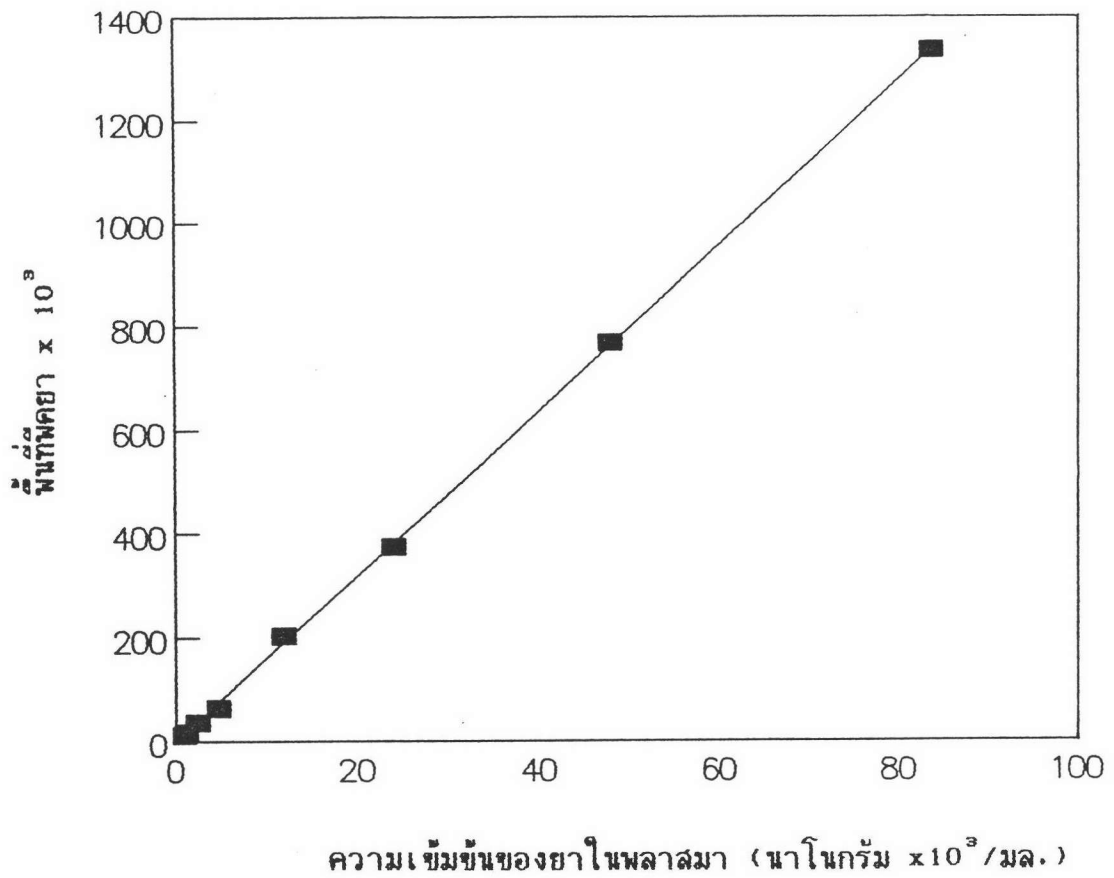
%CV ของพื้นที่พีค 1.49-8.71% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยาโคลอกซาซอลีนโซเดียมในพลาสมาโดยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลนี้แม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ยาในวันเดียวกันหรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

6) ปริมาณต่ำสุดของตัวยาในตัวอย่างพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ได้

จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.12-84.0 มคก./มล. พลาสมา สำหรับความเข้มข้น 0.12 มคก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์นั้น ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกัน และระหว่างวัน = 2.89 และ 8.71% ตามลำดับ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคและให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 1.51 และ 3.93% ตามลำดับ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีค ดังนั้นจึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยาโคลอกซาซอลีน โซเดียม 0.12 มคก./มล. เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย

7) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมิน (จากขั้นตอนที่ 4) มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาที่รับมาจำนวน 9 ตัวอย่าง คือ ที่ความเข้มข้น 4.8, 24.0 และ 84.0 มคก./มล. (ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% Analytical recovery) ดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ในความเข้มข้นที่แตกต่างกันก็ให้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ = $98.38 \pm 2.13\%$ ซึ่งเป็นเครื่องยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยาโคลอกซาซอลีนโซเดียมได้ถูกต้องแม่นยำจริง ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา



รูปที่ 6

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผืนยาคลอซอกซาซิมิน โซเดียม กับความเข้มข้นของยาคลอซอกซาซิมิน โซเดียม ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล

สมการเส้นตรง คือ $Y = 15.9000X - 715.2092$

$$r^2 = 0.99978$$

ตารางที่ 6 ค่าอัตราส่วน S/N ของการวิเคราะห์คลอกซาซิลิน โซเดียม
ในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

| S/N ratio |
|--------------------------|
| 3.32 |
| 3.18 |
| 3.23 |
| 3.18 |
| 3.23 |
| 3.27 |
| 3.32 |
| 3.41 |
| 3.73 |
| 3.64 |
| $\bar{X}(SD)=3.35(0.19)$ |
| %CV = 5.69 |

ความเข้มข้นของคลอกซาซิลิน โซเดียม = 0.12 มคก./มล.

ตารางที่ 7 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมา
ภายในวันเดียวกัน เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(within-run precision;n=3)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | |
|----------------------------|---------|---------|---------|--------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.12 | 2293 | 2194 | 2318 | 2268.3(65.6) | 2.89 |
| 1.2 | 37379 | 36957 | 37582 | 37306.0(318.8) | 0.85 |
| 4.8 | 90828 | 90383 | 94774 | 91995.0(2416.9) | 2.63 |
| 24.0 | 398194 | 377969 | 402632 | 392931.7(13146.7) | 3.34 |
| 48.0 | 784800 | 781246 | 785329 | 783791.7(2220.4) | 0.28 |
| 84.0 | 1282947 | 1250915 | 1303922 | 1279261.3(22695.0) | 2.09 |
| ข. ความสูงพีคยา(มม.) | | | | | |
| 0.12** | 3.8 | 3.8 | 3.9 | 3.83(0.06) | 1.51 |
| 1.2 | 3.6 | 3.7 | 3.7 | 3.67(0.06) | 1.57 |
| 4.8 | 9.6 | 9.5 | 9.5 | 9.53(0.06) | 0.60 |
| 12.0 | 44.0 | 42.0 | 44.1 | 43.37(1.18) | 2.73 |
| 48.0 | 87.1 | 86.3 | 86.7 | 86.70(0.40) | 0.46 |
| 84.0 | 141.9 | 138.8 | 144.2 | 141.63(2.71) | 1.91 |

* ความเข้มข้นของคลอกซาซิลิน โซเดียม

** ใช้แอทเทนนูเอชั่น 2^1

ตารางที่ 8 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมาระหว่างวัน
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | | | |
|----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|--------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.12 | 1909 | 2030 | 2350 | 2171 | 2318 | 2155.6(187.7) | 8.71 |
| 1.2 | 31920 | 34495 | 39251 | 35001 | 37582 | 35649.8(2844.6) | 7.98 |
| 4.8 | 100035 | 102955 | 91340 | 93110 | 94774 | 96442.8(4879.6) | 5.06 |
| 24.0 | 417698 | 398460 | 424835 | 410298 | 402632 | 410784.6(10768.1) | 2.62 |
| 48.0 | 814251 | 815018 | 807605 | 807107 | 785329 | 805862.0(12045.7) | 1.49 |
| 84.0 | 1312884 | 1291536 | 1338911 | 1291473 | 1303922 | 1307745.2(19620.5) | 1.50 |
| ข. ความสูงพีคยา (มม.) | | | | | | | |
| 0.12** | 3.7 | 4.0 | 3.7 | 4.0 | 3.9 | 3.86(0.15) | 3.93 |
| 1.2 | 3.6 | 3.9 | 3.6 | 3.9 | 3.7 | 3.74(0.15) | 4.06 |
| 4.8 | 9.9 | 9.6 | 9.3 | 9.8 | 9.5 | 9.62(0.24) | 2.48 |
| 24.0 | 41.9 | 41.0 | 42.0 | 40.7 | 44.1 | 41.94(1.33) | 3.17 |
| 48.0 | 82.8 | 81.8 | 80.9 | 81.1 | 86.7 | 82.66(2.38) | 2.88 |
| 84.0 | 133.4 | 131.8 | 138.2 | 132.5 | 144.2 | 136.02(5.21) | 3.83 |

* ความเข้มข้นของคลอกซาซิลิน โซเดียม

**ใช้แอทเทนนูเอชัน 2¹

ตารางที่ 9 เปรอ์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยาคลอกซาซิลิน โซเดียม
ในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(analytical recovery; n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสมา (มคก./มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (มคก./มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|--|---|---|
| 4.8 | 4.8 | 100.00 |
| 4.8 | 4.7 | 97.92 |
| 4.8 | 4.8 | 100.00 |
| 24.0 | 24.1 | 100.42 |
| 24.0 | 24.0 | 100.00 |
| 24.0 | 23.9 | 99.58 |
| 84.0 | 80.1 | 95.36 |
| 84.0 | 79.9 | 95.12 |
| 84.0 | 81.5 | 97.02 |
| | | $\bar{X}(SD)=98.38(2.10)$ %CV = 2.13 |

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาคลอซาทิลีน โซเดียมในพลาสมาโดยหลักการ แยกพลาสมาโปรตีน จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 10

3.2 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ยาไดโคคลฟีแนคในพลาสมา

3.2.ก การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน

1) ลักษณะตัวอย่างพลาสมาหลังเติมสารแยกพลาสมา โปรตีนลงในตัวอย่างพลาสมา

ก) เมื่อใช้แอสซีโตไนโตรสเป็นสารแยกพลาสมา โปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสมาโปรตีนจับกันแน่น เป็นก้อนขนาดใหญ่สีเหลืองอมส้ม เกาะติดที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณน้อย ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่า

- สารละลายใสที่แยกออกมาเป็นสีเหลือง มีความใสสะอาด มีปริมาณมาก มี pH ประมาณ 7

ข) เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสมาโปรตีน เป็นผง ละเอียดสีเหลืองอ่อน จับกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณมาก ผิวหน้า ตะกอนฟุ้งกระจายเล็กน้อย เมื่อเขย่าอย่างแรง

- สารละลายใสที่แยกออกมา เป็นสีเหลือง อ่อน มีความใสสะอาด มีปริมาณประมาณ 2.5 เท่า ของปริมาณตะกอน มี pH ประมาณ 7

ตารางที่ 10 สรุปการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาคลอซาทิลีน โซเดียม
โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน

| | conc. ($\mu\text{g/ml}$) | CH ₃ OH |
|---------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| <u>%Phy.Reco.</u> (n=30) | 1.2-84.0 | |
| -peak area \bar{X} (SD) | | 89.89(4.54) |
| %CV | | 5.04 |
| -peak height \bar{X} (SD) | | 90.44(5.39) |
| %CV | | 5.96 |
| <u>Linearity</u> | 0.12-84.0 | |
| Eq. Y= | | -715.2092+15.9000X |
| r ² | | 0.99978 |
| <u>Specificity</u> | | |
| <u>LLD</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.12 |
| <u>Precision</u> %CV | 0.12-84.0 | |
| -within-run (n=3) | | |
| peak area | | 0.28-3.34 |
| peak height | | 0.46-2.73 |
| -between-run (n=5) | | |
| peak area | | 1.49-8.71 |
| peak height | | 2.48-4.06 |
| <u>LLQ</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.12 |
| <u>%Anal.Reco.</u> (n=9) | | |
| \bar{X} (SD) | | 98.38(2.10) |
| %CV | | 2.13 |

2) ลักษณะโครมาโทแกรม

ก) เมื่อใช้แอสีโตไนโตรส เป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน

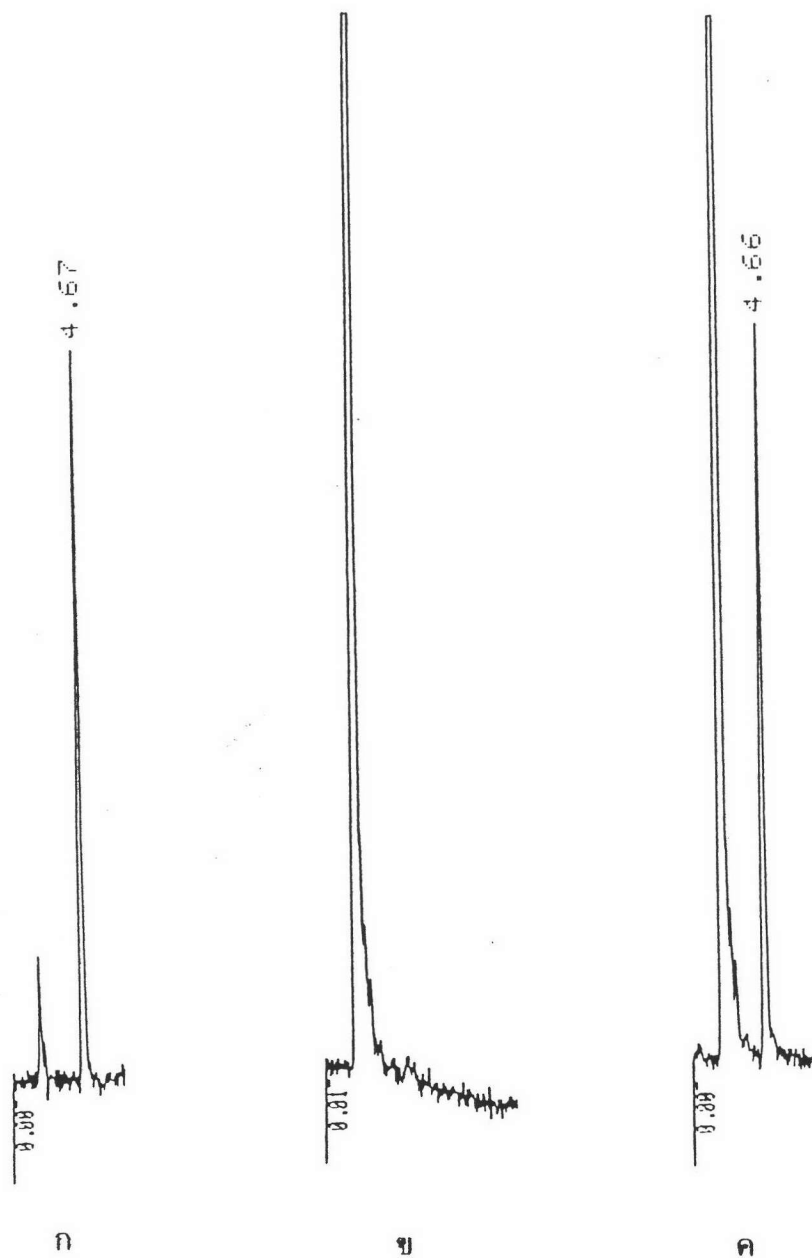
จากโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสติกมาและตัวอย่างพลาสติกมา จะเห็นว่าพีคของยาบนโครมาโทแกรมปรากฏเป็นพีคเดี่ยวและไม่ถูกรบกวนจากพีคของ endogenous ซึ่งมีขนาดใหญ่ เนื่องจากพีคของ endogenous ถูกชะออกมาได้หมดก่อนพีคของยา ดังแสดงในรูปที่ 7 พิจารณาจากพีคของยาไดโคลฟีแนค เมื่ออยู่ในพลาสติกมา และเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐานของสารแยกพลาสติกมาโปรตีนชนิดเดียวกัน จะเห็นว่ามีลักษณะเหมือนกัน และมีค่าเวลาที่รีเทนชันคอลัมน์ที่ใกล้เคียงกันมาก (ไดโคลฟีแนค = 4.66 นาที และ 4.67 นาที เมื่ออยู่ในพลาสติกมาและสารละลายมาตรฐาน ตามลำดับ) แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

ข) เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน

โครมาโทแกรมที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกับก. แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ พิจารณาจากค่าเวลาที่รีเทนชันคอลัมน์ของยาไดโคลฟีแนค เมื่ออยู่ในพลาสติกมาและเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐานของสารแยกพลาสติกมาโปรตีนชนิดเดียวกัน มีค่าเท่ากัน (ไดโคลฟีแนค = 4.725 นาที ทั้งเมื่ออยู่ในพลาสติกมาและสารละลายมาตรฐาน) ดังแสดงในรูปที่ 8

3) เปอร์เซนต์การคืนกลับของยา

ผลการทดลองหาเปอร์เซนต์การคืนกลับของยาในพลาสติกมา ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อใช้แอสีโตไนโตรส เป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีนมีค่า = $94.04 \pm 4.68\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า = $97.49 \pm 5.19\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของพีคยา ดังแสดงในตารางที่ 11 และเมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีนมีค่า = $95.43 \pm 4.50\%$ เมื่อ



รูปที่ 7

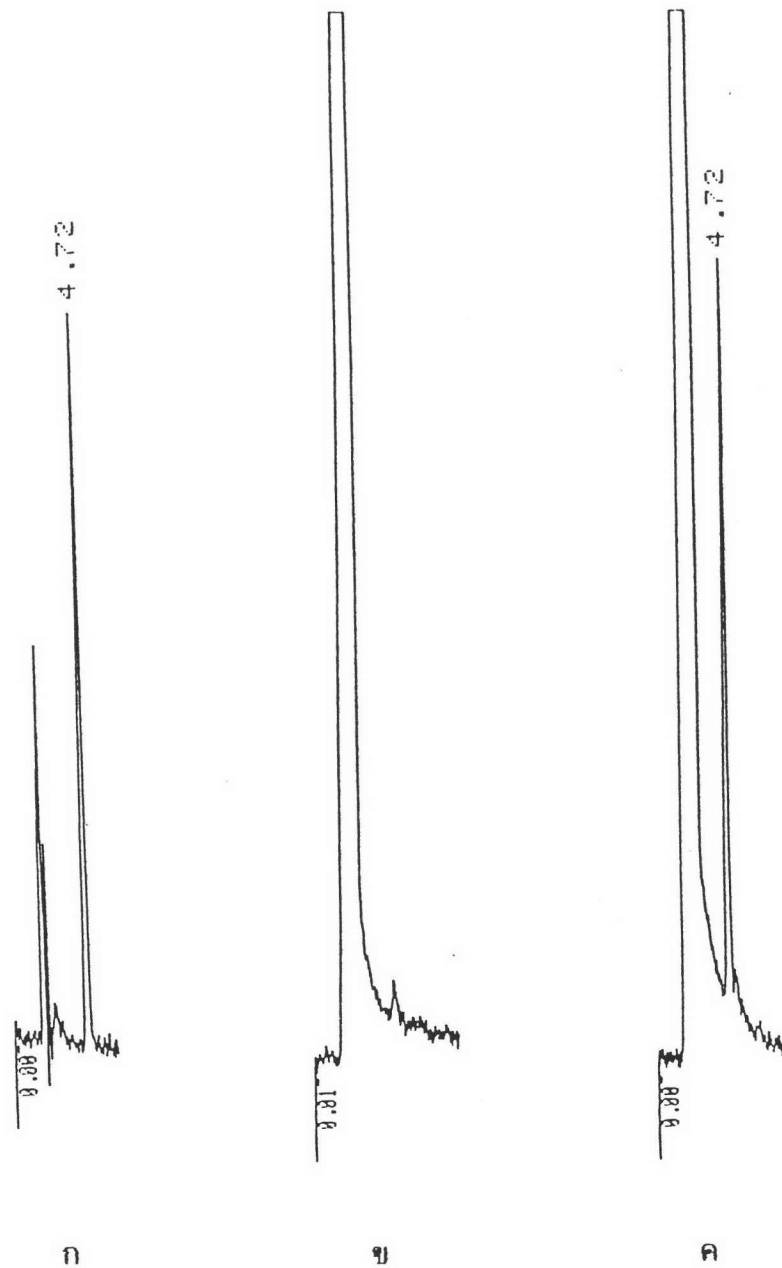
โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาไดโคลฟีแนค ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเอซีทีไนไตรล์ โดยเทคนิค HPLC

ก. เป็นโครมาโทแกรมของไดโคลฟีแนคในสารละลายมาตรฐาน

ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา

ค. เป็นโครมาโทแกรมของไดโคลฟีแนคในพลาสมา

ความเข้มข้น 3.0 มคก./มล. (ใช้แอนเทนนูเอชั่น 2')



รูปที่ 8

โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาไดโคลฟีแนค ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล โดยเทคนิค HPLC

ก. เป็นโครมาโทแกรมของไดโคลฟีแนคในสารละลายมาตรฐาน

ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลนด์พลาสมา

ค. เป็นโครมาโทแกรมของไดโคลฟีแนคในพลาสมา

ความเข้มข้น 3.0 มคก./มล. (ใช้แอทเทนนูเอชัน 2¹)

คำนวณโดยใช้พื้นที่พิกษาและมีค่า = $99.69 \pm 1.84\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพิกษาโดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา ดังแสดงในตารางที่ 12

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการแยกพลาสมาโปรตีนของยาไดโคลฟีแนค จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 13

3.2.ข การ validate วิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ยาไดโคลฟีแนคในพลาสมา ที่ผ่านการประเมินผลการแยกพลาสมาโปรตีน เป็นการใช้แอซีโตนไนโตรส และ เมทานอล ในการแยกพลาสมาโปรตีน

1) การศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสาร

แสดงในเทอมของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยา ดังรายละเอียดในข้อ 3.2.ก.3)

2) ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่พิกษากับความเข้มข้นของยาในพลาสมา

ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พิกษาไดโคลฟีแนค กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา เมื่อใช้แอซีโตนไนโตรสเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.2-3.0 มคก./มล. พลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 9 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = 113.9136 + 5.2090 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่พิกษาไดโคลฟีแนค และ X เป็นความเข้มข้นของยาไดโคลฟีแนคในพลาสมา (นาโนกรัม/มล.พลาสมา) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) = 0.99903

ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ฟิเคยาโคโคลทีแนค กับ ความเข้มข้นของยาในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.2-3.0 มคก./มล.พลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 10 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = 173.1743 + 6.5343 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่ฟิเคยาโคโคลทีแนค และ X เป็นความเข้มข้นของยาโคโคลทีแนคในพลาสมา (นาโนกรัม/มล.พลาสมา) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) = 0.99706

3) ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ พิจารณาจากโครมาโทแกรมดังรูปที่ 7 และ 8 แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาโคโคลทีแนคในพลาสมาโดยใช้แอซีโตนไนโตรสและเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน มีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังรายละเอียดในข้อ 3.2.ก 2) ก) และ ข)

4) การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์

จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยาโคโคลทีแนคในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 คือ 0.2 มคก./มล.พลาสมา (S/N ratio = 2.31 ± 0.16 ; %CV = 7.15%) และ 0.2 มคก./มล. พลาสมา (S/N ratio เฉลี่ย = 2.85 ± 0.13 ; %CV = 4.61%) สำหรับการวิเคราะห์แอซีโตนไนโตรสและเมทานอลตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 14

5) ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน และระหว่างวัน โดยการวิเคราะห์แอซีโตนไนโตรสเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ดังแสดง

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาโคคลิฟิแนคในพลาสติกเมื่อใช้แอซีเตไนด์
เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน (physical recovery;n=6)

| ก. พื้นที่พิกษา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.3 | 92.73 | 90.91 | 92.06 | 90.26 | 94.37 | 89.36 | 91.62(1.81) | 1.98 |
| 0.6 | 95.76 | 81.89 | 89.97 | 93.26 | 88.07 | 88.55 | 89.58(4.78) | 5.34 |
| 1.0 | 95.74 | 94.61 | 96.11 | 96.67 | 90.64 | 96.81 | 95.10(2.32) | 2.44 |
| 2.0 | 96.34 | 94.23 | 92.57 | 93.74 | 96.82 | 93.51 | 94.54(1.68) | 1.78 |
| 3.0 | 102.83 | 94.68 | 103.38 | 97.21 | 98.24 | 99.91 | 99.38(3.36) | 3.38 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 94.04(4.40) | 4.68 |
| ข. ความสูงพิกษา (มม.) | | | | | | | | |
| 0.3 | 94.44 | 98.21 | 100.92 | 100.00 | 90.91 | 95.76 | 96.71(3.75) | 3.88 |
| 0.6 | 108.24 | 87.88 | 107.18 | 100.00 | 100.00 | 87.61 | 98.48(9.01) | 9.15 |
| 1.0 | 95.11 | 95.27 | 101.82 | 102.74 | 96.97 | 100.00 | 98.65(3.33) | 3.37 |
| 2.0 | 94.70 | 94.72 | 93.42 | 95.84 | 99.85 | 97.88 | 96.07(2.38) | 2.48 |
| 3.0 | 100.81 | 99.18 | 103.10 | 92.02 | 100.73 | 89.27 | 97.52(5.54) | 5.68 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 97.49(5.06) | 5.19 |

* ความเข้มข้นของโคคลิฟิแนค

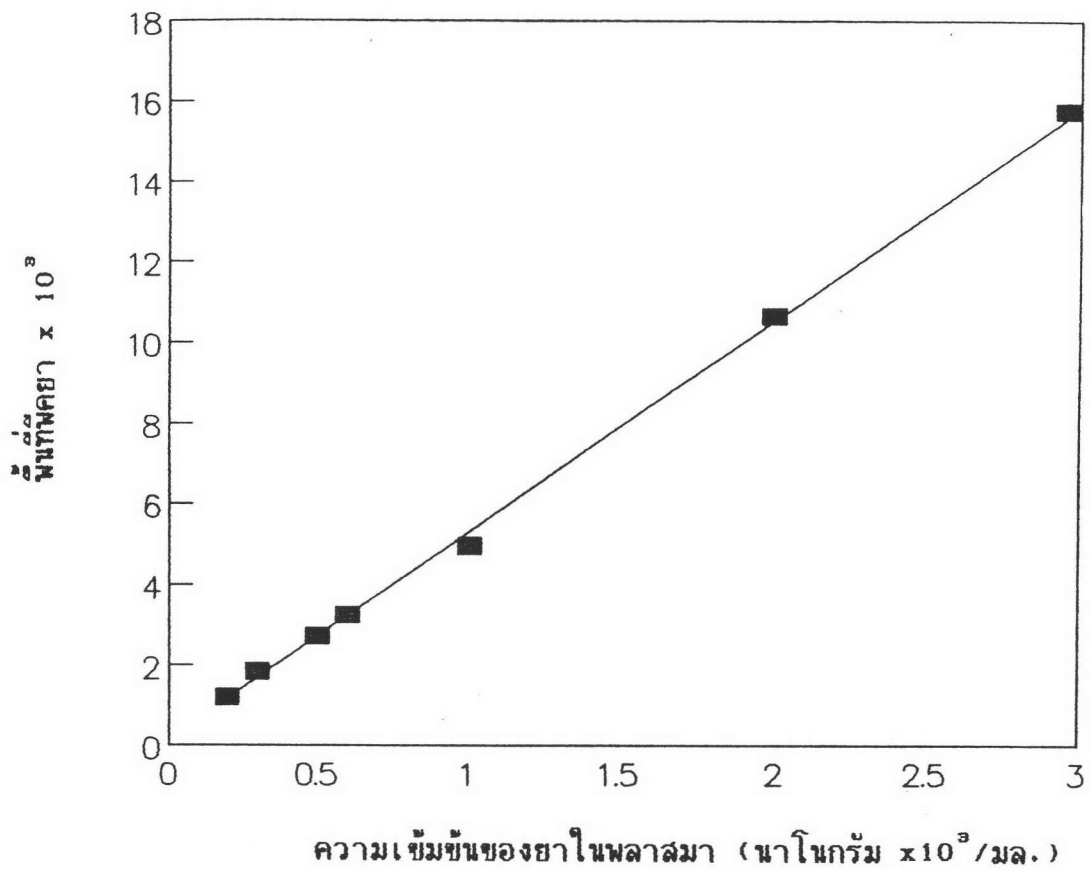
ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาโคโคฟีแนคในพลาสติก เมื่อใช้เมทานอล
เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน (physical recovery;n=6)

| ก. พื้นที่พิกษา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.3 | 95.22 | 100.63 | 100.39 | 98.46 | 106.33 | 97.09 | 99.69(3.84) | 3.85 |
| 0.6 | 88.85 | 91.30 | 92.90 | 89.61 | 87.99 | 93.76 | 90.74(2.30) | 2.54 |
| 1.0 | 96.13 | 98.40 | 98.21 | 98.02 | 93.99 | 95.00 | 96.62(1.87) | 1.93 |
| 2.0 | 96.01 | 98.03 | 96.10 | 96.38 | 97.25 | 95.47 | 96.54(0.93) | 1.00 |
| 3.0 | 86.24 | 96.31 | 97.82 | 87.91 | 98.19 | 94.87 | 93.56(5.18) | 5.54 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 95.43(4.29) | 4.50 |
| ข. ความสูงพิกษา(มม.) | | | | | | | | |
| 0.3 | 100.69 | 100.93 | 100.93 | 97.34 | 100.09 | 99.07 | 99.84(1.41) | 1.42 |
| 0.6 | 100.71 | 100.97 | 95.67 | 100.46 | 94.04 | 99.05 | 98.48(2.93) | 2.98 |
| 1.0 | 100.77 | 100.91 | 100.65 | 101.47 | 95.65 | 100.00 | 99.91(2.14) | 2.14 |
| 2.0 | 100.25 | 100.44 | 100.91 | 101.01 | 100.37 | 100.24 | 100.54(0.34) | 0.34 |
| 3.0 | 97.22 | 100.36 | 100.32 | 100.60 | 99.80 | 99.90 | 99.70(1.25) | 1.26 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 99.69(1.84) | 1.84 |

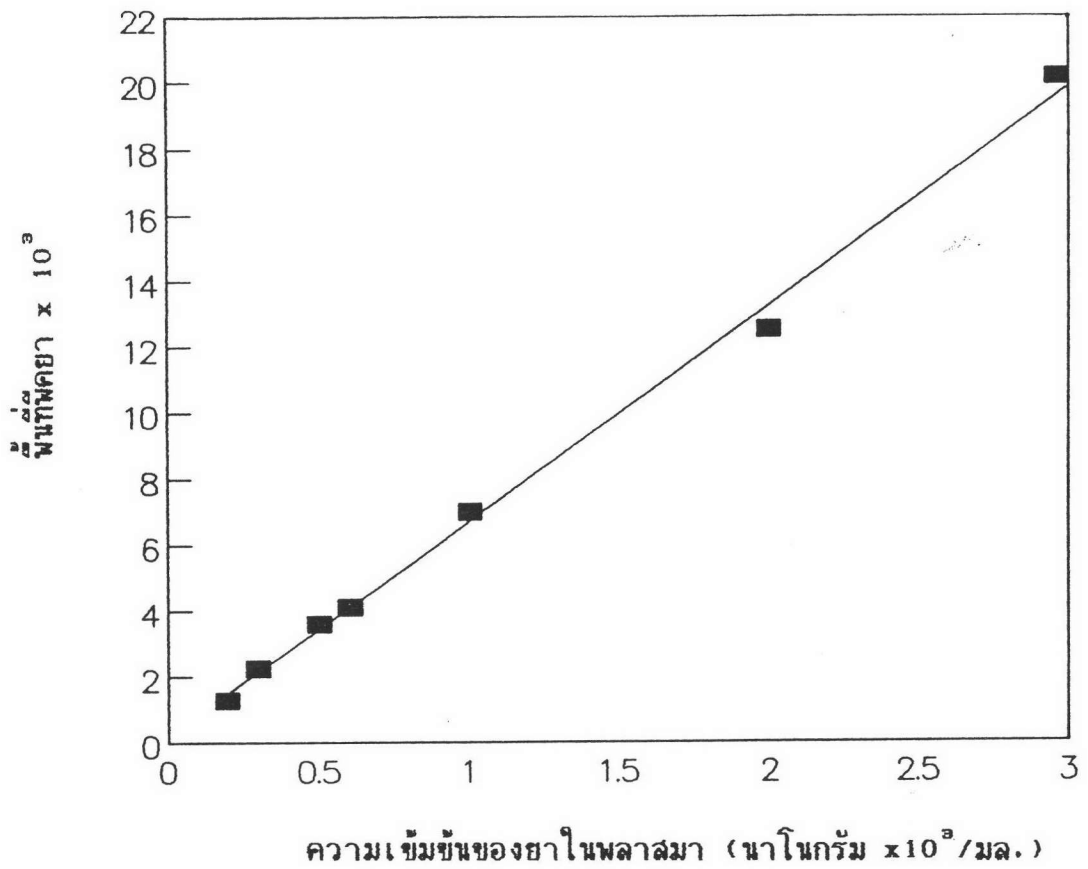
* ความเข้มข้นของโคโคฟีแนค

ตารางที่ 13 สรุปการวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของยาไดโคลฟีแนค

| | | CH ₃ CN | CH ₃ OH |
|---------------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| Appearance | | pass | pass |
| Chromatogram | | pass | pass |
| %Physical Recovery (n=30) | | pass | pass |
| -peak area | \bar{X} (SD) | 94.04(4.40) | 95.43(4.29) |
| | %CV | 4.68 | 4.50 |
| -peak height | \bar{X} (SD) | 97.49(5.06) | 99.69(1.84) |
| | %CV | 5.19 | 1.84 |



- รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของยาไดโคลิโนแลค ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอสिटโนไตรล์ สมการเส้นตรง คือ $Y = 5.2090X + 113.9136$
 $r^2 = 0.99903$



รูปที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ที่ฟิคยาไดโคลฟีแนค กับความเข้มข้นของยาไดโคลฟีแนค ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล
สมการเส้นตรง คือ $Y = 6.5343X + 173.1743$
 $r^2 = 0.99706$

ตารางที่ 14 ค่าอัตราส่วน S/N ของการวิเคราะห์ไดโคลฟีแนคในพลาสติก
เมื่อใช้แอสซีไดไนโตรส* และเมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน

| S/N ratio | |
|--|--|
| แอสซีไดไนโตรส* | เมทานอล** |
| 2.42 | 2.86 |
| 2.24 | 2.88 |
| 2.24 | 3.12 |
| 2.19 | 2.78 |
| 2.25 | 2.83 |
| 2.16 | 2.84 |
| 2.22 | 2.90 |
| 2.49 | 2.92 |
| 2.23 | 2.60 |
| 2.68 | 2.77 |
| $\bar{X}(SD)=2.31(0.16)$ %CV = 7.15 | $\bar{X}(SD)=2.85(0.13)$ %CV = 4.61 |

* ความเข้มข้นของไดโคลฟีแนค = 0.2 มคก./มล.

**ความเข้มข้นของไดโคลฟีแนค = 0.2 มคก./มล.

ในตารางที่ 15 และ 16 ตามลำดับ จะเห็นว่า ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน และระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.2-3.0 มก./มล. พลาสมา มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 1.12-4.08% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 0.23-9.21% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 6.81-9.87 และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 5.92-9.88% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยาโคโคลพิแนคในพลาสมาโดยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอสีโตไนโตรสรีนี้ แม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

สำหรับการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน ของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาคือ 0.2-3.0 มก./มล. พลาสมา ดังแสดงในตารางที่ 17 และ 18 มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 1.02-8.18% และ %CV ของพื้นที่พีคที่อยู่ในช่วง 1.48-9.15% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 2.28-9.85% และ %CV ของพื้นที่พีค 2.30-8.86% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยาโคโคลพิแนคในพลาสมาวิธีนี้ แม้จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

6) ปริมาณต่ำสุดของตัวยาในตัวอย่างพลาสมาที่

สามารถวิเคราะห์ได้

จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.2-3.0 มก./มล. พลาสมา สำหรับความเข้มข้น 0.2 มก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์นั้น ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกัน และระหว่างวัน = 9.21 และ 6.56% ตามลำดับ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคและให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 4.08 และ 9.03% ตามลำดับ เมื่อคำนวณ

ตารางที่ 15 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาโคโคลฟีแนคในพลาสมา
 ภายในวันเดียวกัน เมื่อใช้แอซีไดนาโตรสเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
 (within-run precision;n=3)

| ก. พื้นที่ผิวยา | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.2 | 1632 | 1446 | 1366 | 1481.3(136.5) | 9.21 |
| 0.3 | 2210 | 1975 | 2188 | 2124.3(129.8) | 6.11 |
| 0.6 | 3638 | 3844 | 3899 | 3793.7(137.6) | 3.63 |
| 1.0 | 6440 | 6203 | 5927 | 6190.0(256.7) | 4.15 |
| 2.0 | 12232 | 12206 | 12175 | 12204.3(28.5) | 0.23 |
| 3.0 | 18276 | 18407 | 18517 | 18400.0(120.7) | 0.66 |
| ข. ความสูงผิวยา(มม.) | | | | | |
| 0.2 | 7.4 | 6.9 | 6.9 | 7.07(0.29) | 4.08 |
| 0.3 | 10.8 | 11.1 | 10.4 | 10.77(0.35) | 3.26 |
| 0.6 | 19.3 | 19.7 | 20.8 | 19.93(0.78) | 3.90 |
| 1.0 | 32.7 | 32.1 | 31.1 | 31.97(0.81) | 2.53 |
| 2.0 | 64.2 | 62.9 | 62.9 | 63.33(0.75) | 1.18 |
| 3.0 | 93.6 | 95.2 | 95.6 | 94.80(1.06) | 1.12 |

* ความเข้มข้นของโคโคลฟีแนค

ตารางที่ 16 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาโคคลิฟิแนคในพลาสมา ระหว่างวัน
เมื่อใช้แอซีโตไนโตรัสเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่ฟิคยา | | | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.2 | 1431 | 1394 | 1386 | 1598 | 1366 | 1435.0(94.1) | 6.56 |
| 0.3 | 1908 | 1903 | 1938 | 2202 | 2188 | 2027.8(153.3) | 7.56 |
| 0.6 | 3875 | 3362 | 3789 | 3899 | 3839 | 3752.8(222.4) | 5.92 |
| 1.0 | 6458 | 5939 | 4886 | 5985 | 5929 | 5839.4(576.8) | 9.88 |
| 2.0 | 10200 | 11850 | 9758 | 11573 | 12175 | 11111.2(1066.8) | 9.60 |
| 3.0 | 15007 | 17226 | 15384 | 17282 | 18517 | 16683.2(1458.9) | 8.84 |
| ข. ความสูงฟิคยา(มม.) | | | | | | | |
| 0.2 | 7.0 | 6.7 | 6.3 | 8.0 | 6.9 | 6.98(0.63) | 9.03 |
| 0.3 | 9.6 | 8.8 | 8.9 | 9.5 | 10.4 | 9.44(0.64) | 6.81 |
| 0.6 | 19.4 | 19.0 | 18.9 | 21.0 | 20.8 | 19.82(1.00) | 5.08 |
| 1.0 | 33.8 | 31.8 | 30.0 | 31.1 | 31.1 | 31.56(1.41) | 4.46 |
| 2.0 | 51.7 | 61.9 | 51.0 | 59.5 | 62.9 | 57.40(5.66) | 9.87 |
| 3.0 | 78.1 | 82.0 | 78.4 | 87.5 | 95.6 | 84.32(7.36) | 8.72 |

* ความเข้มข้นของโคคลิฟิแนค

ตารางที่ 17 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาโคโคลฟีแนคในพลาสมา
 ภายในวันเดียวกัน เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
 (within-run precision;n=3)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.2 | 1234 | 1295 | 1469 | 1332.7(121.9) | 9.15 |
| 0.3 | 1734 | 1996 | 1781 | 1837.0(139.7) | 7.60 |
| 0.6 | 3785 | 3716 | 4007 | 3836.0(152.0) | 3.96 |
| 1.0 | 6532 | 6700 | 5855 | 6362.3(447.3) | 7.03 |
| 2.0 | 12971 | 12835 | 12551 | 12785.7(214.3) | 1.68 |
| 3.0 | 18462 | 18789 | 19012 | 18754.3(276.6) | 1.48 |
| ข. ความสูงพีคยา (มม.) | | | | | |
| 0.2 | 8.9 | 8.5 | 8.3 | 8.57(0.30) | 3.57 |
| 0.3 | 10.8 | 12.2 | 11.0 | 11.33(0.76) | 6.68 |
| 0.6 | 21.2 | 22.9 | 21.8 | 21.97(0.86) | 3.92 |
| 1.0 | 34.0 | 35.9 | 30.5 | 33.47(2.74) | 8.18 |
| 2.0 | 68.8 | 68.8 | 67.4 | 68.33(0.81) | 1.18 |
| 3.0 | 98.0 | 99.7 | 99.8 | 99.17(1.01) | 1.02 |

* ความเข้มข้นของโคโคลฟีแนค

ตารางที่ 18 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาโคโคลฟีแนคในพลาสมา ระหว่างวัน
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่พิกิตยา | | | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.2 | 1270 | 1543 | 1346 | 1355 | 1234 | 1349.6(119.5) | 8.86 |
| 0.3 | 1752 | 1710 | 1874 | 1865 | 1738 | 1787.8(76.2) | 4.26 |
| 0.6 | 3864 | 4129 | 3599 | 3746 | 3785 | 3824.6(195.5) | 5.11 |
| 1.0 | 6303 | 6697 | 6622 | 6481 | 6532 | 6527.0(150.2) | 2.30 |
| 2.0 | 12985 | 12857 | 12458 | 12343 | 12971 | 12722.8(301.1) | 2.37 |
| 3.0 | 19347 | 19371 | 18410 | 19098 | 18462 | 18937.6(470.6) | 2.48 |
| ข. ความสูงพิกิตยา(มม.) | | | | | | | |
| 0.2 | 9.5 | 7.5 | 9.7 | 8.6 | 8.9 | 8.84(0.87) | 9.85 |
| 0.3 | 13.0 | 10.7 | 12.4 | 10.8 | 10.8 | 11.54(1.08) | 9.36 |
| 0.6 | 21.9 | 21.6 | 20.6 | 21.6 | 21.2 | 21.38(0.50) | 2.35 |
| 1.0 | 36.1 | 37.0 | 35.9 | 34.3 | 34.0 | 35.46(1.27) | 3.58 |
| 2.0 | 70.8 | 68.4 | 68.7 | 66.4 | 68.8 | 68.62(1.56) | 2.28 |
| 3.0 | 103.0 | 104.0 | 99.0 | 100.9 | 98.0 | 100.98(2.55) | 2.52 |

* ความเข้มข้นของโคโคลฟีแนค

โดยใช้ความสูงพีค สำหรับการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอสีโตไนโตรส ดังนั้น จึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยาโคโคลพิแนค 0.2 มคก./มล. เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย

สำหรับการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล ผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.2-3.0 มคก./มล. พลาสมา สำหรับความเข้มข้น 0.2 มคก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์นั้น ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกัน และระหว่างวัน = 9.15 และ 8.86% ตามลำดับ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคและให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 3.57 และ 9.85% ตามลำดับ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีคยา ดังนั้นจึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยาโคโคลพิแนค 0.2 มคก./มล. พลาสมา เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย

7) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมิน (จากขั้นตอนที่ 4) มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาที่รับมาจำนวน 9 ตัวอย่าง คือ ที่ความเข้มข้น 0.3, 1.0 และ 3.0 มคก./มล. (ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% Analytical recovery) ดังแสดงในตารางที่ 19 และ 20 พบว่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่แยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอสีโตไนโตรสและเมทานอลในความเข้มข้นที่แตกต่างกันก็ให้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ = $99.33 \pm 0.89\%$ และ $98.70 \pm 1.31\%$ ตามลำดับ ซึ่งเป็นเครื่องยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยาโคโคลพิแนค ได้ถูกต้องแม่นยำจริง ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา

ตารางที่ 19 เปรอ์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยาไดโคลฟีแนคในพลาสมา
เมื่อใช้แอซีไตนาไครล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสมา (นาโนกรัม/มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัม/มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|--|---|---|
| 300 | 293.0 | 97.67 |
| 300 | 298.1 | 99.37 |
| 300 | 296.9 | 98.97 |
| 1000 | 1006.4 | 100.64 |
| 1000 | 990.7 | 99.07 |
| 1000 | 992.1 | 99.21 |
| 3000 | 2974.3 | 99.14 |
| 3000 | 2979.0 | 99.30 |
| 3000 | 3017.0 | 100.57 |
| | | $\bar{X}(SD)=99.33(0.88)$ %CV = 0.89 |

ตารางที่ 20 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยาโคโลฟีแนคในพลาสติก
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสติก (นาโนกรัม/มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัม/มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|---|---|---|
| 300 | 291.1 | 97.03 |
| 300 | 296.0 | 98.67 |
| 300 | 298.6 | 99.53 |
| 1000 | 975.1 | 97.51 |
| 1000 | 1000.0 | 100.00 |
| 1000 | 1005.5 | 100.55 |
| 3000 | 2923.8 | 97.46 |
| 3000 | 2992.9 | 99.76 |
| 3000 | 2934.2 | 97.81 |
| | | $\bar{X}(SD)=98.70(1.30)$ %CV = 1.31 |

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาโคโคลที่แนคในพลาสมา โดยหลักการแยก พลาสมาโปรตีน จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 21

เนื่องจากผลการศึกษาการวิเคราะห์ยาโคโคลที่แนคในพลาสมาในแง่ การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน และ validate วิธีวิเคราะห์นั้น ปรากฏว่าผ่านการประเมินทั้งการใช้ แอซีโตนไทรล์และเมทานอลเป็นสารแยก พลาสมาโปรตีน ดังนั้นเพื่อเป็นการทดสอบความแตกต่างในเชิงสถิติของค่า เเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาจากการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้งสองตัวดังกล่าว ผลจากตารางที่ 11 และ 12 ทั้งเมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พิกษาและความสูงพิกษา จึงทำการเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าว โดยใช้ 2-tailed unpaired student t-test (รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ง) ผลการทดสอบปรากฏว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยา จากการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้งสองตัว เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พิกษา ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95% นั่นคือ ทั้งเมทานอลและแอซีโตนไทรล์สามารถใช้เป็นสาร แยกพลาสมาโปรตีน ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาโคโคลที่แนคในพลาสมา ได้ผลที่ไม่ต่างกัน และเมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพิกษา มีความแตกต่างกันอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นั่นคือ การใช้เมทานอลและ แอซีโตนไทรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ในการวิเคราะห์หาปริมาณยา โคโคลที่แนคในพลาสมา ให้ผลที่แตกต่างกัน โดยการใช้เมทานอลเป็นสารแยก พลาสมาโปรตีน ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาที่ดีกว่าการใช้แอซีโตนไทรล์

ตารางที่ 21 สรุปการvalidateวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาโคโคฟีแนคโดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน

| | conc. ($\mu\text{g/ml}$) | CH_3CN | CH_3OH |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| <u>%Phy.Reco.</u> (n=30) | 0.3-3.0 | | |
| -peak area \bar{X} (SD) | | 94.04(4.40) | 95.43(4.29) |
| %CV | | 4.68 | 4.50 |
| -peak height \bar{X} (SD) | | 97.49(5.06) | 99.69(1.84) |
| %CV | | 5.19 | 1.84 |
| <u>Linearity</u> | 0.2-3.0 | | |
| Eq. Y= | | 113.9137+5.2090X | 173.1743+6.5343X |
| r^2 | | 0.99903 | 0.99706 |
| <u>Specificity</u> | | | |
| <u>LLD</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.2 | 0.2 |
| <u>Precision</u> %CV | 0.2-3.0 | | |
| -within-run (n=3) | | | |
| peak area | | 0.23-9.21 | 1.48-9.15 |
| peak height | | 1.12-4.08 | 1.02-8.18 |
| -between-run (n=5) | | | |
| peak area | | 5.92-9.88 | 2.30-8.86 |
| peak height | | 4.46-9.87 | 2.28-9.85 |
| <u>LLQ</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.2 | 0.2 |
| <u>%Anal.Reco.</u> (n=9) | | | |
| \bar{X} (SD) | | 99.33(0.88) | 98.70(1.30) |
| %CV | | 0.89 | 1.31 |

3.3 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ยาไตรโคลอกซาซิลิน เชนเดียวใน

พลาสมา

3.3.ก การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน

1) ลักษณะตัวอย่างพลาสมาหลังเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนลงในตัวอย่างพลาสมา

ก) เมื่อใช้แอสีโตไนโตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสมาโปรตีนจับกันแน่น เป็นก้อนขนาดใหญ่สีเหลืองอมส้ม เกาะติดที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณน้อย ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่า

- สารละลายใสที่แยกออกมาเป็นสีเหลือง มีความใสสะอาด มีปริมาณมาก มี pH ประมาณ 7

ข) เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสมาโปรตีน เป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อน จับกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณมาก ผิวหน้าตะกอนฟุ้งกระจายเล็กน้อย เมื่อเขย่าอย่างแรง

- สารละลายใสที่แยกออกมา เป็นสีเหลืองอ่อน มีความใสสะอาด มีปริมาณประมาณ 2.5 เท่า ของปริมาณตะกอน มี pH ประมาณ 7

2) ลักษณะโครมาโทแกรม

ก) เมื่อใช้แอสีโตไนโตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

พิกของยาบนโครมาโทแกรมแยกเป็นหลายพีก ไม่เป็นพีกเดี่ยว ดังแสดงในรูปที่ 11 ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะของโบบายเฟส

ที่ไม่เหมาะสม ทำให้ค่าความแรงของโอบายเฟสน้อยกว่าตัวทาละลายในตัวอย่างพลาสติก ซึ่งในที่นี้คือ แอซีไตนไตรล์ เป็นผลให้ได้พีคของยาบนโครมาโทแกรมในลักษณะเช่นนี้ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้จึงไม่ผ่านเกณฑ์การประเมิน

ข) เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสติก
โพรตีน

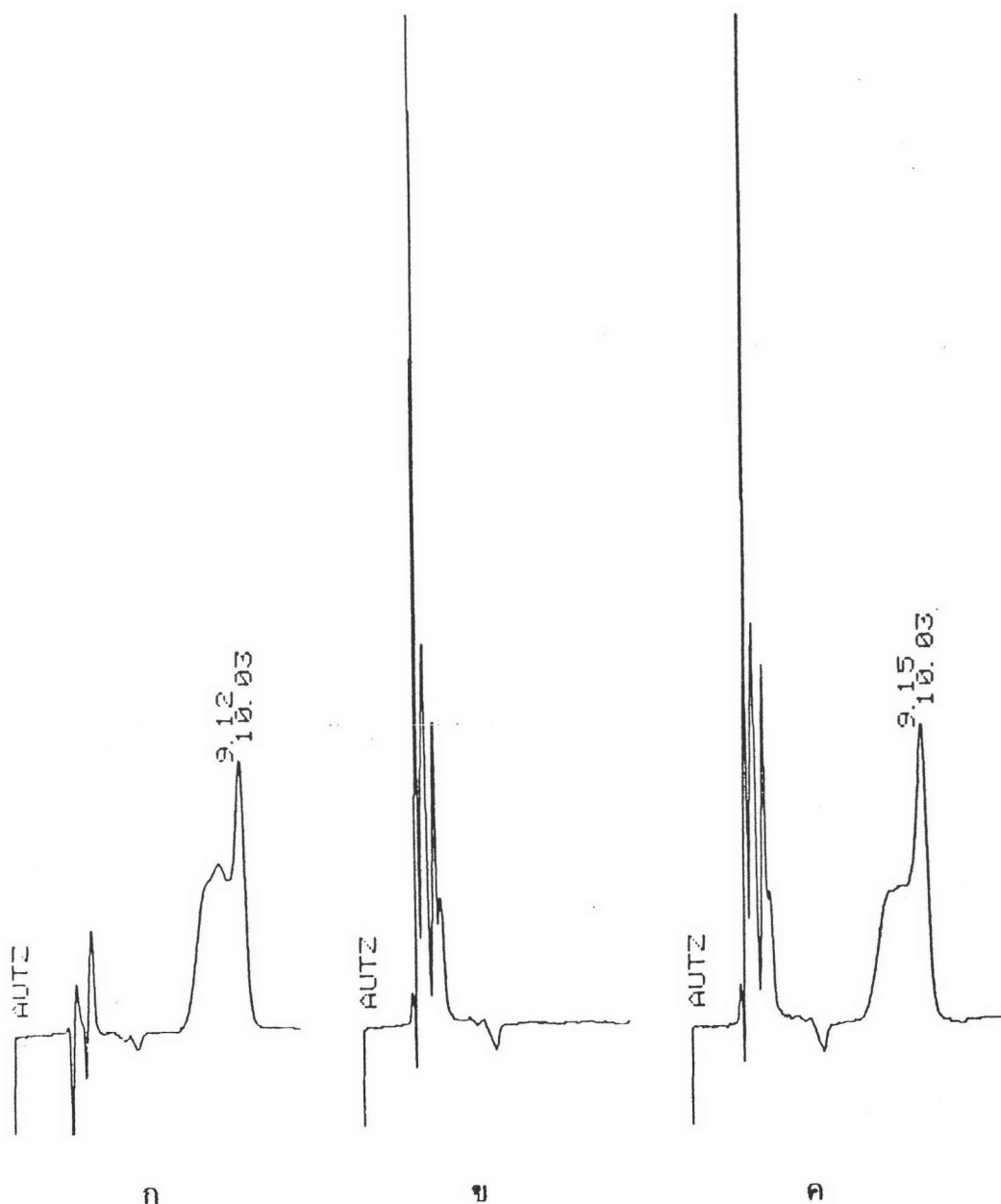
จากโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสติกและ

ตัวอย่างพลาสติก จะเห็นว่าพีคของยาบนโครมาโทแกรม ปรากฏเป็นพีคเดี่ยวและไม่ถูกรบกวนจากพีคของ endogenous ซึ่งมีขนาดใหญ่ เนื่องจากพีคของ endogenous ถูกชะออกมาได้หมดก่อนพีคยา ดังแสดงในรูปที่ 12 พิจารณาจากพีคของยาไดคลอกซาซิลิน โซเดียม เมื่ออยู่ในพลาสติก และเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐานของสารแยกพลาสติกโพรตีนชนิดเดียวกัน จะเห็นว่ามิลักษณะเหมือนกันและมีค่าเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ที่ใกล้เคียงกันมาก (ไดคลอกซาซิลิน โซเดียม = 10.09 นาที และ 10.16 นาที เมื่ออยู่ในพลาสติก และสารละลายมาตรฐานตามลำดับ) เป็นการแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

ดังนั้น การทดลองขั้นต่อไปในการวิเคราะห์ยาไดคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสติกจะใช้เมทานอล เพียงอย่างเดียวเป็นสารแยกพลาสติกโพรตีน

3) เปรี่เซนต์การคืนกลับของยา

ผลการทดลองหาเปอร์เซนต์การคืนกลับของยาในพลาสติก เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโพรตีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีค่า = $97.24 \pm 4.61\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า = $93.65 \pm 5.70\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของพีคยาโดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก ดังแสดงในตารางที่ 22



รูปที่ 11

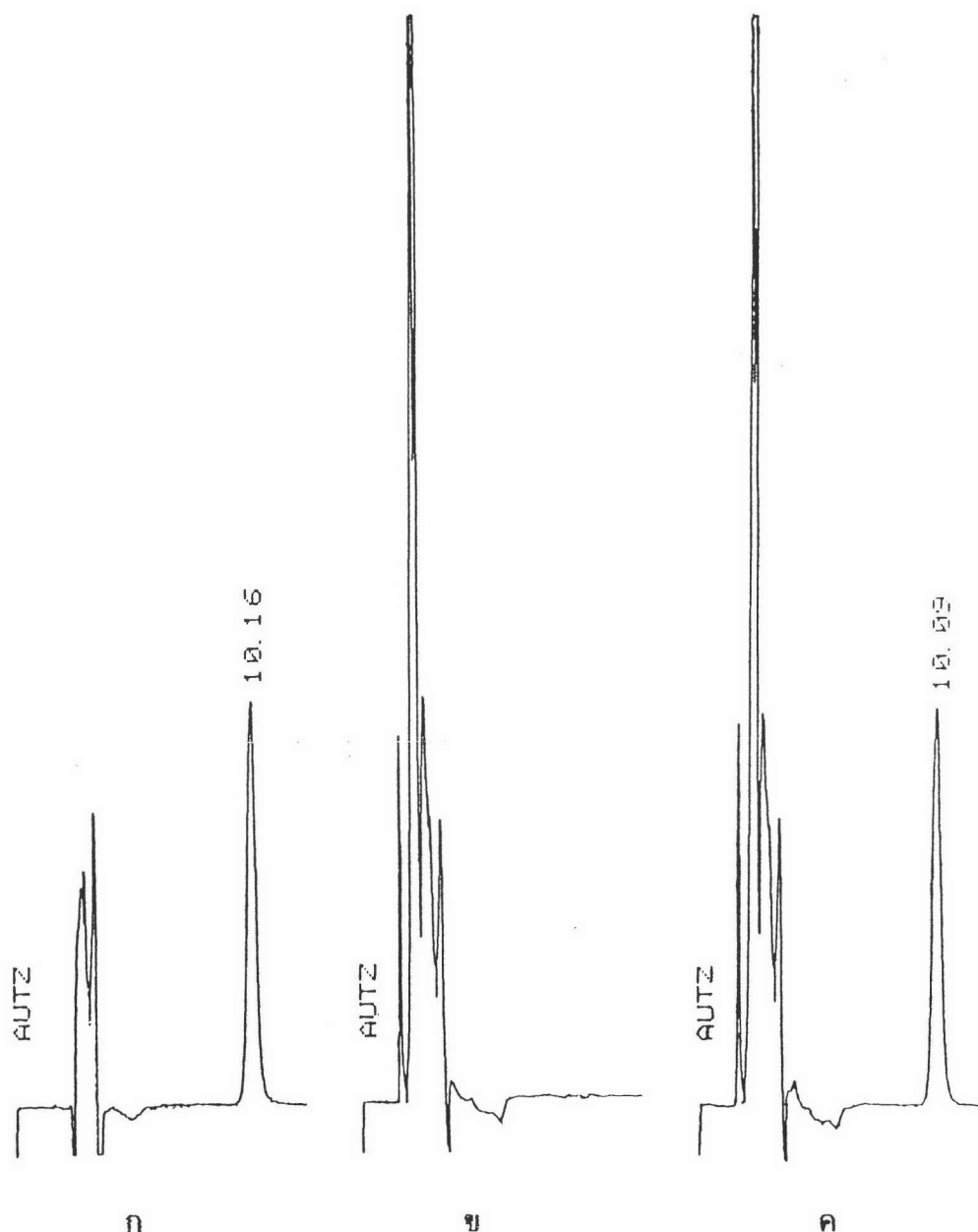
โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณยาไดคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมา
เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอสिटโนไตรล โดยเทคนิค HPLC

ก. เป็นโครมาโทแกรมของยาไดคลอกซาซิลิน โซเดียมในสารละลายมาตรฐาน

ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลนด์พลาสมา

ค. เป็นโครมาโทแกรมของยาไดคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมา

ความเข้มข้น 48.0 มก./มล. (ใช้แอนเทนนูเอชั่น 2^5)



รูปที่ 12 โคโรมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาไดคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล โดยเทคนิค HPLC

ก. เป็นโคโรมาโทแกรมของยาไดคลอกซาซิลิน โซเดียมในสารละลายมาตรฐาน

ข. เป็นโคโรมาโทแกรมของแบลนด์พลาสมา

ค. เป็นโคโรมาโทแกรมของยาไดคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมา

ความเข้มข้น 48.0 มก./มล. (ใช้แอนเทนนูเอชั่น 2^5)

ตารางที่ 22 เปรี่เซนต์การคืนกลับของยาโคคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมาเมื่อใช้เมทานอล
เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (physical recovery;n=6)

| ก. พื้นที่พิกษา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 1.2 | 96.39 | 97.02 | 99.71 | 100.44 | 103.88 | 96.45 | 98.98(2.95) | 2.98 |
| 4.8 | 104.68 | 96.62 | 100.87 | 94.48 | 100.80 | 93.57 | 98.50(4.32) | 4.38 |
| 12.0 | 101.98 | 103.07 | 102.94 | 99.48 | 96.60 | 96.78 | 100.14(2.97) | 2.96 |
| 24.0 | 86.36 | 87.98 | 91.12 | 96.20 | 93.06 | 91.50 | 91.04(3.53) | 3.87 |
| 48.0 | 99.34 | 99.28 | 98.92 | 97.89 | 96.80 | 92.96 | 97.53(2.44) | 2.50 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 97.24(4.48) | 4.61 |
| ข. ความสูงพิกษา(มม.) | | | | | | | | |
| 1.2 | 84.38 | 87.10 | 96.67 | 93.55 | 103.33 | 86.67 | 91.95(7.25) | 7.89 |
| 4.8 | 99.16 | 93.22 | 95.80 | 91.30 | 96.49 | 92.37 | 94.72(2.95) | 3.11 |
| 12.0 | 101.17 | 99.22 | 100.00 | 96.80 | 94.96 | 98.05 | 98.37(2.25) | 2.29 |
| 24.0 | 85.42 | 83.36 | 86.32 | 92.31 | 89.77 | 87.87 | 87.51(3.20) | 3.66 |
| 48.0 | 96.78 | 96.10 | 98.18 | 95.73 | 96.75 | 90.75 | 95.72(2.57) | 2.69 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 93.65(5.34) | 5.70 |

* ความเข้มข้นของโคคลอกซาซิลิน โซเดียม

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการแยก
 พลาสมาโปรตีนของตัวอย่างพลาสมาของยาโคคลอกซาซิลิน โซเดียม จึงทำการ
 รวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 23

3.3.ข การ validate วิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ยาโคคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมา
 ที่ผ่านการประเมินผลการแยกพลาสมาโปรตีน เป็นการใช่มะทานอล เพียง
 อย่างเดียวในการแยกพลาสมาโปรตีน

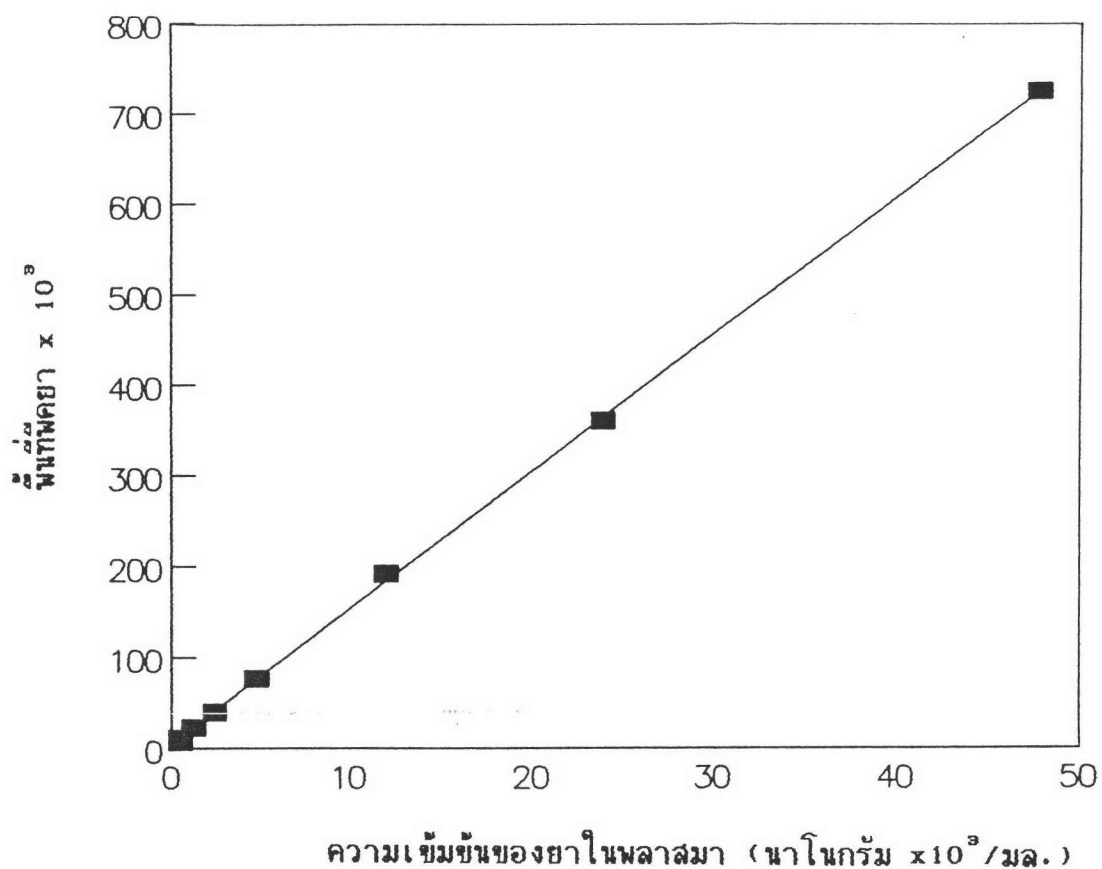
1) การศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสาร
 แสดงในทอมของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยา
 ดังรายละเอียดในข้อ 3.3.ก.3)

2) ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่พีคยา
 กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา

ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคยากับโคคลอกซาซิลิน
 โซเดียม กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา เมื่อใช้มะทานอลเป็นสารแยกพลาสมา
 โปรตีนที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.12 - 48.0
 มคก./มล.พลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 13 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้
 Linear regression คือ

$$Y = 4478.1655 + 15.0055 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่พีคยาโคคลอกซาซิลิน โซเดียม และ X เป็นความเข้มข้นของ
 ยาโคคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมา (นาโนกรัม/มล.พลาสมา) และสัมประสิทธิ์
 การตัดสินใจ (r^2) = 0.99984



รูปที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผืนยาไดคลอกซาซาลิน โซเดียม กับความเข้มข้นของยาไดคลอกซาซาลิน โซเดียม ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล
สมการเส้นตรง คือ $Y = 15.0055X + 4478.1655$
 $r^2 = 0.99984$

3) ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์พิจารณาจากโครมาโทแกรมดังรูปที่ 12 แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาไดคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมา โดยใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนมีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังรายละเอียดในข้อ 3.3.ก.2) ข)

4) การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์

จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยาไดคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมาที่ให้อัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 คือ 0.12 มคก./มล. พลาสมา (S/N ratio = 5.03 ± 0.36 ; %CV = 7.22 %) ดังแสดงในตารางที่ 24

5) ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน ดังแสดงในตารางที่ 25 และ 26 ตามลำดับ จะเห็นว่า ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.12-48.0 มคก./มล. พลาสมา มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 0.38-5.97% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 0.60-6.98% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 0.85-8.60% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 0.88-8.83% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยาไดคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมาโดยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลนี้ แม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันหรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

6) ปริมาณต่ำสุดของตัวยาในตัวอย่างพลาสมาที่

สามารถวิเคราะห์ได้

จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.12-48.0 มคก./มล. พลาสมา สำหรับความเข้มข้น 0.12 มคก./มล. ซึ่งเป็น

ตารางที่ 24 ค่าอัตราส่วน S/N ของการวิเคราะห์โคคลอกซาซาลิน โซเดียม
ในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

| S/N ratio |
|--------------------------|
| 5.54 |
| 5.18 |
| 5.36 |
| 4.82 |
| 4.86 |
| 5.00 |
| 4.54 |
| 4.61 |
| 4.82 |
| 5.54 |
| $\bar{X}(SD)=5.03(0.36)$ |
| %CV = 7.22 |

ความเข้มข้นของโคคลอกซาซาลิน โซเดียม = 0.12 มคก./มล.

ตารางที่ 25 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาโคคลอกซาซอลในไซเดียม
ในพลาสมาภายในวันเดียวกันเมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(within-run precision ; n=3)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.12 | 4490 | 5077 | 4530 | 4699.0(328.0) | 6.98 |
| 1.2 | 20444 | 20036 | 21483 | 20654.3(746.1) | 3.61 |
| 4.8 | 78773 | 79009 | 81048 | 79610.0(1250.9) | 1.57 |
| 12.0 | 188186 | 190211 | 190108 | 189501.7(1140.6) | 0.60 |
| 24.0 | 387417 | 406490 | 394993 | 396300.0(9603.4) | 2.42 |
| 48.0 | 772631 | 786589 | 786112 | 781777.3(7924.5) | 1.01 |
| ข. ความสูงพีคยา(มม.) | | | | | |
| 0.12 | 0.9 | 1.0 | 1.0 | 0.97(0.06) | 5.97 |
| 1.2 | 3.6 | 3.7 | 3.8 | 3.70(0.10) | 2.70 |
| 4.8 | 12.6 | 12.9 | 13.0 | 12.83(0.21) | 1.62 |
| 12.0 | 30.0 | 30.0 | 30.2 | 30.07(0.12) | 0.38 |
| 24.0 | 60.8 | 63.3 | 61.4 | 61.83(1.30) | 2.11 |
| 48.0 | 119.0 | 120.8 | 121.8 | 120.53(1.42) | 1.18 |

* ความเข้มข้นของโคคลอกซาซอลในไซเดียม

ตารางที่ 26 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาโคคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสมาระหว่างวัน
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{x} (SD) | %CV |
| 0.12 | 4431 | 4231 | 4901 | 5268 | 4530 | 4672.2(412.4) | 8.83 |
| 1.2 | 22973 | 22997 | 23345 | 23620 | 21483 | 22883.6(827.3) | 3.62 |
| 4.8 | 78921 | 85165 | 80426 | 82978 | 81048 | 81707.6(2419.2) | 2.96 |
| 12.0 | 190622 | 185259 | 189778 | 185973 | 190108 | 188348.0(2524.7) | 1.34 |
| 24.0 | 363087 | 374296 | 365017 | 374544 | 394993 | 374387.4(12650.4) | 3.38 |
| 48.0 | 789297 | 775229 | 790773 | 778058 | 786112 | 783893.8(6902.4) | 0.88 |
| ข. ความสูงพีคยา(มม.) | | | | | | | |
| 0.12 | 1.2 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.04(0.09) | 8.60 |
| 1.2 | 3.7 | 3.8 | 4.0 | 4.0 | 3.8 | 3.86(0.13) | 3.48 |
| 4.8 | 12.8 | 13.7 | 12.7 | 13.4 | 13.0 | 13.12(0.42) | 3.21 |
| 12.0 | 29.8 | 29.0 | 29.5 | 29.8 | 30.2 | 29.66(0.44) | 1.50 |
| 24.0 | 56.5 | 58.2 | 57.0 | 57.2 | 61.4 | 58.06(1.97) | 3.39 |
| 48.0 | 123.2 | 120.8 | 123.0 | 121.4 | 121.8 | 122.04(1.03) | 0.85 |

* ความเข้มข้นของโคคลอกซาซิลิน โซเดียม

ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์นั้น ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกัน และระหว่างวัน = 6.98 และ 8.83% ตามลำดับ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่ฟิคและให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 5.97 และ 8.60% ตามลำดับ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงฟิค ดังนั้นจึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยาโคคลอกซาซิลิน โซเดียม 0.12 มก./มล. เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย

7) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมิน (จากขั้นตอนที่ 4) มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกที่รับมาจำนวน 9 ตัวอย่าง คือ ที่ความเข้มข้น 4.8, 24.0 และ 48.0 มก./มล. (ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% Analytical recovery) ดังแสดงในตารางที่ 27 พบว่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ก็ให้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ = $95.26 \pm 3.05\%$ ซึ่งเป็นเครื่องยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยาโคคลอกซาซิลิน โซเดียมได้ถูกต้องแม่นยำจริงในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการ

validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาโคคลอกซาซิลิน โซเดียมในพลาสติก โดยหลักการแยกพลาสติกโปรตีน จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 28

ตารางที่ 27 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยาโคคลอกซาซิลิน โซเดียม
ในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสมา (มคก./มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (มคก./มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|--|---|---|
| 4.8 | 4.8 | 100.00 |
| 4.8 | 4.7 | 97.92 |
| 4.8 | 4.5 | 93.75 |
| 24.0 | 23.5 | 97.92 |
| 24.0 | 21.9 | 91.25 |
| 24.0 | 22.9 | 95.42 |
| 48.0 | 45.4 | 94.58 |
| 48.0 | 45.4 | 94.58 |
| 48.0 | 44.1 | 91.88 |
| | | $\bar{X}(SD)=95.26(2.90)$ %CV = 3.05 |

ตารางที่ 28 สรุปการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาโคคลอกซาซิลิน โซเดียม
โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน

| | conc. ($\mu\text{g/ml}$) | CH_3OH |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| <u>%Phy.Reco.</u> (n=30) | 1.2-84.0 | |
| -peak area \bar{X} (SD) | | 97.24(4.48) |
| %CV | | 4.61 |
| -peak height \bar{X} (SD) | | 93.65(5.34) |
| %CV | | 5.70 |
| <u>Linearity</u> | 0.12-84.0 | |
| Eq. Y= | | 4478.1655+15.0054X |
| r^2 | | 0.99984 |
| <u>Specificity</u> | | |
| <u>LLD</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.12 |
| <u>Precision</u> %CV | 0.12-84.0 | |
| -within-run (n=3) | | |
| peak area | | 0.60-6.98 |
| peak height | | 0.38-5.97 |
| -between-run (n=5) | | |
| peak area | | 0.88-8.83 |
| peak height | | 0.85-8.60 |
| <u>LLQ</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.12 |
| <u>%Anal.Reco.</u> (n=9) | | |
| \bar{X} (SD) | | 95.26(2.90) |
| %CV | | 3.05 |

3.4 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ยาฟูโรซีไมด์ในพลาสติก

3.4.ก การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสติกมาโปรตีน

- 1) ลักษณะตัวอย่างพลาสติกหลังเติมสารแยกพลาสติกมาโปรตีนลงในตัวอย่างพลาสติก
 - ก) เมื่อใช้แอสซีโตนไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน
 - ลักษณะตะกอนพลาสติกมาโปรตีนจับกันแน่น เป็นก้อนขนาดใหญ่สีเหลืองอมส้มเกาะติดที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณน้อย ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่า
 - สารละลายสีที่แยกออกมาเป็นสีเหลือง มีความใสสะอาด มีปริมาณมาก มี pH ประมาณ 7
 - ข) เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน
 - ลักษณะตะกอนพลาสติกมาโปรตีน เป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อน จับกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณมาก ผิวหน้าตะกอนฟุ้งกระจายเล็กน้อย เมื่อเขย่าอย่างแรง
 - สารละลายสีที่แยกออกมา เป็นสีเหลืองอ่อน มีความใสสะอาด มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่า ของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7
 - 2) ลักษณะโครมาโทแกรม
 - ก) เมื่อใช้แอสซีโตนไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน
 - พีคของยาบนโครมาโทแกรมแยกเป็นหลายพีค ไม่เป็นพีคเดี่ยว ดังแสดงในรูปที่ 14 ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะของโอบายเฟสที่ไม่เหมาะสม ทำให้ค่าความแรงของโอบายเฟสน้อยกว่าตัวทาละลายในตัวอย่างพลาสติก ซึ่งในที่นี้คือ แอสซีโตนไนโตรส เป็นผลให้ได้พีคของยาบนโครมาโทแกรมในลักษณะเช่นนี้ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้จึงไม่ผ่านเกณฑ์การประเมิน

ข) เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสติก
โพรตีน

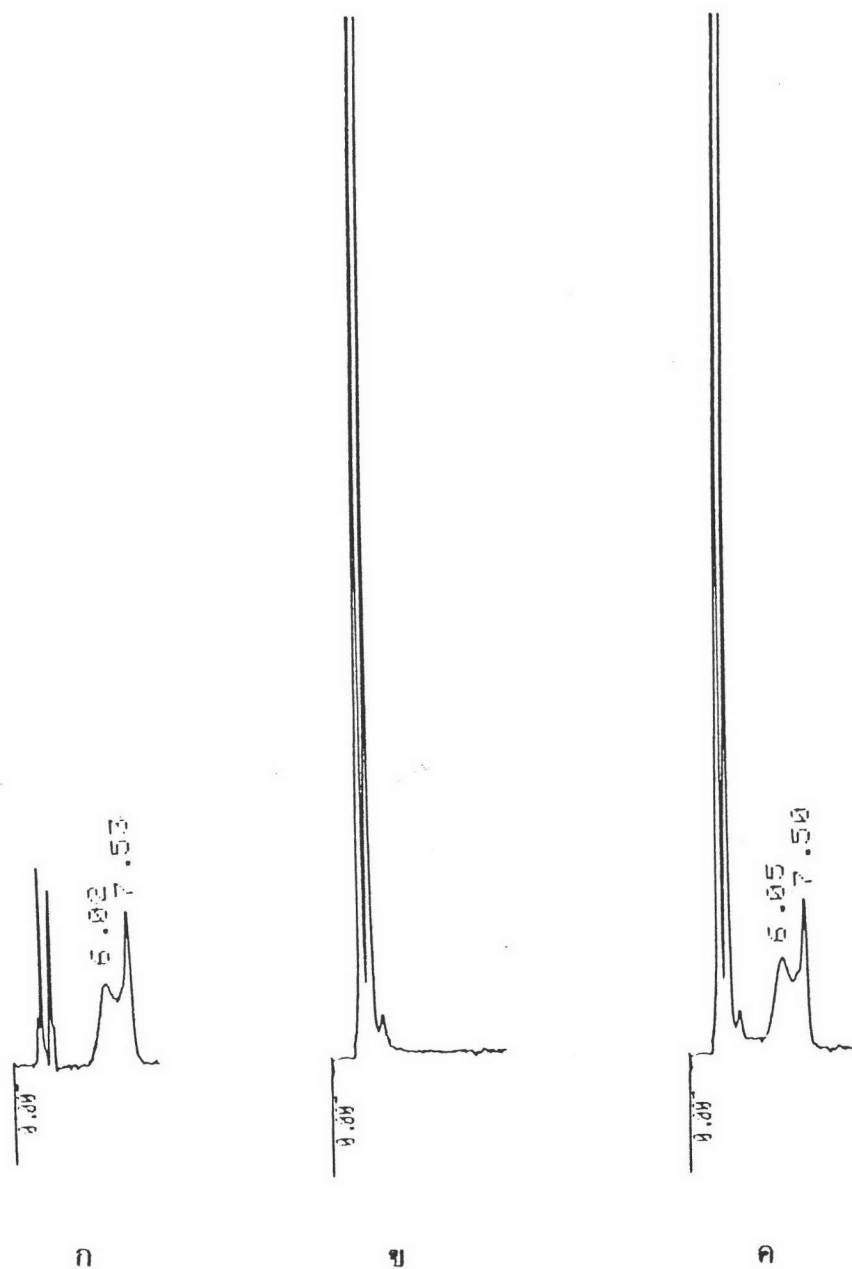
จากโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสติกและ
ตัวอย่างพลาสติก จะเห็นว่าพีคของยาบนโครมาโทแกรม ปรากฏเป็นพีคเดี่ยว
และไม่ถูกรบกวนจากพีคของ endogenous ซึ่งมีขนาดใหญ่ เนื่องจากพีคของ
endogenous ถูกชะออกมาได้หมดก่อนพีคยา ดังแสดงในรูปที่ 15 พิจารณา
จากพีคของยาฟูโรซีไมด์ เมื่ออยู่ในพลาสติก และเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐาน
ของสารแยกพลาสติกโพรตีนชนิดเดียวกัน จะเห็นว่า มีลักษณะเหมือนกัน และมีค่า
เวลาที่รีเทนในคอลัมน์ที่เท่ากัน (ฟูโรซีไมด์ = 7.63 นาที ทั้งเมื่ออยู่ในพลาสติก
และสารละลายมาตรฐาน) เป็นการแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของ
วิธีวิเคราะห์

ดังนั้น การทดลองขั้นต่อไปในการวิเคราะห์
ยาฟูโรซีไมด์ในพลาสติกจะใช้เมทานอล เพียงอย่างเดียว เป็นสารแยกพลาสติก
โพรตีน

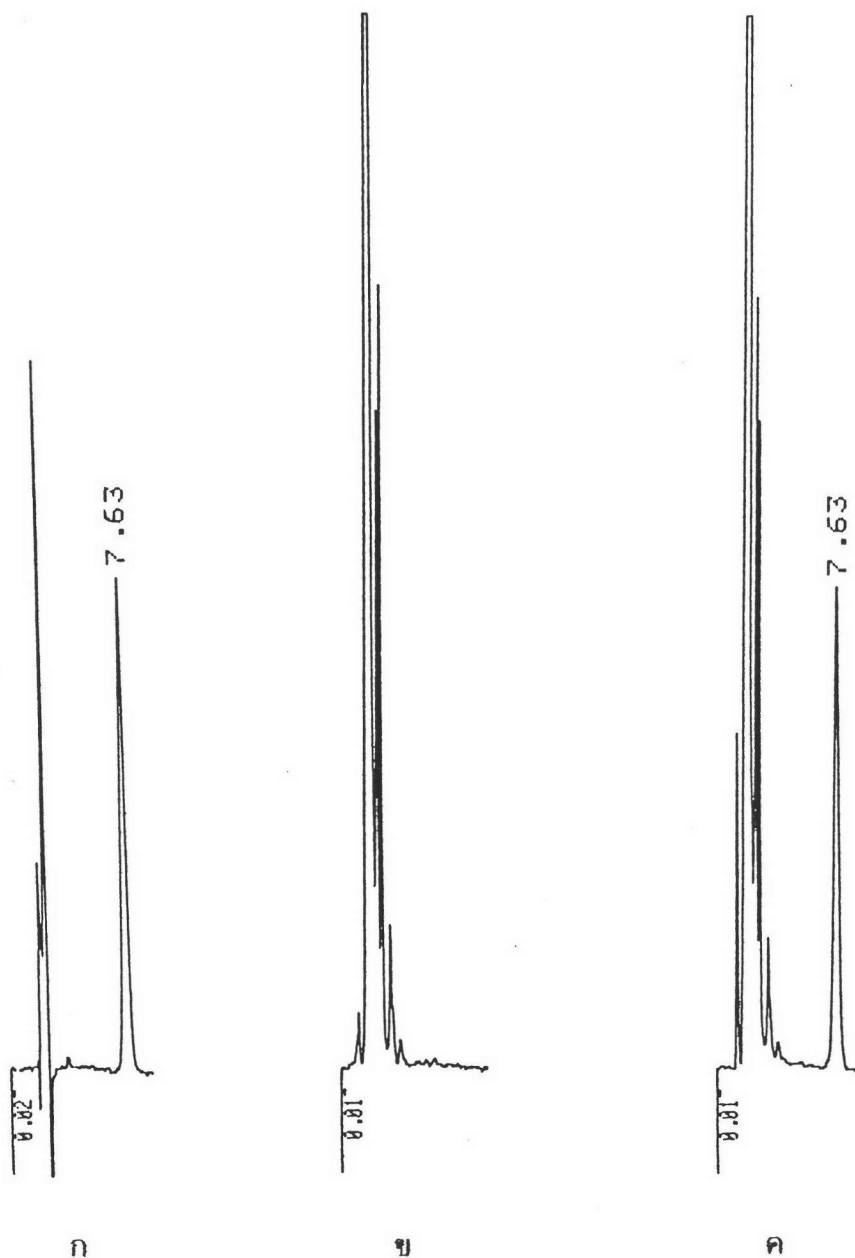
3) เบอร์เซนต์การคืนกลับของยา

ผลการทดลองหาเบอร์เซนต์การคืนกลับของยาใน
พลาสติก เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโพรตีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีค่า
 $= 95.79 \pm 4.16\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า $= 95.88 \pm 5.42\%$
เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของพีคยาโดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก
ดังแสดงในตารางที่ 29

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการแยก
พลาสติกโพรตีนของตัวอย่างพลาสติกของยาฟูโรซีไมด์ จึงทำการรวบรวมและสรุป
ดังแสดงในตารางที่ 30



- รูปที่ 14 โครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณยาฟูโรซีไมด์ ในพลาสมา
เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอสิตไนโตรล์ โดยเทคนิค HPLC
- ก. เป็นโครมาโทแกรมของฟูโรซีไมด์ในสารละลายมาตรฐาน
 - ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลนด์พลาสมา
 - ค. เป็นโครมาโทแกรมของฟูโรซีไมด์ในพลาสมา
- ความเข้มข้น 10.0 มก./มล. (ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^3)



รูปที่ 15 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาฟูโรซีไมด์ ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล โดยเทคนิค HPLC

ก. เป็นโครมาโทแกรมของฟูโรซีไมด์ในสารละลายมาตรฐาน

ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบบลิ่งพลาสมา

ค. เป็นโครมาโทแกรมของฟูโรซีไมด์ในพลาสมา

ความเข้มข้น 10.0 มกค./มล. (ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^3)

ตารางที่ 29 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาฟูโรซีไมด์ในพลาสมาเมื่อใช้เมทานอล
เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (physical recovery; n=6)

| ก. พื้นที่พิกษา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.4 | 99.56 | 89.97 | 88.77 | 88.84 | 95.04 | 92.16 | 92.39(4.24) | 4.59 |
| 1.0 | 104.50 | 100.00 | 95.18 | 94.61 | 92.35 | 90.87 | 96.25(5.10) | 5.30 |
| 2.0 | 97.60 | 101.81 | 99.23 | 95.39 | 98.53 | 97.59 | 98.36(2.13) | 2.16 |
| 4.0 | 96.19 | 89.51 | 97.60 | 97.42 | 102.10 | 98.27 | 96.85(4.12) | 4.25 |
| 10.0 | 97.73 | 92.95 | 96.34 | 92.89 | 93.86 | 97.83 | 95.27(2.31) | 2.43 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 95.79(3.99) | 4.16 |
| ข. ความสูงพิกษา(มม.) | | | | | | | | |
| 0.4 | 100.00 | 93.75 | 82.86 | 90.32 | 93.94 | 100.00 | 93.48(6.45) | 6.90 |
| 1.0 | 98.57 | 100.00 | 90.91 | 97.26 | 93.33 | 97.26 | 96.22(3.42) | 3.56 |
| 2.0 | 106.15 | 102.94 | 100.00 | 91.67 | 99.28 | 103.79 | 100.64(5.06) | 5.03 |
| 4.0 | 98.39 | 89.84 | 93.63 | 95.59 | 104.33 | 89.55 | 95.22(5.60) | 5.88 |
| 10.0 | 96.34 | 90.49 | 94.00 | 91.51 | 93.42 | 97.42 | 93.86(2.68) | 2.86 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 95.88(5.20) | 5.42 |

* ความเข้มข้นของฟูโรซีไมด์

3.4.ข การ validate วิธีวิเคราะห์

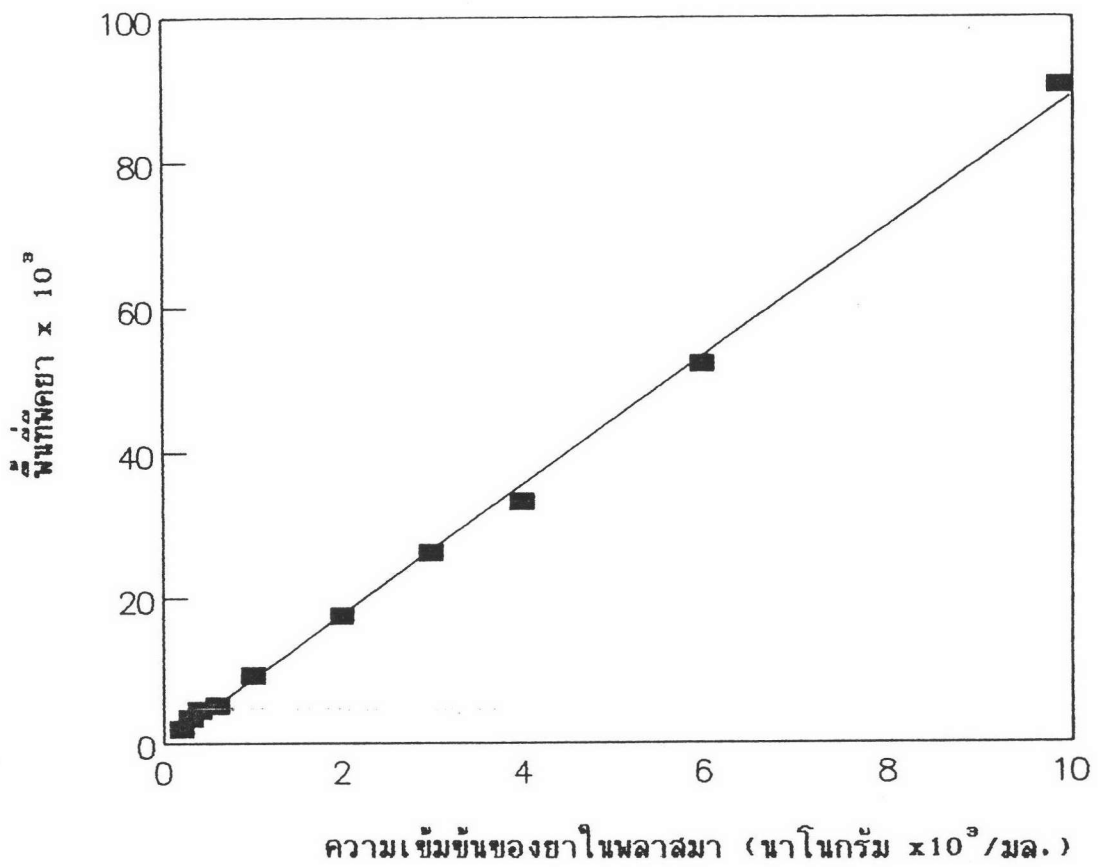
วิธีวิเคราะห์ยาฟูโรซีไมด์ในพลาสมา ที่ผ่านการประเมินผลการแยกพลาสมาโปรตีน เป็นการใช้เมทานอล เพียงอย่างเดียวในการแยกพลาสมาโปรตีน

- 1) การศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสาร แสดงในเทอมของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาดังรายละเอียดในข้อ 3.4.ก.3)
- 2) ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่พีคยากับความเข้มข้นของยาในพลาสมา ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคยาฟูโรซีไมด์ กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาคือ 0.2-10.0 มคก./มล. พลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 16 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = - 23.9250 + 8.9021 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่พีคยาฟูโรซีไมด์ และ x เป็นความเข้มข้นของยาฟูโรซีไมด์ในพลาสมา (นาโนกรัม/มล. พลาสมา) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) = 0.99836

- 3) ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์พิจารณาจากโครมาโทแกรมดังรูปที่ 15 แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์หาปริมาณฟูโรซีไมด์ในพลาสมา โดยใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน มีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังรายละเอียดในข้อ 3.4.ก.2) ข)



รูปที่ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผิวยานูโรซีไมด์ กับความเข้มข้นของ ยานูโรซีไมด์ ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล
สมการเส้นตรง คือ $Y = 8.9021X - 23.9250$
 $r^2 = 0.99836$

4) การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์

จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยา

ฟูโรซีไมด์ในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 คือ 0.2 มก./มล. พลาสมา (S/N ratio = 3.00 ± 0.08 ; %CV = 2.70%) ดังแสดงในตารางที่ 31

5) ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวัน

เดียวกันและระหว่างวัน ดังแสดงในตารางที่ 32 และ 33 ตามลำดับ จะเห็นว่า ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.2-10.0 มก./มล. พลาสมา มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 2.30-6.66% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 0.52-8.47% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 1.01-9.88% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 2.20-9.94% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยาฟูโรซีไมด์ในพลาสมา โดยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลนี้ แม้ว่า จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

6) ปริมาณต่ำสุดของตัวอย่างในตัวอย่างพลาสมาที่

สามารถวิเคราะห์ได้

จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.2-10.0 มก./มล. พลาสมา สำหรับความเข้มข้น 0.2 มก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์นั้น ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกัน และระหว่างวัน = 4.60 และ 9.94% เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคและให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 6.66 และ 9.88% เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีค ดังนั้นจึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยาฟูโรซีไมด์ 0.2 มก./มล. เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย

ตารางที่ 31 ค่าอัตราส่วน S/N ของการวิเคราะห์ฟูโรซีไมด์ในพลาสติก
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกมาโครตีน

| S/N ratio |
|--------------------------|
| 2.95 |
| 3.12 |
| 2.98 |
| 2.91 |
| 3.02 |
| 3.05 |
| 2.95 |
| 3.14 |
| 2.98 |
| 2.91 |
| $\bar{X}(SD)=3.00(0.08)$ |
| %CV = 2.70 |

ความเข้มข้นของฟูโรซีไมด์ = 0.2 มคก./มล.

ตารางที่ 32 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาฟูโรซีไมด์ในพลาสมา
 ภายในวันเดียวกัน เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
 (within-run precision;n=3)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.2 | 2487 | 2597 | 2726 | 2603.3(119.6) | 4.60 |
| 0.4 | 4150 | 4694 | 4006 | 4283.3(362.9) | 8.47 |
| 1.0 | 8715 | 8513 | 8378 | 8535.3(169.6) | 1.99 |
| 2.0 | 16002 | 17416 | 17795 | 17071.0(945.0) | 5.54 |
| 4.0 | 34946 | 36699 | 33111 | 34918.7(1794.2) | 5.14 |
| 10.0 | 88212 | 87309 | 87863 | 87794.7(455.4) | 0.52 |
| ข. ความสูงพีคยา (มม.) | | | | | |
| 0.2 | 1.8 | 1.6 | 1.8 | 1.73(0.12) | 6.66 |
| 0.4 | 3.2 | 3.5 | 3.1 | 3.27(0.21) | 6.37 |
| 1.0 | 7.0 | 6.8 | 6.6 | 6.80(0.20) | 2.94 |
| 2.0 | 13.0 | 13.9 | 14.0 | 13.63(0.55) | 4.04 |
| 4.0 | 22.2 | 24.2 | 21.3 | 22.57(1.48) | 6.58 |
| 10.0 | 68.8 | 66.5 | 69.5 | 68.27(1.57) | 2.30 |

* ความเข้มข้นของฟูโรซีไมด์

ตารางที่ 33 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาฟูโรซีไมด์ในพลาสมา ระหว่างวัน
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.2 | 2180 | 2558 | 2823 | 2762 | 2487 | 2562.0(254.8) | 9.94 |
| 0.4 | 3618 | 4047 | 3920 | 3594 | 4150 | 3865.8(250.9) | 6.49 |
| 1.0 | 8646 | 8955 | 9307 | 8511 | 8715 | 8826.8(313.0) | 3.55 |
| 2.0 | 16902 | 17359 | 18043 | 17983 | 16002 | 17257.8(845.0) | 4.90 |
| 4.0 | 35399 | 36683 | 35303 | 33752 | 34946 | 35216.6(1049.9) | 2.98 |
| 10.0 | 89573 | 91934 | 91366 | 93298 | 88212 | 90876.6(2001.3) | 2.20 |
| ข. ความสูงพีคยา(มม.) | | | | | | | |
| 0.2 | 1.4 | 1.6 | 1.7 | 1.5 | 1.8 | 1.60(0.16) | 9.88 |
| 0.4 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.2 | 3.04(0.09) | 2.94 |
| 1.0 | 7.0 | 7.0 | 7.1 | 6.9 | 7.0 | 7.00(0.07) | 1.01 |
| 2.0 | 14.2 | 14.0 | 14.3 | 14.0 | 13.0 | 13.90(0.52) | 3.74 |
| 4.0 | 23.0 | 22.9 | 22.9 | 26.5 | 22.2 | 23.50(1.71) | 7.26 |
| 10.0 | 71.2 | 72.0 | 72.0 | 71.8 | 68.8 | 71.16(1.36) | 1.91 |

* ความเข้มข้นของฟูโรซีไมด์

7) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมิน (จากขั้นตอนที่ 4) มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกที่รับมาจำนวน 9 ตัวอย่าง คือ ที่ความเข้มข้น 0.4, 2.0 และ 10.0 มก./มล. (ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% Analytical recovery) ดังแสดงในตารางที่ 34 พบว่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ก็ให้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ = $96.89 \pm 3.68\%$ ซึ่งเป็นเครื่องยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยาฟูโรซีไมด์ได้ถูกต้องแม่นยำจริงในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาฟูโรซีไมด์ในพลาสติก โดยหลักการแยกพลาสติกไปรติน จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 35

3.5 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสติก

3.5.ก การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสติกไปรติน

1) ลักษณะตัวอย่างพลาสติกหลังเติมสารแยกพลาสติกไปรตินลงในตัวอย่างพลาสติก

ก) เมื่อใช้แอซีไตนไตรล์เป็นสารแยกพลาสติกไปรติน

- ลักษณะตะกอนพลาสติกไปรตินจับกันแน่น

เป็นก้อนขนาดใหญ่สีเหลืองอมส้มเกาะติดที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณน้อยไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่า

ตารางที่ 34 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยาฟูโรซีไมด์ในพลาสติก
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกปรตึน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสติก (นาโนกรัม/มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัม/มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|---|---|---|
| 400 | 388.9 | 97.22 |
| 400 | 369.8 | 92.45 |
| 400 | 400.2 | 100.05 |
| 2000 | 1921.0 | 96.05 |
| 2000 | 2005.9 | 100.30 |
| 2000 | 1806.8 | 90.34 |
| 10000 | 10095.0 | 100.95 |
| 10000 | 9755.5 | 97.56 |
| 10000 | 9704.6 | 97.05 |
| | | $\bar{X}(SD)=96.89(3.57)$ %CV = 3.68 |

ตารางที่ 35 สรุปการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาพาราเซตามอล
โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน

| | conc. ($\mu\text{g/ml}$) | CH_3OH |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| <u>%Phy.Reco.</u> (n=30) | 0.2-10.0 | |
| -peak area \bar{X} (SD) | | 95.79(3.99) |
| %CV | | 4.16 |
| -peak height \bar{X} (SD) | | 95.88(5.20) |
| %CV | | 5.42 |
| <u>Linearity</u> | 0.12-10.0 | |
| Eq. Y= | | -23.9250+8.9021X |
| r^2 | | 0.99836 |
| <u>Specificity</u> | | |
| <u>LLD</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.2 |
| <u>Precision</u> %CV | 0.12-10.0 | |
| -within-run (n=3) | | |
| peak area | | 0.52-8.47 |
| peak height | | 2.30-6.66 |
| -between-run (n=5) | | |
| peak area | | 2.20-9.94 |
| peak height | | 1.01-9.88 |
| <u>LLQ</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.2 |
| <u>%Anal.Reco.</u> (n=9) | | |
| \bar{X} (SD) | | 96.89(3.57) |
| %CV | | 3.68 |

- สารละลายไอที่แยกออกมาเป็นสีเหลือง มีความใสสะอาด มีปริมาณมาก มี pH ประมาณ 7
- ข) เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโพรตีน
 - ลักษณะตะกอนพลาสติกโพรตีน เป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อน จับกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณมาก ผิวหน้าตะกอนฟุ้งกระจายเล็กน้อย เมื่อเขย่าอย่างแรง
 - สารละลายไอที่แยกออกมา เป็นสีเหลืองอ่อน มีความใสสะอาด มีปริมาณประมาณ 2.5 เท่า ของปริมาณตะกอน มี pH ประมาณ 7

2) ลักษณะโครมาโทแกรม

- ก) เมื่อใช้แอสิตอนไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกโพรตีน

จากโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสติกและตัวอย่างพลาสติก จะเห็นว่าพีคของยาบนโครมาโทแกรม ปรากฏเป็นพีคเดี่ยวและไม่ถูกรบกวนจากพีคของ endogenous ซึ่งมีขนาดใหญ่ เนื่องจากพีคของ endogenous ถูกชะออกมาได้หมดก่อนพีคยา ดังแสดงในรูปที่ 17 พีคของของยาไกลเบนคลาไมด์ เมื่ออยู่ในพลาสติก และเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐานของสารแยกพลาสติกโพรตีนชนิดเดียวกัน จะเห็นว่า มีลักษณะเหมือนกัน และมีเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ที่เท่ากัน (ไกลเบนคลาไมด์ = 10.51 นาที ทั้งเมื่ออยู่ในพลาสติกและสารละลายมาตรฐาน) แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

- ข) เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสติกโพรตีน

โครมาโทแกรมที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกับก. แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ พีคจากค่าเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ของยาไกลเบนคลาไมด์ เมื่ออยู่ในพลาสติกและเมื่ออยู่ในสารละลาย

มาตรฐานของสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกันมีค่าเท่ากัน (โกลเบนคลาไมด์ = 10.55 นาที่ทั้งเมื่ออยู่ในพลาสติกและสารละลายมาตรฐาน) ดังแสดงในรูปที่ 18

3) เบอร์เซนต์การคืนกลับของยา

ผลการทดลองหาเบอร์เซนต์การคืนกลับของยาในพลาสติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้เอซีโตนไตรส์เป็นสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกันมีค่า = $94.26 \pm 5.32\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า = $94.65 \pm 5.47\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของพีคยา ดังแสดงในตารางที่ 33 และเมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกันมีค่า = $94.69 \pm 4.18\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า = $97.49 \pm 3.54\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีคยา โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก ดังแสดงในตารางที่ 37

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการแยกพลาสติกชนิดของตัวอย่างพลาสติกของยาโกลเบนคลาไมด์ จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 38

3.5.ข การ validate วิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ยาโกลเบนคลาไมด์ในพลาสติกผ่านการประเมินผลการแยกพลาสติกชนิดเดียวกัน เป็นการใช้อซีโตนไตรส์ และเมทานอล ในการแยกพลาสติกชนิดเดียวกัน

1) การศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสาร

แสดงในเทอมของเบอร์เซนต์การคืนกลับของยา

ดังรายละเอียดในข้อ 3.5.ก. 3)

2) ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่พีคยากับ

ความเข้มข้นของยาในพลาสติก

ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคยาโกลเบนคลาไมด์

กับความเข้มข้นของยาในพลาสติก เมื่อใช้อซีโตนไตรส์เป็นสารแยกพลาสติก

ชนิดเดียวกันที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาคือ 0.16-0.4 มคก./มล.

พลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 19 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = 190.9452 + 12.1115 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่ฟิคยาไกลเบนคลาไมด์ และ X เป็นความเข้มข้นของยาไกลเบน-คลาไมด์ในพลาสมา (นาโนกรัม/มล.พลาสมา) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) = 0.99840

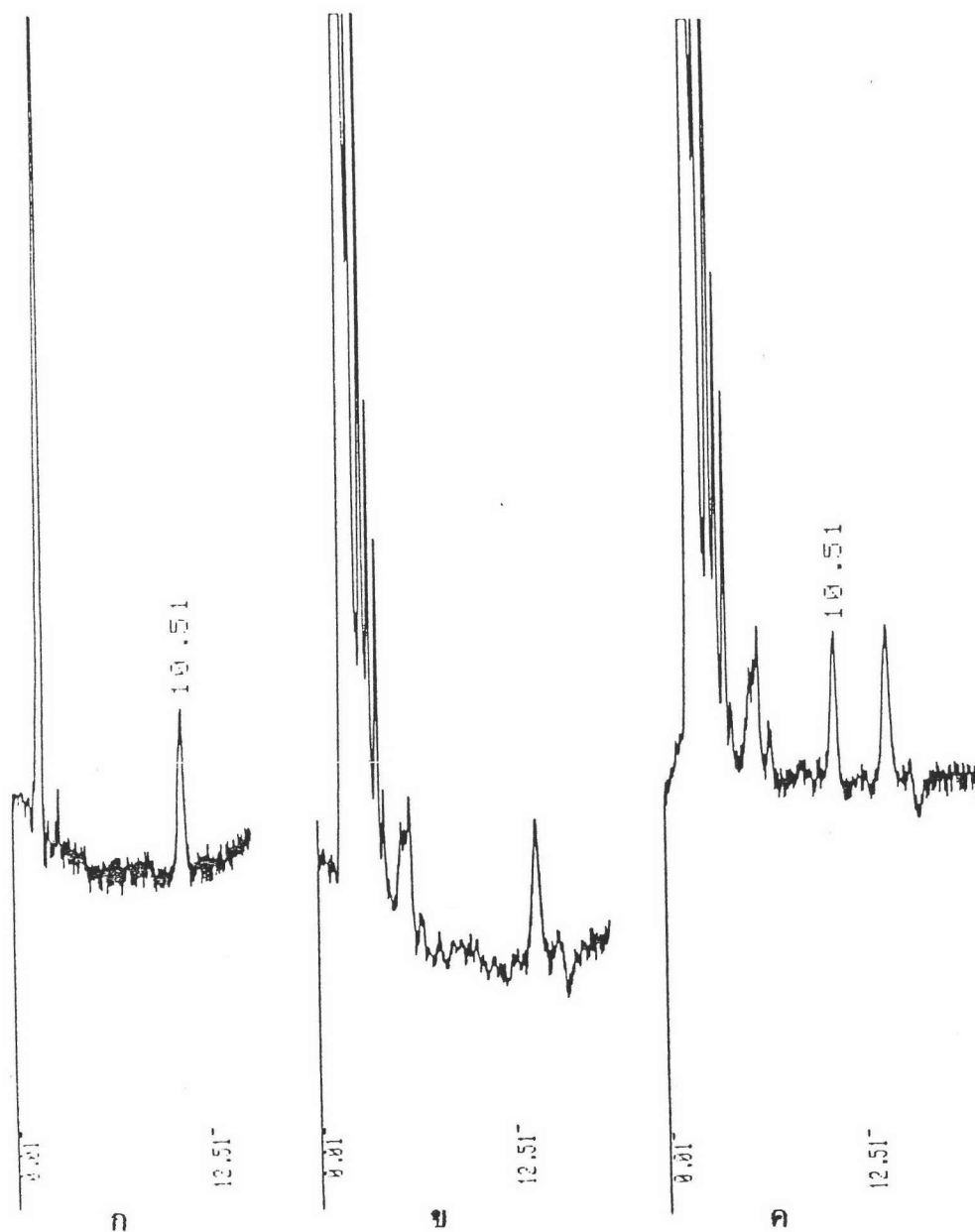
ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ฟิคยาไกลเบนคลาไมด์กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.16-0.4 มคก./มล. พลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 20 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = 59.2334 + 12.5614 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่ฟิคยาไกลเบนคลาไมด์ และ X เป็นความเข้มข้นของยาไกลเบน-คลาไมด์ในพลาสมา (นาโนกรัม/มล.พลาสมา) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) = 0.99906

3) ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ที่พิจารณาจากโครมาโทแกรมดังรูปที่ 17 และ 18 แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสมา โดยใช้แอซีโตนไนโตรสและเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน มีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังรายละเอียดในข้อ 3.6.ก 2) และ ข)



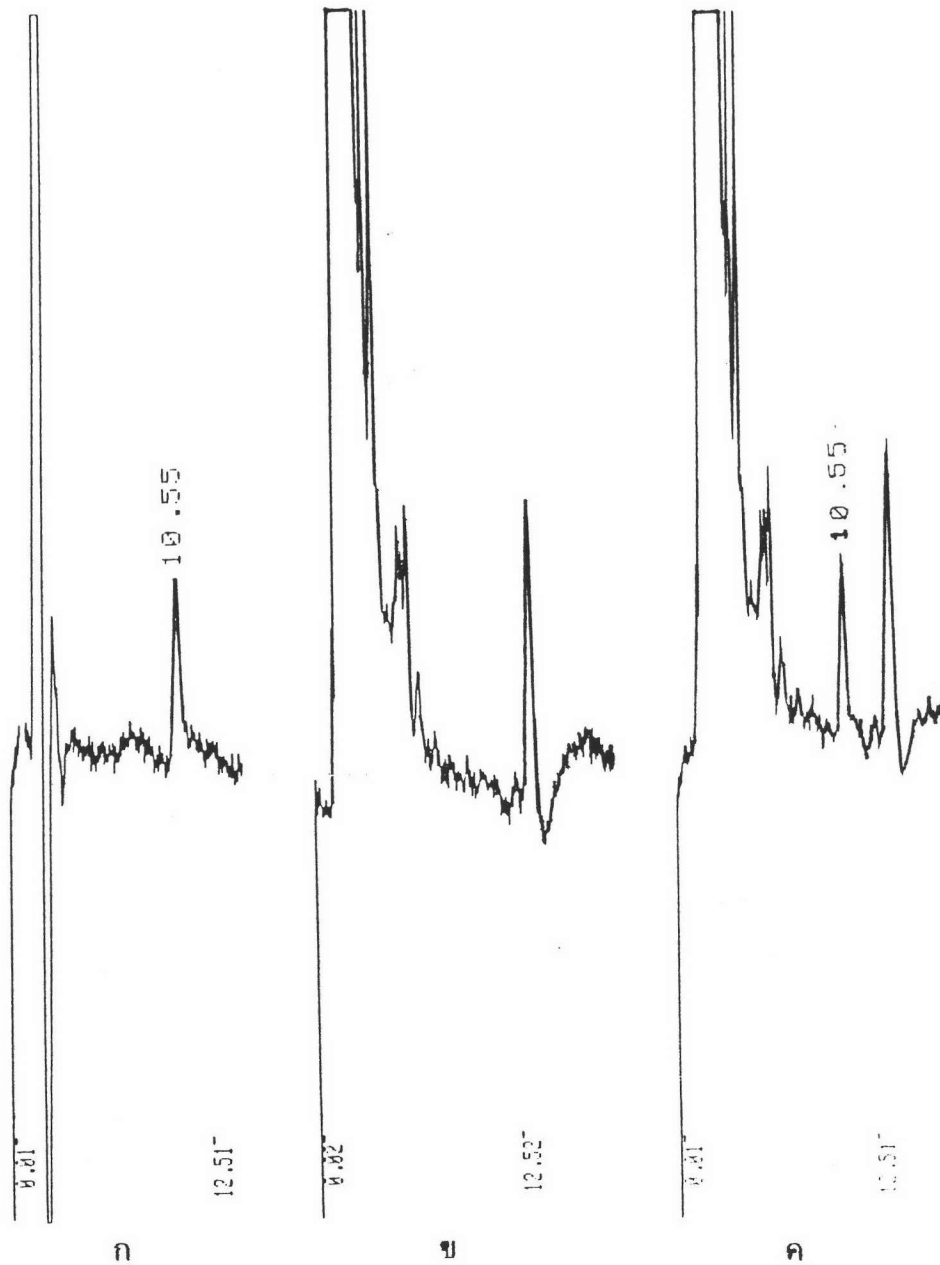
รูปที่ 17 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาไกลเบนคลาไมด์ ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอซีโตไนไตรล์ โดยเทคนิค HPLC

ก. เป็นโครมาโทแกรมของไกลเบนคลาไมด์ในสารละลายมาตรฐาน

ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา

ค. เป็นโครมาโทแกรมของไกลเบนคลาไมด์ในพลาสมา

ความเข้มข้น 400 นาโนกรัม/มล. (ใช้แอทเทนชัน 2°)



รูปที่ 18

โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาไกลเบนคลาไมด์ ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล โดยเทคนิค HPLC

ก. เป็นโครมาโทแกรมของไกลเบนคลาไมด์ในสารละลายมาตรฐาน

ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลนด์พลาสมา

ค. เป็นโครมาโทแกรมของไกลเบนคลาไมด์ในพลาสมา

ความเข้มข้น 400 นาโนกรัม/มล. (ใช้แอทเทนนูเอชัน 2°)

ตารางที่ 36 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสมาเมื่อใช้แอซีไคโนโครส์
เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (physical recovery ; n=6)

| ก. พื้นที่พิกษา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.16 | 94.53 | 97.73 | 97.40 | 103.12 | 99.41 | 95.94 | 98.02(3.00) | 3.06 |
| 0.2 | 96.36 | 95.95 | 85.68 | 94.92 | 88.82 | 102.83 | 94.09(6.07) | 6.45 |
| 0.3 | 91.32 | 93.41 | 98.56 | 93.15 | 89.71 | 95.82 | 93.66(3.16) | 3.38 |
| 0.4 | 88.13 | 96.96 | 86.89 | 86.73 | 99.68 | 89.10 | 91.25(5.61) | 6.15 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 94.26(5.01) | 5.32 |
| ข. ความสูงพิกษา(มม.) | | | | | | | | |
| 0.16 | 96.08 | 92.08 | 91.92 | 100.00 | 98.98 | 87.25 | 94.38(4.85) | 5.14 |
| 0.2 | 86.67 | 97.89 | 93.48 | 90.00 | 86.33 | 100.00 | 92.40(5.74) | 6.21 |
| 0.3 | 86.55 | 92.93 | 103.03 | 91.11 | 90.91 | 101.18 | 94.28(6.44) | 6.83 |
| 0.4 | 100.00 | 99.13 | 92.17 | 99.16 | 95.55 | 99.14 | 97.52(3.05) | 3.13 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 94.65(5.18) | 5.47 |

* ความเข้มข้นของไกลเบนคลาไมด์

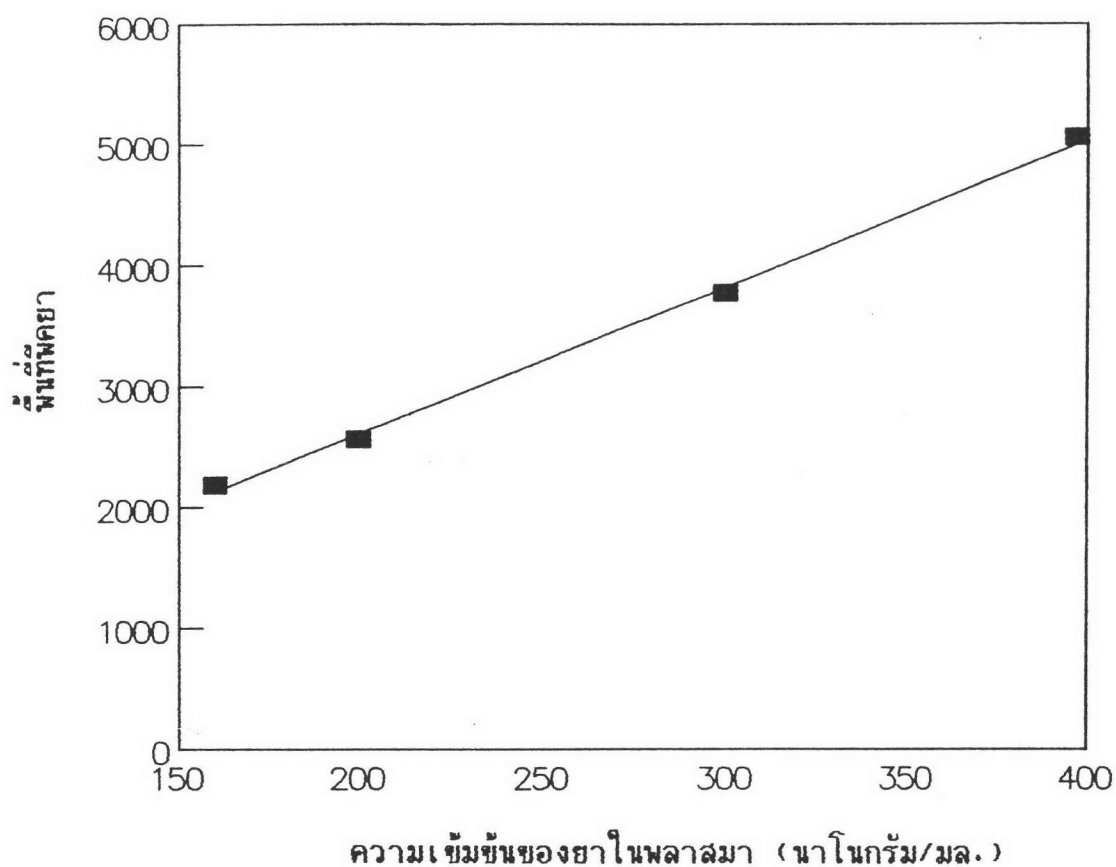
ตารางที่ 37 เปอร์เซนต์การคืนกลับของยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสมาเมื่อใช้เมทานอล
เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (physical recovery ; n=6)

| ก. พื้นที่พิกษา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.16 | 87.75 | 96.55 | 90.52 | 95.18 | 94.91 | 88.61 | 92.25(3.76) | 4.07 |
| 0.2 | 96.73 | 97.47 | 97.55 | 98.84 | 98.31 | 85.75 | 95.78(4.96) | 5.18 |
| 0.3 | 99.98 | 90.65 | 93.13 | 98.68 | 90.08 | 92.73 | 94.21(4.16) | 4.41 |
| 0.4 | 93.27 | 97.03 | 95.69 | 98.12 | 97.13 | 97.92 | 96.53(1.81) | 1.88 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 94.69(3.96) | 4.18 |
| ข. ความสูงพิกษา (มม.) | | | | | | | | |
| 0.16 | 100.00 | 100.00 | 96.23 | 99.23 | 90.00 | 96.80 | 97.04(3.81) | 3.93 |
| 0.2 | 100.68 | 100.00 | 99.33 | 93.42 | 100.00 | 94.70 | 98.02(3.12) | 3.19 |
| 0.3 | 90.67 | 98.00 | 100.00 | 98.10 | 94.00 | 99.47 | 96.71(3.63) | 3.75 |
| 0.4 | 93.14 | 101.22 | 98.25 | 94.14 | 99.20 | 103.20 | 98.19(3.93) | 4.00 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 97.49(3.45) | 3.54 |

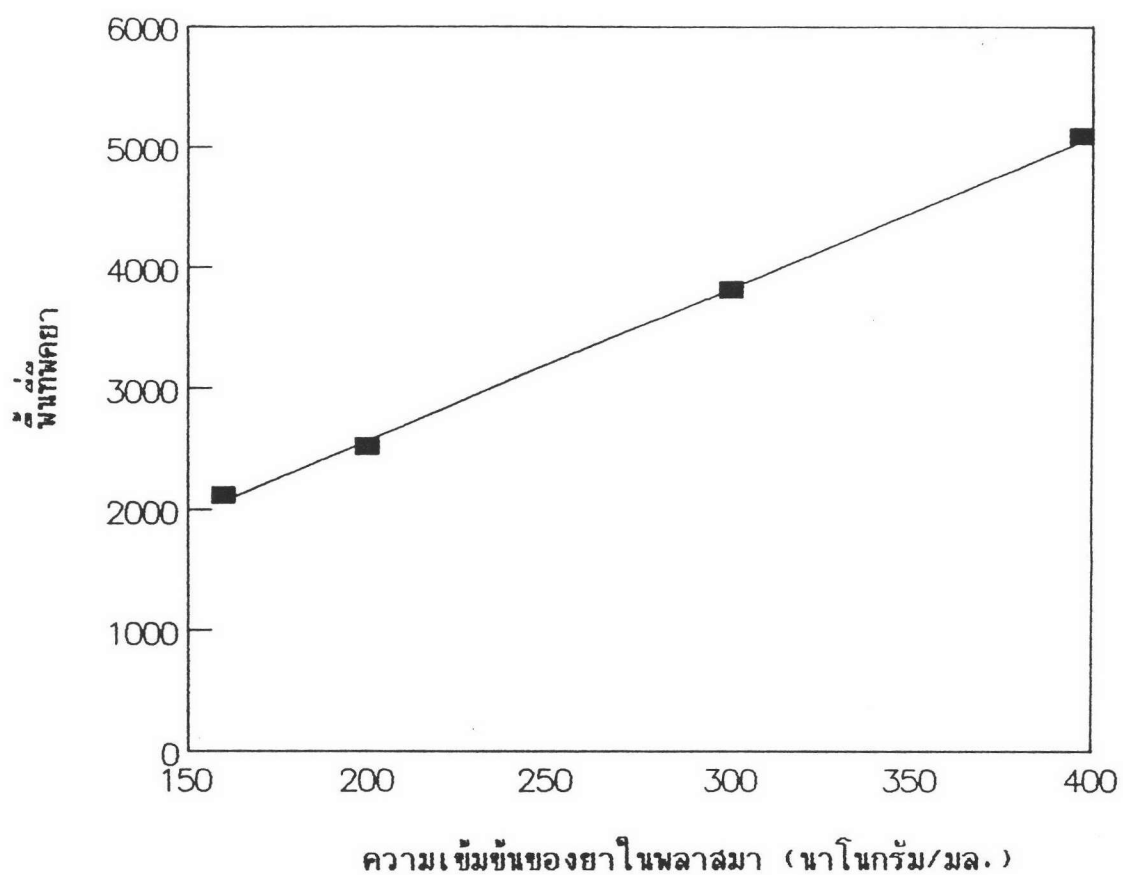
* ความเข้มข้นของไกลเบนคลาไมด์

ตารางที่ 38 สรุปการวิเคราะห์ผลการแยกผลาสมาโปรตีนของยาไกลเบนคลาไมด์

| | | CH ₃ CN | CH ₃ OH |
|---------------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| Appearance | | pass | pass |
| Chromatogram | | pass | pass |
| %Physical Recovery (n=30) | | pass | pass |
| -peak area | \bar{X} (SD) | 94.26(5.01) | 94.69(3.96) |
| | %CV | 5.32 | 4.18 |
| -peak height | \bar{X} (SD) | 94.65(5.18) | 97.49(3.45) |
| | %CV | 5.47 | 3.54 |



รูปที่ 19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พิศยาไกลเบนคลาไมด์ กับความเข้มข้นของยาไกลเบนคลาไมด์ ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอสिटโนไตรล์ สมการเส้นตรง คือ $Y = 12.1115X + 190.9452$
 $r^2 = 0.99840$



- รูปที่ 20. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผิวยาลกลูโคสเบนคลาไมด์ กับความเข้มข้นของยาไกลโคเบนคลาไมด์ ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล
- สมการเส้นตรง คือ $Y = 12.5614X + 59.2934$
- $r^2 = 0.99906$

4) การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์

จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของ

ยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสติกให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 คือ 0.16 มคก./มล. พลาสติก (S/N ratio = 2.43 ± 0.12 ; %CV = 4.95%) และ 0.16 มคก./มล. (S/N ratio เฉลี่ย = 2.96 ± 0.21 ; %CV = 7.17%) สำหรับการวิเคราะห์ไอโซโทปและเมทานอล ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 39

5) ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวัน

เดียวกันและระหว่างวันโดยการวิเคราะห์ไอโซโทปเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 40 และ 41 ตามลำดับ จะเห็นว่า ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.16-0.4 มคก./มล. พลาสติก มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 1.92-5.25% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 2.39-9.92% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 3.68-4.10% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 4.86-9.19% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสติก โดยการแยกพลาสติกโปรตีนด้วยไอโซโทปนี้ แม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

สำหรับการแยกพลาสติกโปรตีนด้วยเมทานอล

ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.16-0.4 มคก./มล. พลาสติก ดังแสดงในตารางที่ 42 และ 41 มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 4.26-5.00% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 2.96-9.02% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 1.31-4.09% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 4.08-5.78% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV

ตารางที่ 39 ค่าอัตราส่วน S/N ของการวิเคราะห์ไกลเบนคลาไมด์ในพลาสมา
เมื่อใช้แอสีไตไนโตรสและเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

| S/N ratio | |
|--|--|
| แอสีไตไนโตรส* | เมทานอล** |
| 2.52 | 2.82 |
| 2.40 | 2.50 |
| 2.32 | 2.98 |
| 2.40 | 2.88 |
| 2.38 | 2.88 |
| 2.65 | 3.20 |
| 2.38 | 2.92 |
| 2.58 | 3.12 |
| 2.42 | 3.22 |
| 2.25 | 3.05 |
| $\bar{X}(SD)=2.43(0.12)$ %CV = 4.95 | $\bar{X}(SD)=2.96(0.21)$ %CV = 7.17 |

* ความเข้มข้นของไกลเบนคลาไมด์ = 0.16 มคก./มล.

**ความเข้มข้นของไกลเบนคลาไมด์ = 0.16 มคก./มล.

ตารางที่ 40 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณไกลเบนคลาไมด์ในพลาสมา
ภายในวันเดียวกัน เมื่อใช้แอซีเตไนโตรสเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(within-run precision ; n=3)

| ก. พื้นที่ผิวยา | | | | | |
|----------------------------|------|------|------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.16 | 1657 | 1831 | 1666 | 1718.0(98.0) | 5.70 |
| 0.2 | 2653 | 2635 | 2754 | 2680.7(64.1) | 2.39 |
| 0.3 | 3895 | 3738 | 3924 | 3852.3(100.1) | 2.60 |
| 0.4 | 5318 | 4517 | 5452 | 5095.7(505.6) | 9.92 |
| ข. ความสูงพีคยา(มม.) | | | | | |
| 0.16 | 10.0 | 10.7 | 11.1 | 10.60(0.56) | 5.25 |
| 0.2 | 12.3 | 13.2 | 12.8 | 12.77(0.45) | 3.53 |
| 0.3 | 18.2 | 17.6 | 18.2 | 18.00(0.35) | 1.92 |
| 0.4 | 24.3 | 23.0 | 23.5 | 23.60(0.66) | 2.78 |

* ความเข้มข้นของไกลเบนคลาไมด์

ตารางที่ 41 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาไกลเบนคลาไมด์ ระหว่างวัน
เมื่อใช้แอซีไตโนไตรลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | | | |
|----------------------------|------|------|------|------|------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.16 | 2267 | 1944 | 2185 | 2228 | 1831 | 2091.0(192.2) | 9.19 |
| 0.2 | 2567 | 2677 | 2242 | 2348 | 2635 | 2493.8(189.4) | 7.60 |
| 0.3 | 3505 | 3378 | 3782 | 3487 | 3738 | 3578.0(173.8) | 4.86 |
| 0.4 | 5077 | 4432 | 5068 | 4503 | 4517 | 4719.4(324.0) | 6.86 |
| ข. ความสูงพีคยา(มม.) | | | | | | | |
| 0.16 | 9.9 | 9.7 | 9.9 | 10.4 | 10.7 | 10.12(0.41) | 4.10 |
| 0.2 | 12.8 | 13.0 | 12.0 | 13.3 | 13.2 | 12.86(0.52) | 4.02 |
| 0.4 | 17.0 | 17.0 | 18.5 | 17.1 | 17.6 | 17.44(0.64) | 3.68 |
| 0.4 | 22.9 | 22.0 | 23.0 | 21.4 | 23.0 | 22.46(0.73) | 3.24 |

* ความเข้มข้นของไกลเบนคลาไมด์

ตารางที่ 42 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสมา
 ภายในวันเดียวกัน เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
 (within-run precision ; n=3)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | |
|----------------------------|------|------|------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.16 | 2461 | 2058 | 2335 | 2284.7(206.2) | 9.02 |
| 0.2 | 2884 | 2771 | 2937 | 2864.0(84.8) | 2.96 |
| 0.3 | 3689 | 3541 | 4053 | 3761.0(263.5) | 7.00 |
| 0.4 | 5322 | 4718 | 5337 | 5125.7(353.1) | 6.89 |
| ข. ความสูงพีคยา(มม.) | | | | | |
| 0.16 | 12.5 | 11.6 | 12.5 | 12.20(0.52) | 4.26 |
| 0.2 | 16.1 | 15.1 | 15.9 | 15.70(0.53) | 3.37 |
| 0.3 | 19.9 | 20.1 | 21.6 | 20.53(0.93) | 4.52 |
| 0.4 | 25.2 | 25.3 | 27.5 | 26.00(1.30) | 5.00 |

* ความเข้มข้นของไกลเบนคลาไมด์

ตารางที่ 43 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาไกลเบนคลาไมด์ ระหว่างวัน
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน (between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | | | |
|----------------------------|------|------|------|------|------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.16 | 2316 | 2116 | 2188 | 2336 | 2058 | 2202.8(121.7) | 5.53 |
| 0.2 | 2815 | 2521 | 2734 | 2962 | 2771 | 2760.6(159.5) | 5.78 |
| 0.3 | 3437 | 3816 | 3702 | 3687 | 3541 | 3636.6(148.3) | 4.08 |
| 0.4 | 4495 | 5099 | 4592 | 4526 | 4718 | 4686.0(246.2) | 5.25 |
| ข. ความสูงพีคยา(มม.) | | | | | | | |
| 0.16 | 12.0 | 12.2 | 11.5 | 11.8 | 11.6 | 11.82(0.29) | 2.42 |
| 0.2 | 13.8 | 14.0 | 14.3 | 14.5 | 15.1 | 14.34(0.50) | 3.51 |
| 0.4 | 19.6 | 19.7 | 19.5 | 20.0 | 20.1 | 19.78(0.26) | 1.31 |
| 0.4 | 23.6 | 26.0 | 24.8 | 23.8 | 25.3 | 24.70(1.01) | 4.09 |

* ความเข้มข้นของไกลเบนคลาไมด์

ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสมาวิธีนี้ แม้ว่า
จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ยาในวันเดียวกัน หรือในวันใดๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

6) ปริมาณต่ำสุดของตัวอย่างในตัวอย่างพลาสมาที่
สามารถวิเคราะห์ได้

จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์
ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.16-
0.4 มคก./มล. พลาสมา สำหรับความเข้มข้น 0.16 มคก./มล. ซึ่งเป็น
ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์นั้น ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกัน และระหว่าง
วัน = 5.70 และ 9.19% เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคและให้ค่า %CV ภายในวัน
เดียวกันและระหว่างวัน = 5.25 และ 4.10% เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีค
ดังนั้นจึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยาไกลเบนคลาไมด์ 0.16 มคก./มล. เป็นความ
เข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย

สำหรับการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล ผล
การศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน ของ
ช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.16-0.4 มคก./มล. พลาสมา สำหรับ
ความเข้มข้น 0.16 มคก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์นั้น ให้
ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกัน และระหว่างวัน = 9.02 และ 5.53% เมื่อ
คำนวณโดยใช้พื้นที่พีคและให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 4.26
และ 2.42% เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีค ดังนั้นจึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยา
ไกลเบนคลาไมด์ 0.16 มคก./มล. พลาสมา เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์
หาปริมาณได้ด้วย

7) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมิน (จาก
ขั้นตอนที่ 4) มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาที่รับมาจำนวน 9 ตัวอย่าง คือ ที่
ความเข้มข้น 0.2, 0.3 และ 0.4 มคก./มล. (ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง)
และคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% Analytical recovery)

ดังแสดงในตารางที่ 44 และ 45 พบว่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่แยกพลาสติกมาโปรตีนด้วยแอสีโตไนโตรัส และเมทานอลในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ก็ทำให้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ = $91.98 \pm 4.15\%$ และ $91.00 \pm 4.00\%$ ตามลำดับ ซึ่งเป็นเครื่องยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้ สามารถวิเคราะห์หาปริมาณไกลเบนคลาไมด์ได้ถูกต้องแม่นยำจริง ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสติก โดยหลักการแยกพลาสติกมาโปรตีน จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 46

เนื่องจากผลการศึกษาการวิเคราะห์ยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสติก ในการวิเคราะห์ผลการแยกพลาสติกมาโปรตีน และ validate วิธีวิเคราะห์นั้น ปรากฏว่าผ่านการประเมินทั้งการใช้ แอสีโตไนโตรัสและเมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน ดังนั้นเพื่อเป็นการทดสอบความแตกต่างในเชิงสถิติของค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาจากการใช้สารแยกพลาสติกมาโปรตีนทั้งสองตัวดังกล่าว ผลจากตารางที่ 36 และ 37 ทั้งเมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พิกษาและความสูงพิกษา จึงทำการเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าว โดยใช้ 2-tailed unpaired student t-test (รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ง) ผลการทดสอบปรากฏว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยา จากการใช้สารแยกพลาสติกมาโปรตีนทั้งสองตัว เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พิกษา ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นั่นคือ ทั้งเมทานอลและแอสีโตไนโตรัสสามารถใช้เป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสติกได้ผลที่ไม่แตกต่างกันและเมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพิกษามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นั่นคือ การใช้เมทานอล

ตารางที่ 44 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสติก
เมื่อใช้แอซีเตไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสติก (นาโนกรัม/มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัม/มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|---|---|---|
| 200 | 182.8 | 91.40 |
| 200 | 190.9 | 95.45 |
| 200 | 193.3 | 96.65 |
| 300 | 274.9 | 91.63 |
| 300 | 290.0 | 96.67 |
| 300 | 277.2 | 92.40 |
| 400 | 341.4 | 85.35 |
| 400 | 357.6 | 89.40 |
| 400 | 355.6 | 88.90 |
| | | $\bar{X}(SD)=91.98(3.82)$ %CV = 4.15 |

ตารางที่ 45 เปรอ์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยาไกลเบนคลาไมด์ในพลาสติก
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสติก (นาโนกรัม/มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัม/มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|---|---|---|
| 200 | 193.5 | 96.75 |
| 200 | 178.8 | 89.40 |
| 200 | 189.1 | 94.55 |
| 300 | 262.8 | 87.60 |
| 300 | 263.5 | 87.83 |
| 300 | 273.3 | 91.10 |
| 400 | 350.3 | 87.58 |
| 400 | 381.6 | 95.40 |
| 400 | 355.2 | 88.80 |
| | | $\bar{X}(SD)=91.00(3.64)$ %CV = 4.00 |

ตารางที่ 46 สรุปการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาไกลเบนคลาไมด์โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน

| | conc. (ng/ml) | CH ₃ CN | CH ₃ OH |
|-----------------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| <u>%Phy.Reco.</u> (n=24) | 160-400 | | |
| -peak area \bar{X} (SD) | | 94.26(5.01) | 94.69(3.96) |
| %CV | | 5.32 | 4.18 |
| -peak height \bar{X} (SD) | | 94.65(5.18) | 97.49(3.45) |
| %CV | | 5.47 | 3.54 |
| <u>Linearity</u> | 160-400 | | |
| Eq. Y= | | 52.2334+12.5614X | 190.9452+12.1115X |
| r ² | | 0.99906 | 0.99840 |
| <u>Specificity</u> | | | |
| <u>LLD</u> (ng/ml) | | 160 | 160 |
| <u>Precision</u> %CV | 160-400 | | |
| -within-run (n=3) | | | |
| peak area | | 2.39-9.92 | 2.96-9.02 |
| peak height | | 1.92-5.25 | 3.37-5.00 |
| -between-run (n=5) | | | |
| peak area | | 4.86-9.19 | 4.08-5.78 |
| peak height | | 3.24-4.10 | 1.31-4.09 |
| <u>LLQ</u> (ng/ml) | | 160 | 160 |
| <u>%Anal.Reco.</u> (n=9) | | | |
| \bar{X} (SD) | | 91.98(3.82) | 91.00(3.64) |
| %CV | | 4.15 | 4.00 |

และแอซีไตนไตรีลเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน ในการวิเคราะห์หาปริมาณยา
ไกลเบนคลาไมด์ในพลาสติกให้ผลที่แตกต่างกัน โดยการใช้นเมทานอลเป็นสารแยก
พลาสติกมาโปรตีน ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาที่ดีกว่าการใช้แอซีไตนไตรีล

3.6 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ยาโอบูโปรเฟนในพลาสติก

3.6.ก การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสติกมาโปรตีน

1) ลักษณะตัวอย่างพลาสติกหลังเติมสารแยกพลาสติกมา
โปรตีนลงในตัวอย่างพลาสติก

ก) เมื่อใช้แอซีไตนไตรีลเป็นสารแยกพลาสติกมา
โปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสติกมาโปรตีนจับกันแน่น
เป็นก้อนขนาดใหญ่สีเหลืองอมส้มเกาะติดที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณน้อย
ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่า

- สารละลายสีที่แยกออกมาเป็นสีเหลือง
มีความใสสะอาด มีปริมาณมาก มี pH ประมาณ 7

ข) เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสติกมาโปรตีน เป็นผง
ละเอียดสีเหลืองอ่อน จับกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณมาก ผิวหน้า
ตะกอนฟุ้งกระจายเล็กน้อย เมื่อเขย่าอย่างแรง

- สารละลายสีที่แยกออกมา เป็นสีเหลือง
อ่อน มีความใสสะอาด มีปริมาณประมาณ 2.5 เท่า ของปริมาณตะกอน มี pH
ประมาณ 7

2) ลักษณะโครมาโทแกรม

ก) เมื่อใช้แอซีโตไนไตรต์เป็นสารแยกพลาสติก
โพรตีน

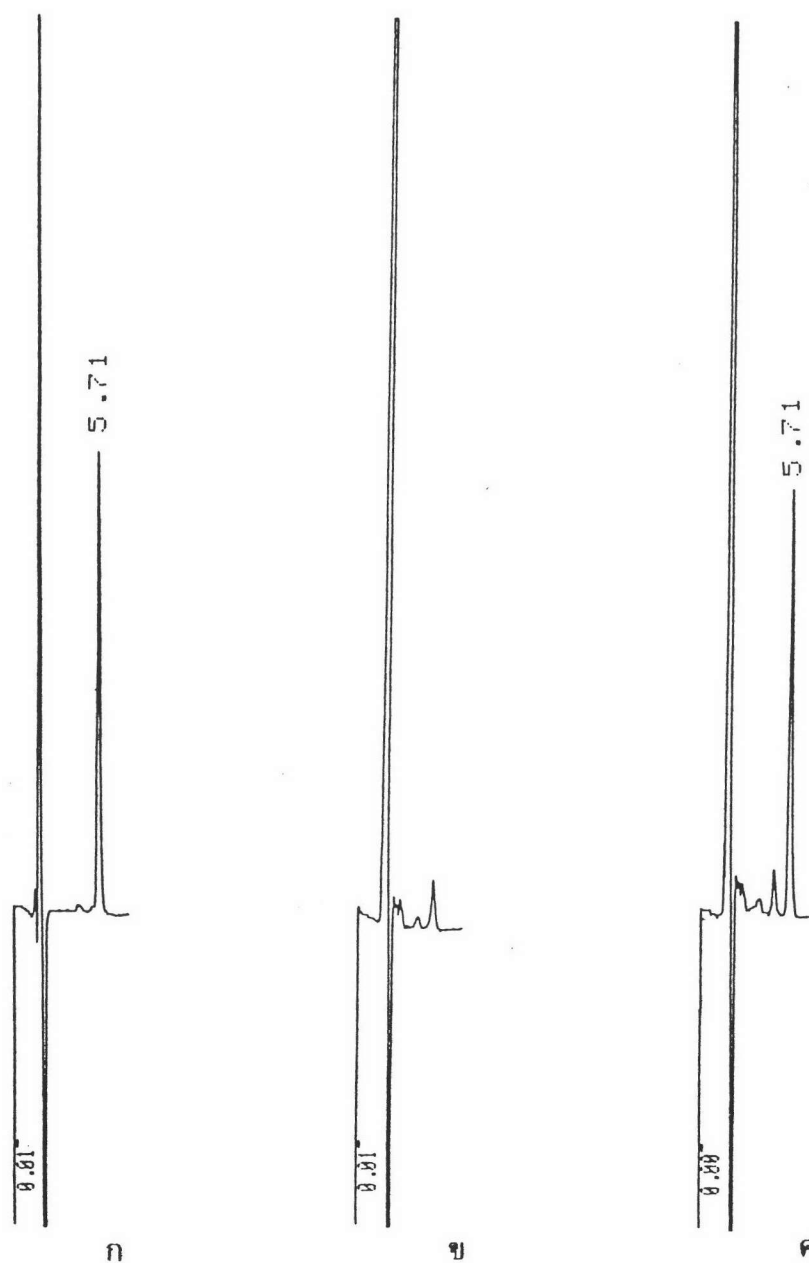
พีคของยาบนโครมาโทแกรมปรากฏเป็นพีคเดี่ยวและไม่ถูกรบกวนจากพีคของ endogenous ซึ่งมีขนาดใหญ่เนื่องจากพีคของ endogenous ถูกชะออกมาได้หมดก่อนพีคยา ดังแสดงในรูปที่ 21 พิจารณาจากพีคของยาโอบูโพรเฟน เมื่ออยู่ในพลาสติกและเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐานของสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกัน จะเห็นว่า มีลักษณะเหมือนกันและมีเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ที่เท่ากัน (โอบูโพรเฟน = 5.71 นาที ทั้งเมื่ออยู่ในพลาสติกและสารละลายมาตรฐาน) แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

ข) เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสติก
โพรตีน

โครมาโทแกรมที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกับก . แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ พิจารณาจากค่าเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ของยาไกลเบนคลาไมด์ เมื่ออยู่ในพลาสติกและเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐานของสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกันมีค่าเท่ากัน (โอบูโพรเฟน = 5.85 นาที ทั้งเมื่ออยู่ในพลาสติกและสารละลายมาตรฐาน) ดังแสดงในรูปที่ 22

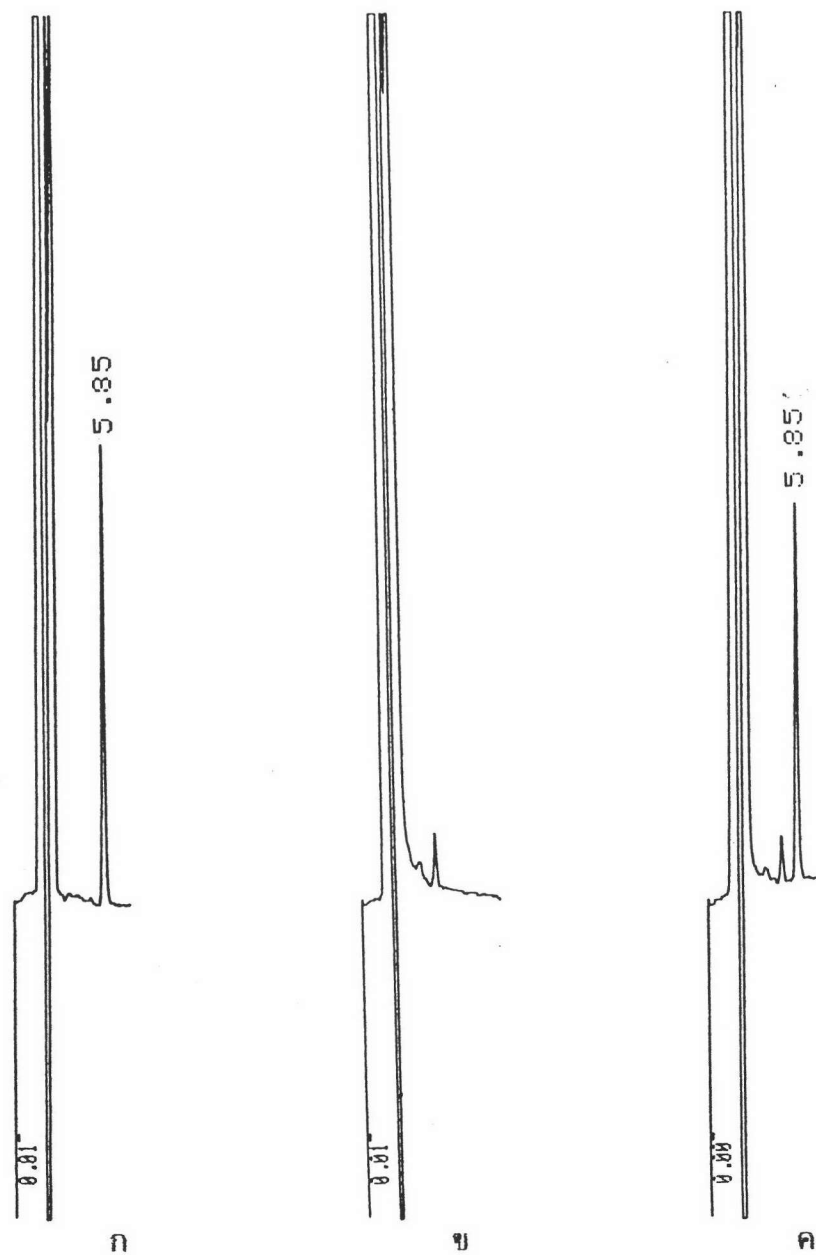
3) เบอร์เซนต์การคืนกลับของยา

ผลการทดลองหาเบอร์เซนต์การคืนกลับของยาในพลาสติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้แอซีโตไนไตรต์เป็นสารแยกพลาสติกโพรตีน มีค่า = $90.03 \pm 4.49\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยา มีค่า = $87.65 \pm 6.39\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของพีคยา ดังแสดงในตารางที่ 47 และเมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโพรตีนมีค่า = $89.47 \pm 5.94\%$ เมื่อคำนวณโดยพื้นที่พีคยาและมีค่า $89.09 \pm 5.84\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีคยา โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก ดังแสดงในตารางที่ 48



รูปที่ 21 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาไอบูโพรเฟน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอสีโตไนไตรล์ โดยเทคนิค HPLC

- ก. เป็นโครมาโทแกรมของไอบูโพรเฟนในสารละลายมาตรฐาน
 - ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลนด์พลาสมา
 - ค. เป็นโครมาโทแกรมของไอบูโพรเฟนในพลาสมา
- ความเข้มข้น 50.0 มกค./มล. (ใช้แอทเทนชันวอร์ค 2⁴)



รูปที่ 22 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาไอบูโพรเฟน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล โดยเทคนิค HPLC

ก. เป็นโครมาโทแกรมของไอบูโพรเฟนในสารละลายมาตรฐาน

ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลนด์พลาสมา

ค. เป็นโครมาโทแกรมของไอบูโพรเฟนในพลาสมา

ความเข้มข้น 50.0 มก./มล. (ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^4)

ตารางที่ 47 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาไอบูโพรเฟนในพลาสติกเมื่อใช้แอซีไตนไตรรล์
เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน (physical recovery; n=6)

| ก. พื้นที่พิกษา | | | | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 2.0 | 86.31 | 88.99 | 87.00 | 90.38 | 85.01 | 94.98 | 88.78(3.59) | 4.05 |
| 5.0 | 86.68 | 87.75 | 86.43 | 86.03 | 80.85 | 86.59 | 85.72(2.45) | 2.86 |
| 10.0 | 92.63 | 92.71 | 96.12 | 89.55 | 95.78 | 96.57 | 93.89(2.74) | 2.92 |
| 25.0 | 91.34 | 92.75 | 88.72 | 93.73 | 89.26 | 95.94 | 91.96(2.75) | 2.99 |
| 50.0 | 86.50 | 86.39 | 86.88 | 92.94 | 91.02 | 95.18 | 89.82(3.78) | 4.20 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 90.03(4.04) | 4.49 |
| ข. ความสูงพิกษา(มม.) | | | | | | | | |
| 2.0 | 86.21 | 87.88 | 88.24 | 93.55 | 88.24 | 96.55 | 90.11(4.01) | 4.45 |
| 5.0 | 83.05 | 79.10 | 79.69 | 78.79 | 79.03 | 81.67 | 80.22(1.74) | 2.17 |
| 10.0 | 89.84 | 95.68 | 91.60 | 82.31 | 88.89 | 100.00 | 91.39(6.06) | 6.63 |
| 25.0 | 90.30 | 89.12 | 90.33 | 92.99 | 86.83 | 93.42 | 90.50(2.46) | 2.71 |
| 50.0 | 80.45 | 86.46 | 82.80 | 85.53 | 91.82 | 89.21 | 86.04(4.14) | 4.81 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 87.65(5.60) | 6.39 |

* ความเข้มข้นของไอบูโพรเฟน

ตารางที่ 48 เปอร์เซนต์การคืนกลับของยาไอบูโพรเฟนในพลาสติกเมื่อใช้เมทานอล
เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน (physical recovery; n=6)

| ก. พื้นที่ผิวยา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 2.0 | 78.89 | 93.15 | 98.87 | 91.89 | 79.17 | 89.62 | 88.60(8.02) | 9.05 |
| 5.0 | 82.23 | 84.52 | 96.13 | 89.06 | 84.46 | 87.12 | 87.25(4.95) | 5.67 |
| 10.0 | 92.42 | 93.47 | 96.36 | 91.23 | 90.47 | 97.88 | 93.64(2.92) | 3.12 |
| 25.0 | 90.11 | 85.07 | 94.25 | 88.12 | 92.12 | 81.63 | 88.55(4.64) | 5.24 |
| 50.0 | 87.17 | 84.99 | 90.53 | 89.94 | 96.39 | 86.77 | 89.30(4.04) | 4.53 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 89.47(5.32) | 5.94 |
| ข. ความสูงพิคยา(มม.) | | | | | | | | |
| 2.0 | 100.00 | 85.71 | 82.14 | 86.67 | 93.10 | 83.33 | 88.49(6.81) | 7.69 |
| 5.0 | 79.45 | 93.24 | 88.61 | 85.51 | 100.00 | 88.40 | 89.20(6.97) | 7.81 |
| 10.0 | 97.62 | 91.41 | 92.31 | 94.12 | 93.02 | 88.15 | 92.77(3.12) | 3.37 |
| 25.0 | 89.71 | 82.52 | 95.48 | 84.38 | 89.70 | 86.71 | 88.08(4.62) | 5.24 |
| 50.0 | 85.32 | 82.54 | 87.64 | 87.88 | 90.76 | 87.31 | 86.91(2.76) | 3.18 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 89.09(5.20) | 5.84 |

* ความเข้มข้นของไอบูโพรเฟน

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการแยก
 พลาสมาโปรตีนของตัวอย่างพลาสมาของยาไอบูโพรเฟน จึงทำการรวบรวมและ
 สรุปลงแสดงในตารางที่ 49

3.6.ข การ validate วิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ยาไอบูโพรเฟนในพลาสมา ที่ผ่านการ
 ประเมินผลการแยกพลาสมาโปรตีน เป็นการใช้อีทีไอโนไตรล์ และ เมทานอล
 ในการแยกพลาสมาโปรตีน

1) การศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสาร
 แสดงในเทอมของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยา
 ดังรายละเอียดในข้อ 3.6.ก.3)

2) ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่พีคยา
 กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา
 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคยาไอบูโพรเฟนกับ
 ความเข้มข้นของยาในพลาสมา เมื่อใช้อีทีไอโนไตรล์เป็นสารแยกพลาสมา
 โปรตีนที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.1-50.0 มคก./มล.
 พลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 23 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear
 regression คือ

$$Y = 917.9929 + 1.5233 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่พีคยาไอบูโพรเฟน และ X เป็นความเข้มข้นของยาไอบูโพรเฟน
 ในพลาสมา (นาโนกรัม/มล. พลาสมา) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2)
 = 0.99978

ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคยาไอบูโพรเฟน กับ
 ความเข้มข้นของยาในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
 ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.1-50.0 มคก./มล.

พลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 24 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = 1350.7947 + 1.8237 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่ฟลูออโรสโคป และ X เป็นความเข้มข้นของยาไอบูโพรเฟนในพลาสมา (นาโนกรัม/มล. พลาสมา) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) = 0.99992

3) ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์พิจารณาจากโครมาโทแกรมดังรูปที่ 21 และ 22 แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาไอบูโพรเฟนในพลาสมาโดยใช้แอซีโตนไนโตรสและเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน มีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังรายละเอียดในข้อ 3.6.ก. 2) ก) และ ข)

4) การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์

จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยาไอบูโพรเฟนในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 คือ 1.0 มคก./มล. พลาสมา (S/N ratio = 2.88 ± 0.11 ; %CV = 3.91%) และ 1.0 มคก./มล. (S/N ratio เฉลี่ย = 2.35 ± 0.14 ; %CV = 5.76%) สำหรับการวิเคราะห์แอซีโตนไนโตรสและเมทานอล ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 50

5) ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวัน เดียวกันและระหว่างวัน โดยการวิเคราะห์แอซีโตนไนโตรสเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 51 และ 52 ตามลำดับ จะเห็นว่า ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 1.0-50.0 มคก./มล.พลาสมา มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 1.16-8.25%

และ %CV ของพื้นที่ฟีดคอปอยู่ในช่วง 0.92-8.14% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงฟีดคอปอยู่ในช่วง 5.10-9.92% และ %CV ของพื้นที่ฟีดคอปอยู่ในช่วง 5.26-9.96% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยาไอบูโพรเฟนในพลาสติก โดยการแยกพลาสติกโปรตีนด้วยแอซีโตนไนโตรสีนี แม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

สำหรับการแยกพลาสติกโปรตีนด้วยเมทานอล ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาคือ 1.0 - 50.0 มก./มล. พลาสติก ดังแสดงในตารางที่ 53 และ 54 มีค่า %CV ของความสูงฟีดคอปอยู่ในช่วง 0.76-8.69% และ %CV ของพื้นที่ฟีดคอปอยู่ในช่วง 1.86-6.66% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงฟีดคอปอยู่ในช่วง 2.73-8.52% และ %CV ของพื้นที่ฟีดคอปอยู่ในช่วง 1.92-7.65% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยาไอบูโพรเฟนในพลาสติกนี้ แม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

6) ปริมาณต่ำสุดของตัวยานตัวอย่างพลาสติก

สามารถวิเคราะห์ได้

จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาคือ 1.0-50.0 มก./มล. พลาสติก สำหรับความเข้มข้น 1.0 มก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เป็นขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ ให้ค่า % CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 5.35 และ 4.56% เมื่อกำหนดโดยใช้ความสูงฟีด และให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 3.68 และ 8.75% เมื่อกำหนดโดยใช้ความสูงฟีด สำหรับการแยกพลาสติกโปรตีนด้วย แอซีโตนไนโตรสีนี ดังนั้นจึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยาไอบูโพรเฟน 1.0 มก./มล. เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณได้

สำหรับการแยกพลาสติกมาโปรตีนด้วยเมทานอล ผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน ของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 1.0-50.0 มก./มล. พลาสติก สำหรับความเข้มข้น 1.0 มก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์นั้น ให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 2.66 และ 4.15% เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคและให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 6.55 และ 5.28% เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีค ดังนั้นจึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยาไอบูโพรเฟน 1.0 มก./มล. พลาสติก เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณได้

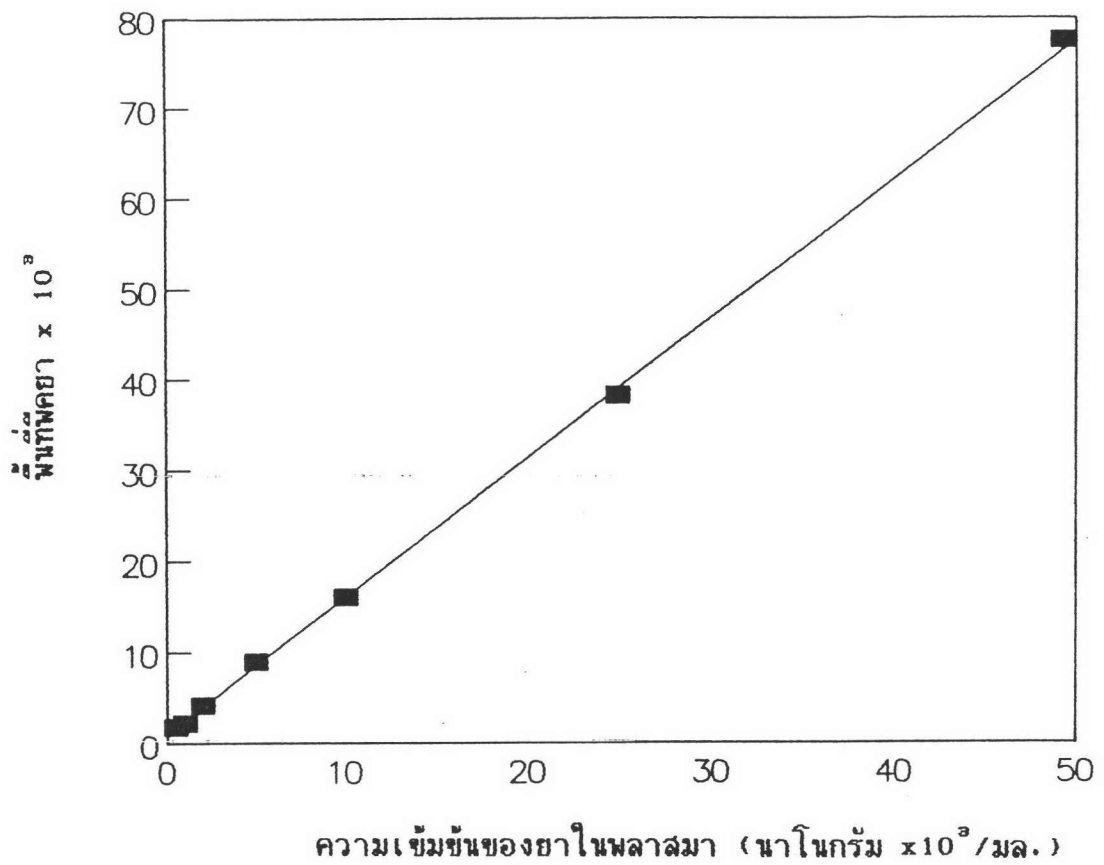
7) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมิน (จากขั้นตอนที่ 4) มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกที่รับมาจำนวน 9 ตัวอย่าง คือ ที่ความเข้มข้น 5.0, 25.0 และ 50.0 มก./มล. (ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% Analytical recovery) ดังแสดงตารางที่ 55 และ 56 พบว่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่แยกพลาสติกมาโปรตีนด้วยแอซีโตนไนโตรส และเมทานอลในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ก็ให้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ = $96.34 \pm 4.62\%$ และ $98.37 \pm 3.05\%$ ตามลำดับ ซึ่งเป็นเครื่องยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้ สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยาไอบูโพรเฟนได้ถูกต้องแม่นยำจริงในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา

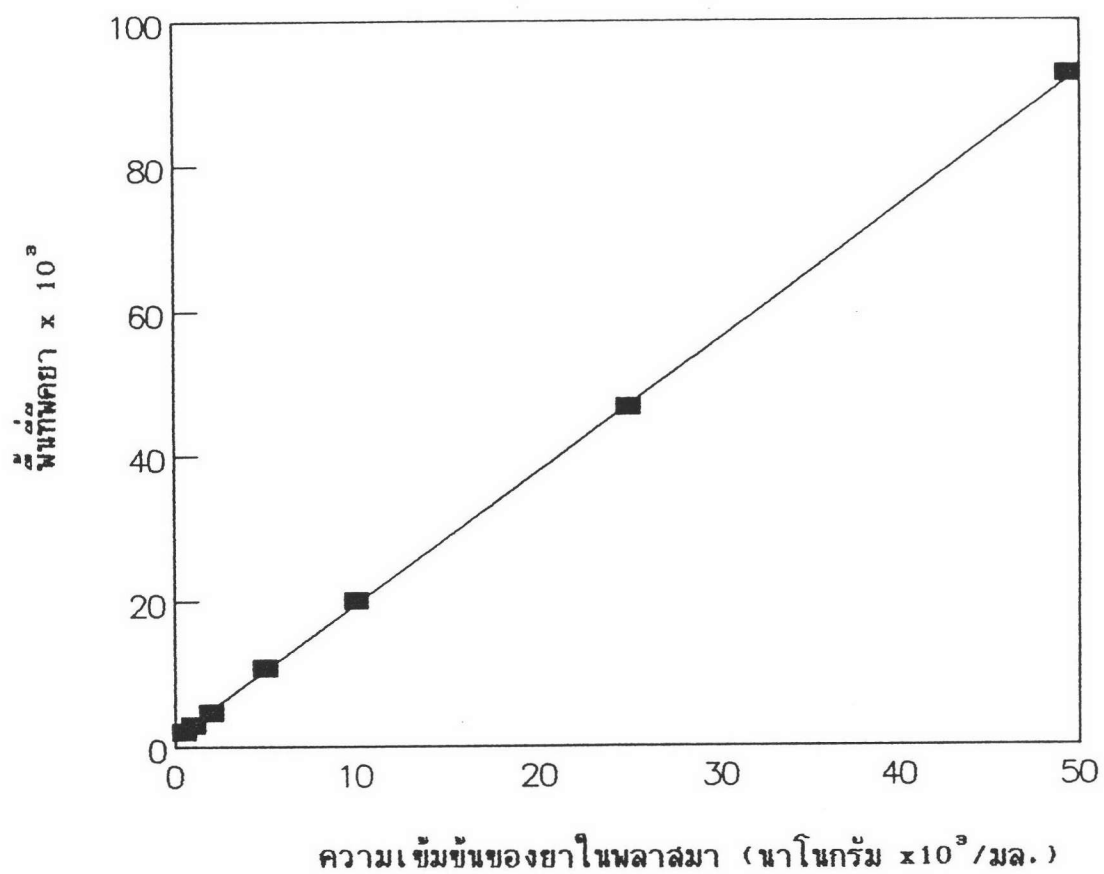
เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาไอบูโพรเฟนในพลาสติก โดยหลักการแยกพลาสติกมาโปรตีน จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 57

ตารางที่ 49 สรุปการวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของยาไอบูโพรเฟน

| | | CH ₃ CN | CH ₃ OH |
|---------------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| Appearance | | pass | pass |
| Chromatogram | | pass | pass |
| %Physical Recovery (n=30) | | pass | pass |
| -peak area | \bar{X} (SD) | 90.03(4.04) | 89.47(5.32) |
| | %CV | 4.49 | 5.94 |
| -peak height | \bar{X} (SD) | 87.65(5.60) | 89.09(5.20) |
| | %CV | 6.39 | 5.84 |



- รูปที่ 23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผิวยาไอบูโพรเฟน กับความเข้มข้นของยาไอบูโพรเฟน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอสिटโนไตรลส์ สมการเส้นตรง คือ $Y = 1.5233X + 917.9929$
 $r^2 = 0.99978$



- รูปที่ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผิวยานไอบูโพรเฟน กับความเข้มข้นของยาไอบูโพรเฟน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล
- สมการเส้นตรง คือ $Y = 1.8237X + 1350.7947$
- $r^2 = 0.99992$

ตารางที่ 50 ค่าอัตราส่วน S/N ของการวิเคราะห์ไอบูโพรเฟนในพลาสติก
เมื่อใช้แอสซีไตไนโตรสและเมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน

| S/N ratio | |
|--------------------------|--------------------------|
| แอสซีไตไนโตรส* | เมทานอล** |
| 2.68 | 2.33 |
| 2.98 | 2.17 |
| 2.95 | 2.35 |
| 2.78 | 2.66 |
| 2.84 | 2.24 |
| 2.78 | 2.30 |
| 2.93 | 2.39 |
| 3.04 | 2.43 |
| 2.89 | 2.38 |
| 2.98 | 2.24 |
| $\bar{X}(SD)=2.88(0.11)$ | $\bar{X}(SD)=2.35(0.14)$ |
| %CV = 3.91 | %CV = 5.76 |

* ความเข้มข้นของไอบูโพรเฟน = 1.0 มคก./มล.

**ความเข้มข้นของไอบูโพรเฟน = 1.0 มคก./มล.

ตารางที่ 51 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาไฮบูโพรเฟนในพลาสมา
ภายในวันเดียวกันเมื่อใช้แอซีเตไนโตรล์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(within-run precision;n=3)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 1.0 | 2446 | 2526 | 2713 | 2561.7(137.0) | 5.35 |
| 2.0 | 4826 | 4765 | 4152 | 4581.0(372.8) | 8.14 |
| 5.0 | 9342 | 8239 | 8936 | 8839.0(557.9) | 6.31 |
| 10.0 | 15944 | 13858 | 16064 | 15288.7(1240.4) | 8.11 |
| 25.0 | 38777 | 38891 | 38227 | 38631.7(355.0) | 0.92 |
| 50.0 | 68276 | 72835 | 77445 | 72852.0(4584.5) | 6.29 |
| ข. ความสูงพีคยา (มม.) | | | | | |
| 1.0 | 1.5 | 1.6 | 1.6 | 1.57(0.06) | 3.68 |
| 2.0 | 2.3 | 2.0 | 2.0 | 2.10(0.17) | 8.25 |
| 5.0 | 5.0 | 5.0 | 4.9 | 4.97(0.06) | 1.16 |
| 10.0 | 10.0 | 9.0 | 8.8 | 9.27(0.64) | 6.94 |
| 25.0 | 23.8 | 23.5 | 24.5 | 23.93(0.51) | 2.14 |
| 50.0 | 45.5 | 47.2 | 51.6 | 48.10(3.15) | 6.54 |

* ความเข้มข้นของไฮบูโพรเฟน

ตารางที่ 52 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาไอบูโพรเฟนในพลาสมา ระหว่างวัน
เมื่อใช้แอซีทานาโตรลส์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 1.0 | 2713 | 2523 | 2599 | 2806 | 2789 | 2686.0(122.3) | 4.56 |
| 2.0 | 4152 | 3583 | 4088 | 4396 | 4712 | 4186.2(416.9) | 9.96 |
| 5.0 | 8936 | 8731 | 10062 | 9092 | 9943 | 9352.8(608.2) | 6.50 |
| 10.0 | 16064 | 16324 | 18930 | 16019 | 16415 | 16750.4(1229.9) | 7.34 |
| 25.0 | 38227 | 41367 | 42497 | 41831 | 44293 | 41643.0(2209.8) | 5.31 |
| 50.0 | 77445 | 80893 | 84114 | 73935 | 75525 | 78382.4(4122.4) | 5.26 |
| ข. ความสูงพีคยา(มม.) | | | | | | | |
| 1.0 | 1.6 | 1.3 | 1.4 | 1.4 | 1.3 | 1.40(0.12) | 8.75 |
| 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.2 | 2.4 | 2.4 | 2.20(0.20) | 9.09 |
| 5.0 | 4.9 | 5.9 | 5.6 | 6.4 | 5.4 | 5.64(0.56) | 9.92 |
| 10.0 | 8.8 | 9.1 | 10.4 | 10.1 | 9.1 | 9.50(0.70) | 7.40 |
| 25.0 | 24.5 | 28.7 | 23.9 | 26.5 | 26.9 | 26.10(1.93) | 7.41 |
| 50.0 | 51.6 | 54.9 | 52.9 | 48.9 | 48.8 | 51.42(2.62) | 5.10 |

* ความเข้มข้นของไอบูโพรเฟน

ตารางที่ 53 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาไอบูโพรเฟนในพลาสมา
ภายในวันเดียวกัน เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(within-run precision;n=3)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 1.0 | 2975 | 2998 | 3125 | 3032.7(80.8) | 2.66 |
| 2.0 | 6338 | 6195 | 6535 | 6356.0(170.7) | 2.68 |
| 5.0 | 10758 | 10771 | 12057 | 11195.3(746.2) | 6.66 |
| 10.0 | 18226 | 20089 | 20218 | 19511.0(1114.7) | 5.71 |
| 25.0 | 43983 | 46678 | 43607 | 44756.0(1675.1) | 3.74 |
| 50.0 | 93878 | 92554 | 90469 | 92300.3(1718.6) | 1.86 |
| ข. ความสูงพีคยา (มม.) | | | | | |
| 1.0 | 2.2 | 2.3 | 2.5 | 2.33(0.15) | 6.55 |
| 2.0 | 4.1 | 4.0 | 4.2 | 4.10(0.10) | 2.44 |
| 5.0 | 6.3 | 7.0 | 7.5 | 6.93(0.60) | 8.69 |
| 10.0 | 13.1 | 13.0 | 13.2 | 13.10(0.10) | 0.76 |
| 25.0 | 32.2 | 31.0 | 31.5 | 31.57(0.60) | 1.91 |
| 50.0 | 66.5 | 67.1 | 65.8 | 66.47(0.65) | 0.98 |

* ความเข้มข้นของไอบูโพรเฟน

ตารางที่ 54 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาไฮโดรโครติโซนในพลาสมา ระหว่างวัน
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่ผิวยา | | | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|--------|-------|--------|-----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 1.0 | 2998 | 2859 | 2901 | 2715 | 3011 | 2896.8(120.2) | 4.15 |
| 2.0 | 6195 | 5417 | 5699 | 5671 | 6534 | 5903.2(451.4) | 7.65 |
| 5.0 | 10771 | 10377 | 12292 | 10614 | 11325 | 11075.8(764.2) | 6.90 |
| 10.0 | 20089 | 20327 | 21122 | 20317 | 20449 | 20460.8(391.8) | 1.92 |
| 25.0 | 46678 | 52047 | 52309 | 48186 | 48205 | 49485.0(2536.9) | 5.13 |
| 50.0 | 92554 | 94320 | 100303 | 95317 | 100478 | 96594.4(3604.4) | 3.73 |
| ข. ความสูงพีคยา(มม.) | | | | | | | |
| 1.0 | 2.3 | 2.0 | 2.1 | 2.2 | 2.2 | 2.16(0.11) | 5.28 |
| 2.0 | 3.8 | 3.1 | 3.3 | 3.2 | 3.2 | 3.32(0.28) | 8.36 |
| 5.0 | 7.0 | 7.2 | 7.7 | 7.2 | 7.2 | 7.26(0.26) | 3.59 |
| 10.0 | 13.0 | 15.2 | 14.8 | 14.0 | 14.1 | 14.22(0.84) | 5.93 |
| 25.0 | 31.0 | 38.1 | 38.5 | 35.0 | 34.9 | 35.50(3.03) | 8.52 |
| 50.0 | 67.1 | 70.5 | 72.0 | 69.6 | 71.4 | 70.12(1.92) | 2.73 |

* ความเข้มข้นของไฮโดรโครติโซน

ตารางที่ 55 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยาไอบูโพรเฟนในพลาสติก
เมื่อใช้แอซีเตไนด์เป็นสารแยกพลาสติกมาปรตึน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสติก (นาโนกรัม/มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัม/มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|---|---|---|
| 5000 | 4567.7 | 91.35 |
| 5000 | 4444.1 | 88.88 |
| 5000 | 4759.9 | 95.20 |
| 25000 | 23275.1 | 93.09 |
| 25000 | 24544.3 | 98.18 |
| 25000 | 25478.4 | 101.91 |
| 50000 | 49934.7 | 99.87 |
| 50000 | 50149.0 | 100.30 |
| 50000 | 49142.5 | 98.28 |
| | | $\bar{x}(SD)=96.34(4.45)$ %CV = 4.62 |

ตารางที่ 56 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยาไอบูโพรเฟนในพลาสติก
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสติก (นาโนกรัม/มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัม/มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|---|---|---|
| 5000 | 4799.7 | 95.99 |
| 5000 | 5094.8 | 101.90 |
| 5000 | 4585.4 | 91.71 |
| 25000 | 24636.9 | 98.55 |
| 25000 | 24924.5 | 99.70 |
| 25000 | 25100.8 | 100.40 |
| 50000 | 49677.9 | 99.36 |
| 50000 | 49940.1 | 99.88 |
| 50000 | 48911.3 | 97.82 |
| | | $\bar{X}(SD)=98.37(3.00)$ %CV = 3.05 |

ตารางที่ 57 สรุปการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาไฮโดรโคโดนโดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน

| | conc. ($\mu\text{g/ml}$) | CH_3CN | CH_3OH |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| <u>%Phy.Reco.</u> (n=30) | 2.0-50.0 | | |
| -peak area \bar{X} (SD) | | 90.03(4.04) | 89.47(5.32) |
| %CV | | 4.49 | 5.94 |
| -peak height \bar{X} (SD) | | 87.65(5.60) | 89.09(5.20) |
| %CV | | 6.39 | 5.84 |
| <u>Linearity</u> | 2.0-50.0 | | |
| Eq. Y= | | 917.9929+1.5233X | 1350.7947+1.8237X |
| r^2 | | 0.99978 | 0.99992 |
| <u>Specificity</u> | | | |
| <u>LLD</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 1.0 | 1.0 |
| <u>Precision</u> %CV | 2.0-50.0 | | |
| -within-run (n=3) | | | |
| peak area | | 0.92-8.14 | 1.86-6.66 |
| peak height | | 1.16-8.25 | 0.76-8.69 |
| -between-run (n=5) | | | |
| peak area | | 4.56-9.96 | 1.92-7.65 |
| peak height | | 5.10-9.92 | 2.73-8.52 |
| <u>LLQ</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 1.0 | 1.0 |
| <u>%Anal.Reco.</u> (n=9) | | | |
| \bar{X} (SD) | | 96.34(4.45) | 98.37(3.00) |
| %CV | | 4.62 | 3.05 |

เนื่องจากผลการศึกษาการวิเคราะห์ยาโอบูโพรเฟนในพลาสมาในแง่ การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน และ validate วิธีวิเคราะห์นั้น ปรากฏว่าผ่านการประเมินทั้งการใช้ แอซีโตนไนโตรสและเมทานอลเป็นสารแยก พลาสมาโปรตีน ดังนั้นเพื่อเป็นการทดสอบความแตกต่างในเชิงสถิติของค่า เบอร์เซนต์การคืนกลับของยาจากการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้งสองตัวดังกล่าว ผลจากตารางที่ 47 และ 48 ทั้งเมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและความสูงพีคยา จึงทำการเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าว โดยใช้ 2 tailed unpaired student t-test (รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ง) ผลการทดสอบปรากฏว่า ค่าเบอร์เซนต์การคืนกลับของยา จากการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้งสองตัว ทั้งเมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและความสูงพีคยา ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นั่นคือทั้ง เมทานอลและแอซีโตนไนโตรส สามารถใช้เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ยาโอบูโพรเฟนในพลาสมา ได้ผลที่ไม่ต่างกัน

3.7 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ยาอินโดเมทาซินในพลาสมา

3.7.ก การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน (ขั้นที่ 1)

1) ลักษณะตัวอย่างพลาสมาหลังเติมสารแยกพลาสมา โปรตีนลงในตัวอย่างพลาสมา

ก) เมื่อใช้แอซีโตนไนโตรสเป็นสารแยกพลาสมา โปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสมาโปรตีนจับกันแน่น เป็นก้อนขนาดใหญ่สีเหลืองอมส้มเกาะติดที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาตรน้อย ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่า

- สารละลายใสที่แยกออกมาเป็นสีเหลือง มีความใสสะอาด มีปริมาตรมาก มี pH ประมาณ 7

ข) เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกไมโครติน

- ลักษณะตะกอนพลาสติกไมโครติน เป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อน จับกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณมาก ผิวหน้าตะกอนฟุ้งกระจายเล็กน้อย เมื่อเขย่าอย่างแรง
- สารละลายสีที่แยกออกมา เป็นสีเหลืองอ่อน มีความใสสะอาด มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่า ของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

2) ลักษณะโครมาโทแกรม

ก) เมื่อใช้แอสีโตนไทรล์เป็นสารแยกพลาสติกไมโครติน

จากโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสติกและตัวอย่างพลาสติก จะเห็นว่าพีคของยาบนโครมาโทแกรม ปรากฏเป็นพีคเดี่ยว และไม่ถูกรบกวนจากพีคของ endogenous ซึ่งมีขนาดใหญ่ เนื่องจากพีคของ endogenous ถูกชะออกมาได้หมดก่อนพีคยา ดังแสดงในรูปที่ 25 พิจารณาจากพีคของอินโดเมทาซิน เมื่ออยู่ในพลาสติกและเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐานของสารแยกพลาสติกไมโครตินชนิดเดียวกัน จะเห็นว่า มีลักษณะเหมือนกันและมีค่าเวลาที่รีเทนเนคชั่นที่เท่ากัน (อินโดเมทาซิน = 4.69 นาที ทั้งเมื่ออยู่ในพลาสติกและสารละลายมาตรฐาน ตามลำดับ) แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

ข) เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสติกไมโครติน

โครมาโทแกรมที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกับก. แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์พิจารณาจากค่าเวลาที่รีเทนเนคชั่นของยาอินโดเมทาซิน เมื่ออยู่ในพลาสติก และเมื่ออยู่ในสารละลาย

มาตรฐานของสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกันมีค่าใกล้เคียงกัน (อินโดเมทาซิน = 4.72 นาที่ และ 4.77 นาที่ เมื่ออยู่ในพลาสติก และสารละลายมาตรฐาน ตามลำดับ) ดังแสดงในรูปที่ 26

3) เบอร์เซนต์การคืนกลับของยา

ผลการทดลองหาเบอร์เซนต์การคืนกลับของยาในพลาสติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้แอสีโตไนโตรัสเป็นสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกันมีค่า = $104.28 \pm 3.12\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า = $103.12 \pm 3.80\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของพีคยา ดังแสดงในตารางที่ 58 และเมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกันมีค่า = $100.11 \pm 4.18\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า = $104.78 \pm 3.71\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีคยา ดังแสดงในตารางที่ 59 ซึ่งจะเห็นว่าเบอร์เซนต์การคืนกลับของยาในพลาสติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้แอสีโตไนโตรัสและเมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกัน มีแนวโน้มที่ให้ค่าเกิน 100% จึงไม่ผ่านเกณฑ์การประเมิน

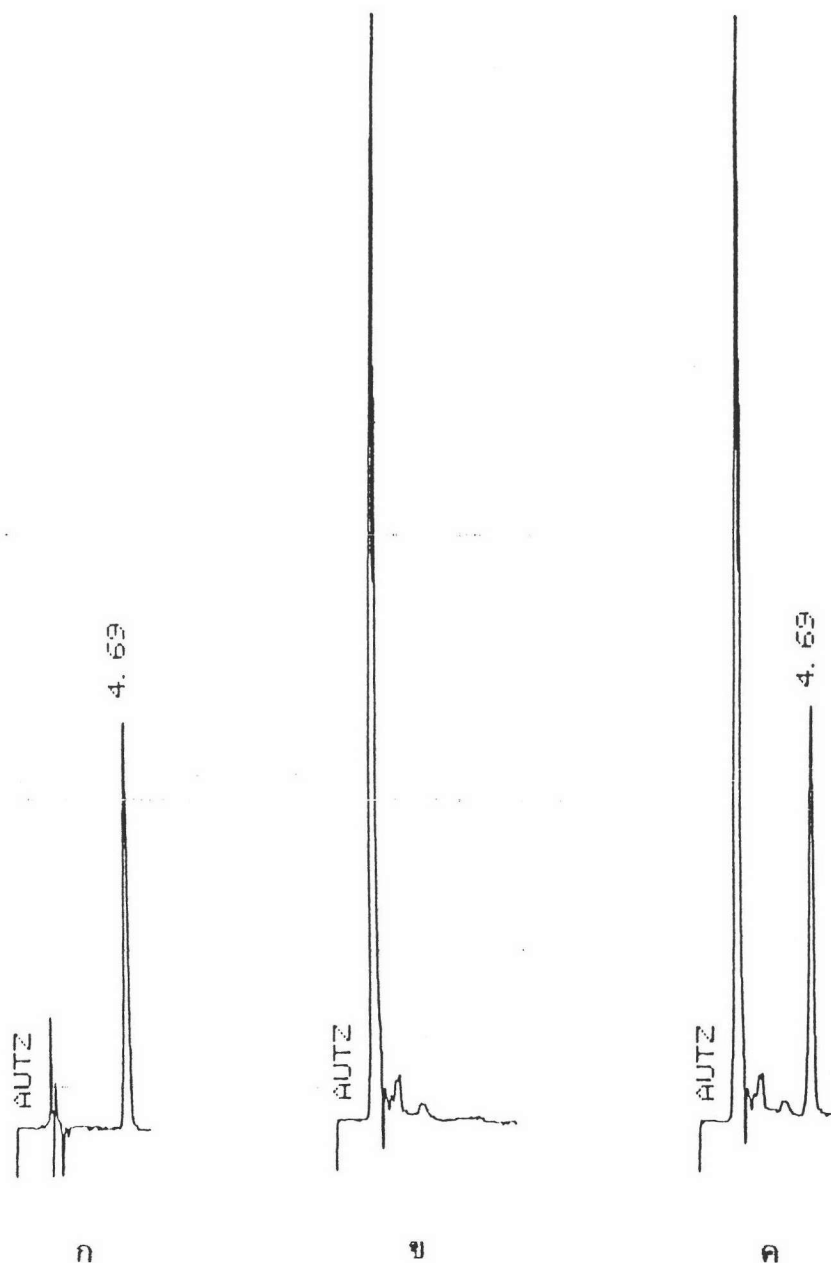
ดังนั้นการทดลองขั้นต่อไป จะเป็นการวิเคราะห์ปริมาณยาอินโดเมทาซิน โดยใช้ซิงค์ซัลเฟต ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ประจุบวก ร่วมกับแอสีโตไนโตรัสและเมทานอล ตามลำดับ ในการแยกพลาสติกชนิดเดียวกัน

3.7.ก การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสติกชนิดเดียวกัน (ขั้นที่ 2)

1) ลักษณะตัวอย่างพลาสติกหลังเติมสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกันลงในตัวอย่างพลาสติก

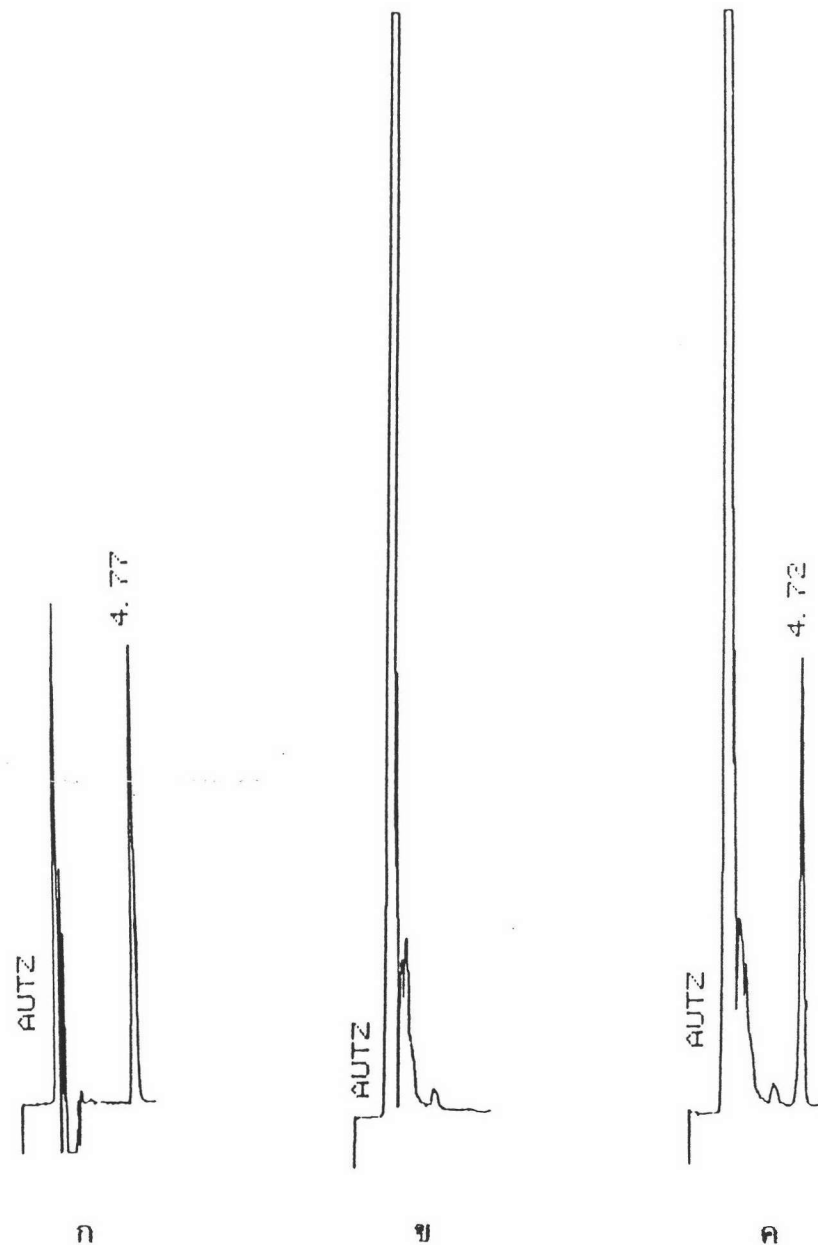
ก) เมื่อใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสีโตไนโตรัสเป็นสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกัน

- ลักษณะตะกอนพลาสติกชนิดเดียวกัน เป็นผงละเอียดสีขาวนวล จับกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาตรน้อย ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่า



รูปที่ 25 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาอินโดเมทาซิน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอสिटโนไตรล โดยเทคนิค HPLC

- ก. เป็นโครมาโทแกรมของอินโดเมทาซินในสารละลายมาตรฐาน
- ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบบลค์พลาสมา
- ค. เป็นโครมาโทแกรมของอินโดเมทาซินในพลาสมา
ความเข้มข้น 6.0 มคก./มล. (ใช้แอนเทนนูเอชั่น 2^4)



รูปที่ 26 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาอินโดเมทาซิน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล โดยเทคนิค HPLC

ก. เป็นโครมาโทแกรมของอินโดเมทาซินในสารละลายมาตรฐาน

ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลนด์พลาสมา

ค. เป็นโครมาโทแกรมของอินโดเมทาซินในพลาสมา

ความเข้มข้น 6.0 มคก./มล. (ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^4)

ตารางที่ 58 เปรอ์เซนต์การคืนกลับของยาอินโดเมทาซินในพลาสมาเมื่อใช้แอสปีโรนไทรอัส
เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (physical recovery;n=6)

| ก. พื้นที่ผิวดยา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.6 | 103.67 | 105.68 | 103.73 | 105.37 | 105.80 | 99.62 | 103.98(2.34) | 2.25 |
| 1.0 | 108.79 | 109.08 | 109.29 | 109.43 | 109.73 | 106.79 | 108.85(1.06) | 0.97 |
| 3.0 | 106.48 | 105.36 | 106.65 | 107.50 | 106.61 | 100.84 | 105.57(2.42) | 2.29 |
| 6.0 | 101.74 | 102.30 | 102.41 | 102.56 | 102.06 | 103.73 | 102.47(0.68) | 0.67 |
| 10.0 | 100.48 | 101.25 | 100.05 | 100.14 | 99.60 | 101.72 | 100.54(0.80) | 0.79 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 104.28(3.26) | 3.12 |
| ข. ความสูงผิวดยา(มม.) | | | | | | | | |
| 0.6 | 105.45 | 98.28 | 113.46 | 103.64 | 103.64 | 109.09 | 105.59(5.20) | 4.92 |
| 1.0 | 106.45 | 110.11 | 106.74 | 107.14 | 103.22 | 108.79 | 107.08(2.35) | 2.19 |
| 3.0 | 103.97 | 100.00 | 99.63 | 103.04 | 104.25 | 96.15 | 101.17(3.15) | 3.12 |
| 6.0 | 100.38 | 100.37 | 100.00 | 100.00 | 99.45 | 100.00 | 100.03(0.34) | 0.34 |
| 10.0 | 101.32 | 102.07 | 100.91 | 100.66 | 104.62 | 100.89 | 101.74(1.49) | 1.47 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 103.12(3.92) | 3.80 |

* ความเข้มข้นของอินโดเมทาซิน

ตารางที่ 59 เปอร์เซนต์การคืนกลับของยาอินโดเมทาซินในพลาสมาเมื่อใช้เมทานอล
เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (physical recovery;n=6)

| ก. พื้นที่พิกะยา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.6 | 104.68 | 106.42 | 105.41 | 104.33 | 104.15 | 109.05 | 105.67(1.85) | 1.75 |
| 1.0 | 95.86 | 101.49 | 101.43 | 98.72 | 99.41 | 99.79 | 99.45(2.08) | 2.09 |
| 3.0 | 106.38 | 103.94 | 100.51 | 100.50 | 101.29 | 102.06 | 102.45(2.31) | 2.26 |
| 6.0 | 95.04 | 97.04 | 95.16 | 96.82 | 97.25 | 95.95 | 96.21(0.97) | 1.00 |
| 10.0 | 95.46 | 91.68 | 94.51 | 99.99 | 99.70 | 99.18 | 96.75(3.39) | 3.50 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 100.11(4.18) | 4.18 |
| ข. ความสูงพิกะยา(มม.) | | | | | | | | |
| 0.6 | 100.00 | 109.23 | 104.62 | 108.33 | 108.33 | 101.56 | 105.34(3.91) | 3.71 |
| 1.0 | 106.86 | 102.86 | 106.93 | 99.10 | 100.00 | 100.00 | 102.62(3.54) | 3.45 |
| 3.0 | 105.02 | 97.64 | 102.67 | 106.82 | 100.00 | 103.67 | 102.64(3.35) | 3.26 |
| 6.0 | 108.39 | 106.25 | 110.35 | 104.83 | 104.87 | 108.70 | 107.23(2.26) | 2.11 |
| 10.0 | 111.18 | 111.01 | 108.48 | 102.44 | 100.00 | 103.28 | 106.06(4.78) | 4.50 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 104.78(3.89) | 3.71 |

* ความเข้มข้นของอินโดเมทาซิน

- สารละลายไอสที่แยกออกมาเป็นสีเหลือง
มีความใสสะอาด มีปริมาตรประมาณ 2 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH
ประมาณ 7

ข) เมื่อใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอลเป็นสาร
แยกพลาสติกโปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสติกโปรตีน ลักษณะ
เช่นเดียวกับ ก)

- สารละลายไอสที่แยกออกมา มีลักษณะ
เช่นเดียวกับ ก)

2) ลักษณะโครมาโทแกรม

ก) เมื่อใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสซีโตไนโตรล
เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน

จากโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสติกและ
ตัวอย่างพลาสติก จะเห็นว่าพีคของยาบนโครมาโทแกรมปรากฏเป็นพีคเดี่ยวและ
ไม่ถูกรบกวนจากพีคของ endogenous ซึ่งมีขนาดใหญ่ เนื่องจากพีคของ
endogenous ถูกชะออกมาได้หมดก่อนพีคยา ดังแสดงในรูปที่ 27 พิจารณาจาก
พีคของยาอินโดเมทาซิน เมื่ออยู่ในพลาสติกและเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐาน
ของสารแยกพลาสติกโปรตีนชนิดเดียวกัน จะเห็นว่ามีลักษณะเหมือนกันและมีค่า
เวลาที่รีเทนในคอลัมน์ที่เท่ากัน (อินโดเมทาซิน = 4.67 นาที ทั้งเมื่ออยู่ใน
พลาสติกและสารละลายมาตรฐาน) แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของ
วิธีวิเคราะห์

ข) เมื่อใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล
เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน

โครมาโทแกรมที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกับก.

แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ พิจารณาจากค่าเวลาที่
รีเทนในคอลัมน์ของยาอินโดเมทาซินเมื่ออยู่ในพลาสติก และเมื่ออยู่ในสารละลาย

มาตรฐานของสารแยกพลาสติกมาโปรตีนชนิดเดียวกันมีค่าเท่ากัน (อินโดเมทาซิน = 4.71 นาที่ เมื่ออยู่ในพลาสติกและสารละลายมาตรฐาน) ดังแสดงในรูปที่ 28

3) เพอร์เซนต์การคืนกลับของยา

ผลการทดลองหาเปอร์เซนต์การคืนกลับของยาในพลาสติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสซีโตไนโตรล์ เป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน มีค่า = $92.25 \pm 3.19\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า = $90.24 \pm 4.52\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของพีคยา และเมื่อใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีนมีค่า = $99.28 \pm 3.02\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า $93.14 \pm 5.55\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของพีคยา โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก ดังแสดงในตารางที่ 60 และ 61 ตามลำดับ

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการแยกพลาสติกมาโปรตีนของตัวอย่างพลาสติกของยาอินโดเมทาซิน จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 62

3.7.ข การ validate วิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ยาอินโดเมทาซินในพลาสติก ที่ผ่านการประเมินผลการแยกพลาสติกมาโปรตีน เป็นการใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสซีโตไนโตรล์ และซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล ในการแยกพลาสติกมาโปรตีน

1) การศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสาร

แสดงในทอมของเปอร์เซนต์การคืนกลับของยาดังรายละเอียดในข้อ 3.7.ก. 3)

2) ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่พีคยากับ

ความเข้มข้นของยาในพลาสติก

ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคยาอินโดเมทาซินกับ

ความเข้มข้นของยาในพลาสติก เมื่อใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสซีโตไนโตรล์ เป็น

สารแยกพลาสติกไมโปรตีน ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาคือ 0.1-10.0 มคก./มล. พลาสติก ดังแสดงในรูปที่ 29 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = 2073.9725 + 24.2638 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่ฟิคยาอินโดเมทาซิน และ X เป็นความเข้มข้นของยาอินโดเมทาซินในพลาสติก (นาโนกรัม/มล. พลาสติก) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) = 0.99908

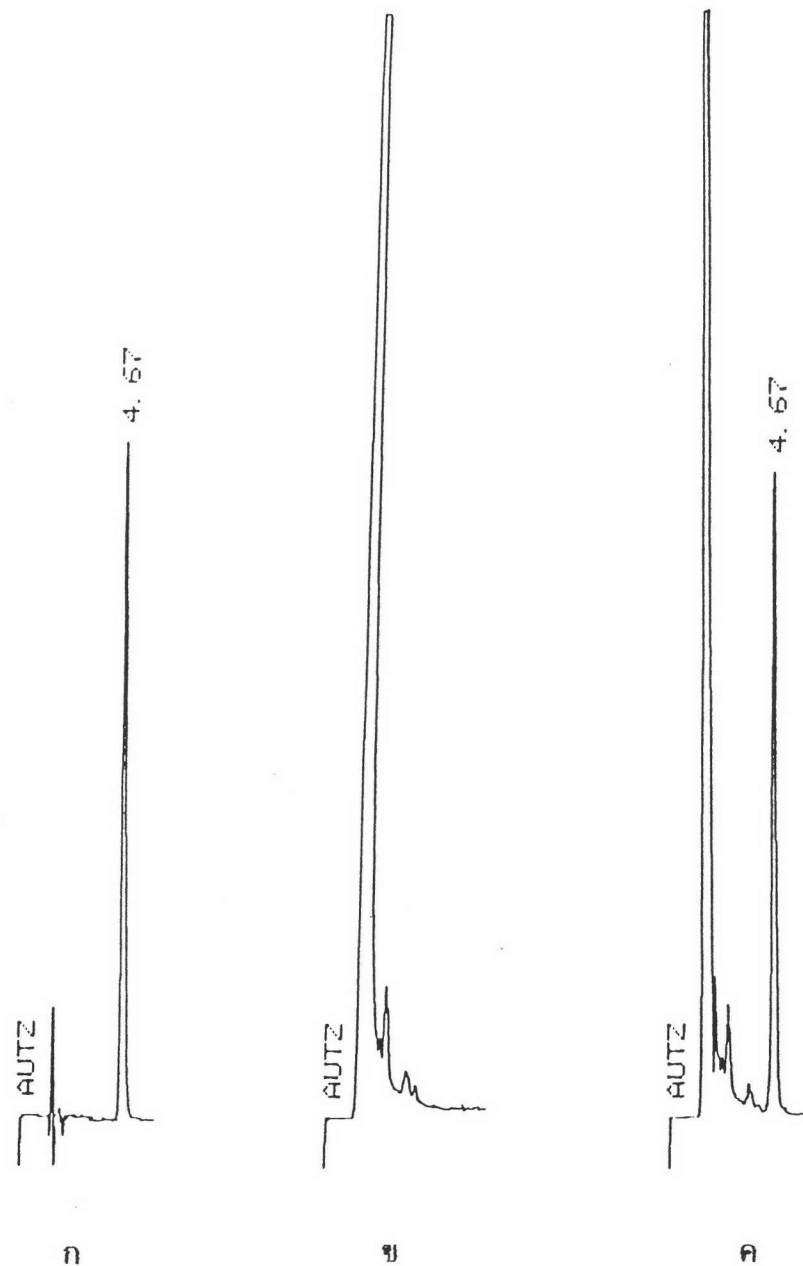
ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ฟิคยาอินโดเมทาซิน กับความเข้มข้นของยาในพลาสติก เมื่อใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกไมโปรตีน ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาคือ 0.1-10.0 มคก./มล. พลาสติก ดังแสดงในรูปที่ 30 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = 2295.7507 + 20.9924 X$$

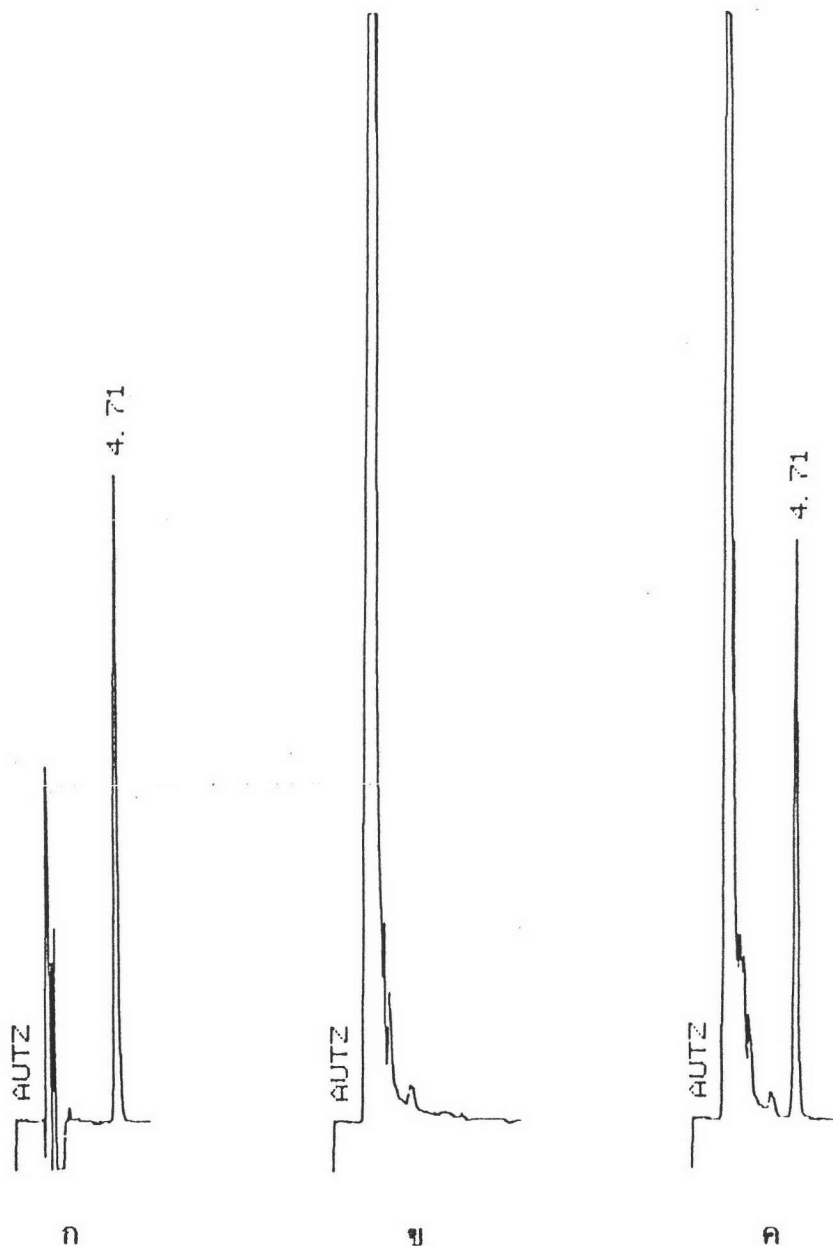
เมื่อ Y เป็นพื้นที่ฟิคยาอินโดเมทาซิน และ X เป็นความเข้มข้นของยาอินโดเมทาซินในพลาสติก (นาโนกรัม/มล. พลาสติก) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) = 0.99998

3) ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์พิจารณาจากโครมาโทแกรมดังรูปที่ 27 และ 28 แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาอินโดเมทาซินในพลาสติก โดยใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอซีโตไนโตรล และซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล เป็นสารแยกพลาสติกไมโปรตีน มีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังรายละเอียดในข้อ 3.7.ก 2)ก)และข) (ขั้นที่ 2)



รูปที่ 27 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาอินโดเมทาซิน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสีโตไนไตรล์ โดยเทคนิค HPLC
 ก. เป็นโครมาโทแกรมของอินโดเมทาซินในสารละลายมาตรฐาน
 ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลนด์พลาสมา
 ค. เป็นโครมาโทแกรมของอินโดเมทาซินในพลาสมา
 ความเข้มข้น 10.0 มคก./มล. (ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^5)



- รูปที่ 28** โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาอินโดเมทาซิน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล โดยเทคนิค HPLC
- ก. เป็นโครมาโทแกรมของอินโดเมทาซินในสารละลายมาตรฐาน
 - ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลนด์พลาสมา
 - ค. เป็นโครมาโทแกรมของอินโดเมทาซินในพลาสมา
- ความเข้มข้น 10.0 มคก./มล. (ใช้เอกเทนนูเอชั่น 2^5)

ตารางที่ 60 เปรอ์เซนต์การคืนกลับของยาอินโดเมทาซินในพลาสมา เมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟต ร่วมกับแอสปีโรนไทรอัสเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (physical recovery; n=6)

| ก. พื้นที่พิกษา | | | | | | | | |
|----------------------------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.6 | 97.29 | 101.51 | 94.68 | 96.48 | 96.71 | 89.56 | 96.04(3.90) | 4.06 |
| 1.0 | 91.54 | 93.50 | 92.12 | 92.33 | 91.86 | 90.50 | 91.98(0.98) | 1.07 |
| 3.0 | 91.30 | 93.10 | 97.12 | 91.10 | 92.10 | 91.25 | 92.66(2.31) | 2.49 |
| 6.0 | 88.96 | 89.98 | 90.18 | 89.69 | 89.71 | 90.36 | 89.81(0.49) | 0.55 |
| 10.0 | 89.05 | 91.80 | 90.88 | 91.04 | 91.73 | 90.00 | 90.75(1.06) | 1.17 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 92.25(2.94) | 3.19 |
| ข. ความสูงพิกษา(มม.) | | | | | | | | |
| 0.6 | 82.14 | 91.84 | 82.14 | 90.00 | 97.96 | 100.00 | 90.68(7.58) | 8.36 |
| 1.0 | 88.37 | 95.18 | 89.89 | 93.98 | 84.70 | 91.57 | 90.62(3.84) | 4.23 |
| 3.0 | 87.45 | 93.50 | 94.09 | 87.14 | 87.45 | 86.06 | 89.28(3.54) | 3.96 |
| 6.0 | 88.51 | 89.52 | 87.20 | 89.96 | 89.12 | 89.67 | 89.00(1.01) | 1.14 |
| 10.0 | 91.91 | 93.02 | 91.98 | 93.94 | 91.54 | 87.30 | 91.62(2.29) | 2.50 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 90.24(4.08) | 4.52 |

* ความเข้มข้นของอินโดเมทาซิน

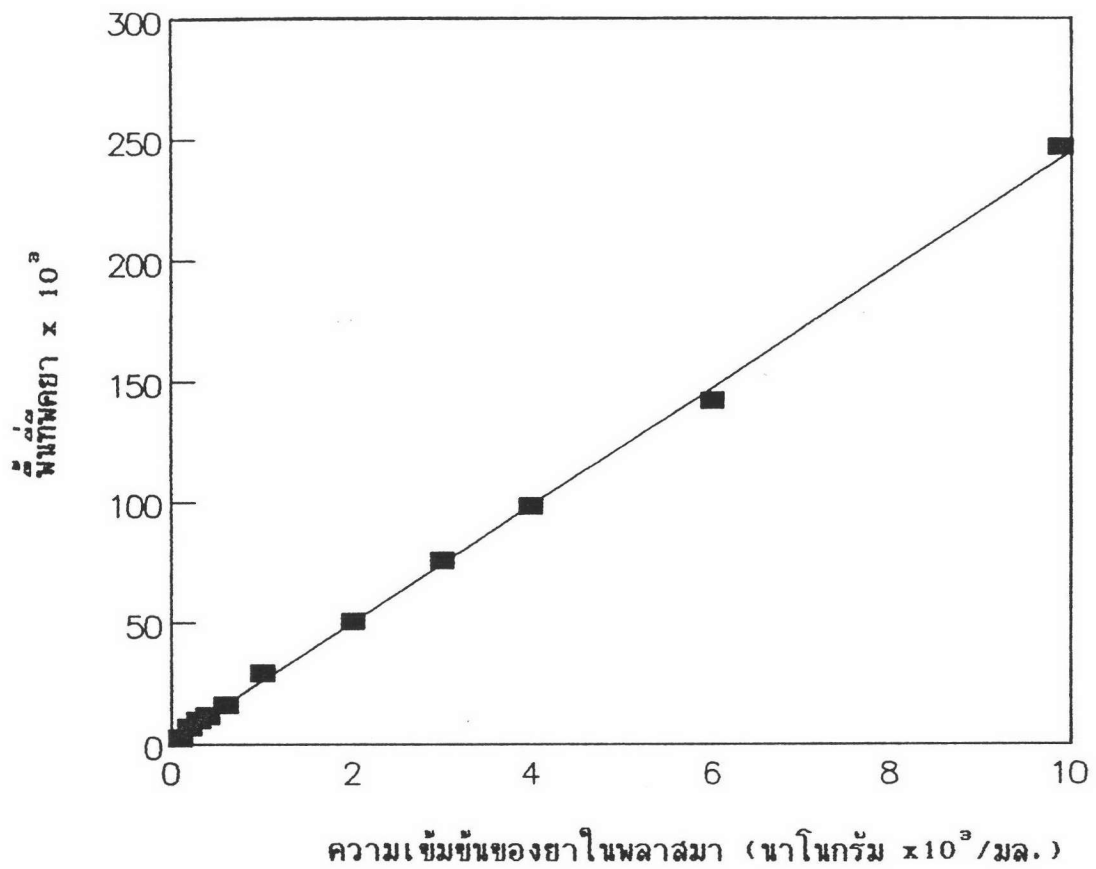
ตารางที่ 61 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาอินโดเมทาซินในพลาสมา เมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟต ร่วมกับเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (physical recovery; n=6)

| ก. พื้นที่พิกษา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.6 | 102.37 | 100.15 | 92.00 | 100.77 | 101.21 | 98.64 | 99.19(3.73) | 3.76 |
| 1.0 | 100.99 | 100.03 | 89.72 | 99.74 | 100.93 | 99.89 | 98.55(4.36) | 4.42 |
| 3.0 | 100.12 | 98.20 | 101.98 | 100.65 | 99.32 | 100.60 | 100.14(1.29) | 1.29 |
| 6.0 | 100.48 | 98.07 | 97.83 | 97.87 | 101.10 | 99.67 | 99.17(1.44) | 1.45 |
| 10.0 | 101.65 | 100.20 | 100.33 | 100.43 | 91.86 | 101.69 | 99.36(3.73) | 3.76 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 99.28(3.00) | 3.02 |
| ข. ความสูงพิกษา(มม.) | | | | | | | | |
| 0.6 | 84.00 | 89.13 | 81.03 | 100.00 | 90.38 | 93.88 | 89.74(6.81) | 7.59 |
| 1.0 | 88.37 | 87.21 | 83.33 | 86.96 | 91.76 | 90.59 | 88.04(2.98) | 3.39 |
| 3.0 | 95.42 | 92.37 | 95.58 | 98.71 | 94.33 | 98.35 | 95.79(2.41) | 2.52 |
| 6.0 | 97.36 | 98.32 | 93.81 | 92.20 | 95.09 | 94.40 | 95.20(2.28) | 2.39 |
| 10.0 | 100.74 | 97.74 | 97.44 | 98.77 | 90.33 | 96.62 | 96.94(3.53) | 3.65 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 93.14(5.17) | 5.55 |

* ความเข้มข้นของอินโดเมทาซิน

ตารางที่ 62 สรุปรูปการวิเคราะห์ผลการแยกผลาสมาโปรตีนของยาอินโดเมทาซิน

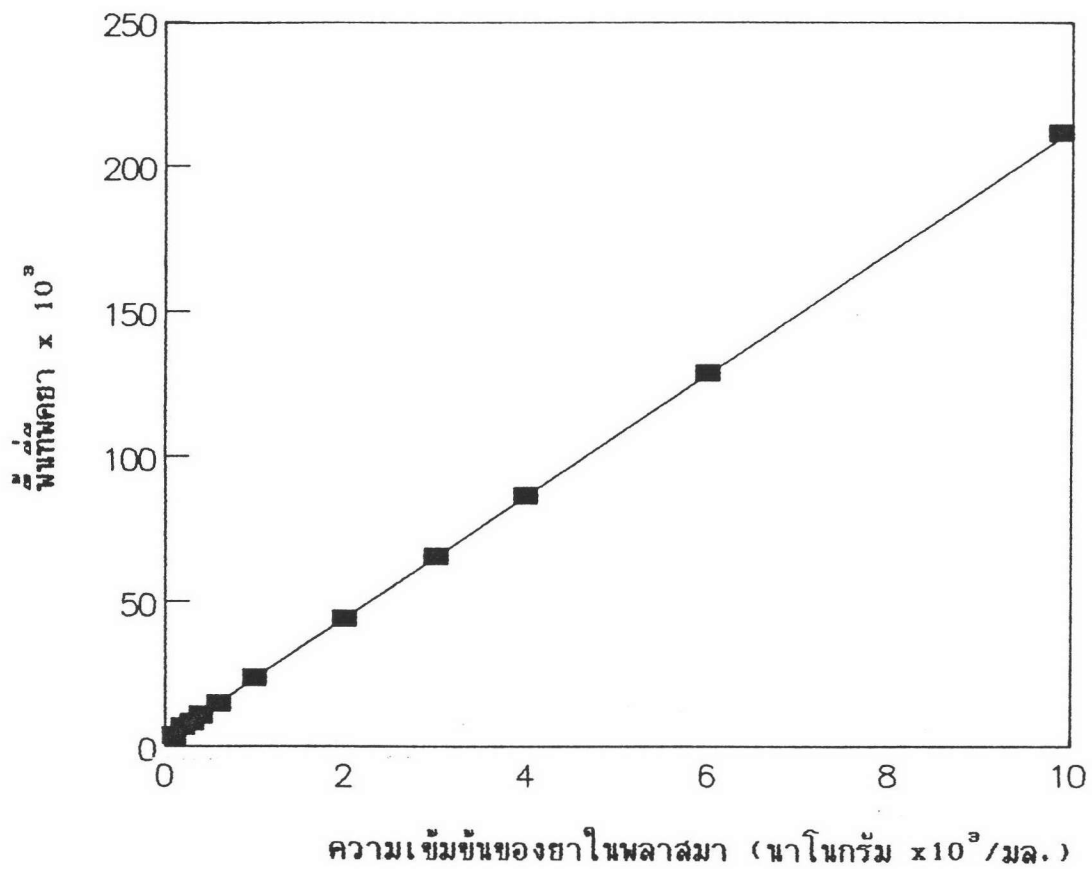
| | | CH ₃ CN | CH ₃ OH |
|---------------------------|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Appearance | | pass | pass |
| Chromatogram | | pass | pass |
| %Physical Recovery (n=30) | | fail | fail |
| -peak area | \bar{X} (SD) | 104.28(3.26) | 100.11(4.18) |
| | %CV | 3.12 | 4.18 |
| -peak height | \bar{X} (SD) | 103.12(3.92) | 104.78(3.89) |
| | %CV | 3.80 | 3.71 |
| | | Zn ²⁺ +CH ₃ CN | Zn ²⁺ +CH ₃ OH |
| Appearance | | pass | pass |
| Chromatogram | | pass | pass |
| %Physical Recovery (n=30) | | pass | pass |
| -peak area | \bar{X} (SD) | 92.25(2.94) | 99.28(3.00) |
| | %CV | 3.19 | 3.02 |
| -peak height | \bar{X} (SD) | 90.24(4.08) | 93.14(5.17) |
| | %CV | 4.52 | 5.55 |



รูปที่ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผิวยานินโดเมทาซิน กับความเข้มข้นของยานินโดเมทาซิน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟต ร่วมกับแอสซีโตไนโตรล์

สมการเส้นตรง คือ $Y = 24.2638X + 2073.9725$

$$r^2 = 0.99908$$



รูปที่ 30 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผิวยานอินโดเมทาซิน กับความเข้มข้นของยาอินโดเมทาซิน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟต ร่วมกับเมทานอล

สมการเส้นตรง คือ $Y = 20.9924X + 2295.7507$

$$r^2 = 0.99998$$

4) การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์

จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยา

อินโดเมทาซินในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 คือ 0.1 มคก./มล. พลาสมา (S/N ratio = 3.22 ± 0.17 ; %CV = 5.40%) และ 0.1 มคก./มล. (S/N ratio เฉลี่ย = 4.17 ± 0.13 ; %CV = 7.39%) สำหรับการวิเคราะห์สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสีโตไนโตรส และการวิเคราะห์สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 63

5) ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน

และระหว่างวัน โดยการวิเคราะห์สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสีโตไนโตรสเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 64 และ 65 ตามลำดับ จะเห็นว่าการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 1.0-10.0 มคก./มล. พลาสมา มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 1.12-5.97% และ %CV ของพื้นที่พีคยาอยู่ในช่วง 1.27-7.89% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 2.68-5.71% และ %CV ของพื้นที่พีคยาอยู่ในช่วง 1.56-7.91% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยาอินโดเมทาซินในพลาสมา โดยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับ แอสีโตไนโตรสนี้ แม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ยาในวันเดียวกันหรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

สำหรับการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลาย

ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.1-10.0 มคก./มล. ดังแสดงในตารางที่ 66 และ 67 มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 1.34-6.91% และ %CV ของพื้นที่พีคยาอยู่ในช่วง 1.52-6.56% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 2.32-5.21% และ %CV

ของพื้นที่ที่พืคออยู่ในช่วง 1.89-9.02% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยาอินโดเมทาซินในพลาสมา ถึงแม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ยาในวันเดียวกัน หรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

6) ปริมาณต่ำสุดของตัวยานในตัวอย่างพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ได้

จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.1-10.0 มคก./มล. พลาสมา สำหรับความเข้มข้น 0.1 มคก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่วิเคราะห์นั้น ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 7.89 และ 7.91% เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่ที่พืค และให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 5.97 และ 5.71% เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของพีคยา สำหรับการแยกพลาสมาโปรตีน ด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอซีโตนไนโตรส ดังนั้นจึงยอมรับได้ที่ระดับยาอินโดเมทาซิน 0.1 มคก./มล. พลาสมา เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย

สำหรับการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล ผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน ของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.1-10.0 มคก./มล. พลาสมา สำหรับความเข้มข้น 0.1 มคก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์นั้น ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 6.56 และ 9.02% เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่ที่พืค และให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 5.97 และ 4.56% เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีคยา ดังนั้นจึงยอมรับได้ที่ระดับยาอินโดเมทาซิน 0.1 มคก./มล. พลาสมา เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย

ตารางที่ 63 ค่าอัตราส่วน S/N ของการวิเคราะห์อินโดเมทาซินในพลาสมา
เมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสีไคโนไตรส์และ
สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

| S/N ratio | |
|--|--|
| Zn ⁺⁺ กับ แอสีไคโนไตรส์* | Zn ⁺⁺ กับ เมทานอล** |
| 2.96 | 4.36 |
| 3.33 | 4.40 |
| 3.07 | 4.60 |
| 3.22 | 3.92 |
| 3.37 | 3.80 |
| 3.00 | 3.80 |
| 3.18 | 4.32 |
| 3.30 | 4.44 |
| 3.52 | 4.28 |
| 3.26 | 3.80 |
| $\bar{X}(SD)=3.22(0.17)$ %CV = 5.40 | $\bar{X}(SD)=4.17(0.31)$ %CV = 7.39 |

* ความเข้มข้นของอินโดเมทาซิน = 0.1 มคก./มล.

**ความเข้มข้นของอินโดเมทาซิน = 0.1 มคก./มล.

ตารางที่ 64 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอินโดเมทาซินในพลาสมา
 ภายในวันเดียวกันเมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสซีเตนาไตรด์
 เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (within-run precision;n=3)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.1 | 2264 | 1967 | 1996 | 2075.7(163.7) | 7.89 |
| 0.6 | 18939 | 19238 | 19423 | 19200.0(244.2) | 1.27 |
| 1.0 | 28977 | 30068 | 30285 | 29776.7(701.0) | 2.35 |
| 3.0 | 80628 | 85908 | 84093 | 83543.0(2682.6) | 3.21 |
| 6.0 | 158978 | 158956 | 163226 | 160386.7(2459.0) | 1.53 |
| 10.0 | 253395 | 254114 | 267096 | 258201.7(7711.1) | 2.99 |
| ข. ความสูงพีคยา (มม.) | | | | | |
| 0.1 | 1.0 | 1.0 | 0.9 | 0.97(0.06) | 5.97 |
| 0.6 | 5.1 | 5.2 | 5.2 | 5.17(0.06) | 1.12 |
| 1.0 | 8.2 | 7.9 | 8.2 | 8.10(0.17) | 2.14 |
| 3.0 | 23.5 | 24.4 | 24.2 | 24.03(0.47) | 1.97 |
| 6.0 | 47.6 | 47.8 | 49.2 | 48.20(0.87) | 1.81 |
| 10.0 | 75.6 | 74.8 | 79.3 | 76.57(2.40) | 3.14 |

* ความเข้มข้นของอินโดเมทาซิน

ตารางที่ 65 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาอินโดเมทาซินในพลาสมา ระหว่างวัน
เมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอซีไคนาไทรส์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.1 | 2314 | 2674 | 2189 | 2394 | 2264 | 2367.0(187.1) | 7.91 |
| 0.6 | 18259 | 17884 | 19169 | 18568 | 18939 | 18563.8(515.3) | 2.78 |
| 1.0 | 28975 | 29630 | 32993 | 30046 | 28977 | 30124.2(1667.1) | 5.53 |
| 3.0 | 84785 | 82052 | 80860 | 81676 | 80628 | 82000.2(1661.8) | 2.03 |
| 6.0 | 161276 | 159041 | 162559 | 156068 | 158978 | 159584.4(2486.9) | 1.56 |
| 10.0 | 261402 | 260905 | 252896 | 250330 | 253395 | 255785.6(5039.4) | 1.97 |
| ข. ความสูงพีคยา(มม.) | | | | | | | |
| 0.1 | 0.9 | 1.0 | 0.9 | 1.0 | 1.0 | 0.96(0.05) | 5.71 |
| 0.6 | 5.0 | 4.9 | 5.3 | 5.2 | 5.1 | 5.10(0.16) | 3.10 |
| 1.0 | 7.9 | 7.9 | 7.6 | 7.9 | 8.2 | 7.90(0.21) | 2.68 |
| 3.0 | 25.2 | 23.8 | 23.9 | 23.6 | 23.5 | 24.00(0.69) | 2.87 |
| 6.0 | 49.1 | 46.9 | 48.3 | 45.5 | 47.6 | 47.48(1.38) | 2.90 |
| 10.0 | 79.7 | 78.4 | 74.0 | 73.2 | 75.6 | 76.18(2.80) | 3.67 |

* ความเข้มข้นของอินโดเมทาซิน

ตารางที่ 66 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาอินโดเมทาซินในพลาสมา
ภายในวันเดียวกัน เมื่อใช้สารละลายชิงค์ซิลเฟตร่วมกับเมทานอล
เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (within-run precision;n=3)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.1 | 2352 | 2632 | 2356 | 2446.7(160.5) | 6.56 |
| 0.6 | 16675 | 17859 | 16881 | 17138.3(632.6) | 3.69 |
| 1.0 | 26342 | 25659 | 25515 | 25838.7(441.8) | 1.71 |
| 3.0 | 65323 | 68429 | 68741 | 67496.7(1889.8) | 2.80 |
| 6.0 | 136406 | 138749 | 134615 | 136590.0(2073.1) | 1.52 |
| 10.0 | 217920 | 219547 | 229316 | 222261.0(6163.7) | 2.77 |
| ข. ความสูงพีคยา (มม.) | | | | | |
| 0.1 | 1.0 | 0.9 | 1.0 | 0.97(0.06) | 5.97 |
| 0.6 | 4.7 | 4.9 | 4.7 | 4.77(0.12) | 2.42 |
| 1.0 | 7.2 | 7.8 | 7.4 | 7.47(0.30) | 4.09 |
| 3.0 | 20.0 | 21.0 | 20.9 | 20.63(0.55) | 2.67 |
| 6.0 | 42.5 | 42.8 | 41.7 | 42.33(0.57) | 1.34 |
| 10.0 | 61.9 | 67.9 | 71.0 | 66.93(4.63) | 6.91 |

* ความเข้มข้นของอินโดเมทาซิน

ตารางที่ 67 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาอินโดเมทาซินในพลาสมา ระหว่างวัน
เมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.1 | 2745 | 2806 | 2360 | 2801 | 2352 | 2612.8(235.7) | 9.02 |
| 0.6 | 15977 | 14544 | 16690 | 16566 | 16675 | 16090.4(912.6) | 5.67 |
| 1.0 | 25055 | 25312 | 24293 | 27605 | 26342 | 25721.4(1283.1) | 4.99 |
| 3.0 | 69062 | 65717 | 67376 | 69827 | 65323 | 67461.0(1986.3) | 2.94 |
| 6.0 | 130940 | 132450 | 130263 | 134334 | 136406 | 132878.6(2517.1) | 1.89 |
| 10.0 | 214551 | 215866 | 206212 | 209978 | 217920 | 212905.4(4743.2) | 2.23 |
| ข. ความสูงพีคยา(มม.) | | | | | | | |
| 0.1 | 1.0 | 1.0 | 0.9 | 1.0 | 1.0 | 0.98(0.45) | 4.56 |
| 0.6 | 4.4 | 4.3 | 4.3 | 4.8 | 4.7 | 4.50(0.23) | 5.21 |
| 1.0 | 7.0 | 7.4 | 7.0 | 7.6 | 7.2 | 7.24(0.26) | 3.60 |
| 3.0 | 20.9 | 20.8 | 20.0 | 20.9 | 20.0 | 20.52(0.48) | 2.32 |
| 6.0 | 40.4 | 42.0 | 39.5 | 41.1 | 42.5 | 41.10(1.21) | 2.93 |
| 10.0 | 67.1 | 68.2 | 63.4 | 64.5 | 61.9 | 65.02(2.60) | 4.00 |

* ความเข้มข้นของอินโดเมทาซิน

7) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมิน (จากขั้นตอนที่ 4) มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกที่รับมาจำนวน 9 ตัวอย่าง คือ ที่ความเข้มข้น 0.6, 3.0 และ 10.0 มคก./มล. (ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% Analytical recovery) ดังแสดงในตารางที่ 68 และ 69 พบว่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่แยกพลาสติกโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสซีไตนไตรรส์ และสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ก็ให้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ = $94.22 \pm 3.12\%$ และ $94.84 \pm 3.46\%$ ตามลำดับ ซึ่งเป็นเครื่องยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณอินโดเมทาซินได้ถูกต้องแม่นยำจริง ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณอินโดเมทาซินในพลาสติก โดยหลักการแยกพลาสติกโปรตีน จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 70

เนื่องจากผลการศึกษาการวิเคราะห์ยาอินโดเมทาซินในพลาสติกในแง่การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสติกโปรตีน และ validate วิธีวิเคราะห์นั้น ปรากฏว่าผ่านการประเมินทั้งการใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสซีไตนไตรรส์ และสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน ดังนั้น เพื่อเป็นการทดสอบความแตกต่างในเชิงสถิติของค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาจากการใช้สารแยกพลาสติกโปรตีนทั้งสองตัวดังกล่าว ผลจากตารางที่ 60 และ 61 ทั้งเมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและความสูงพีคยา จึงทำการเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าว โดยใช้ 2 tailed unpaired student t-test ที่ระดับ

ตารางที่ 68 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยาอินโดเมทาซินในพลาสมา
เมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอซีไตนไตรรส์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสมา (นาโนกรัม/มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัม/มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|--|---|---|
| 600 | 534.1 | 89.02 |
| 600 | 566.1 | 94.35 |
| 600 | 556.8 | 92.80 |
| 3000 | 2789.5 | 92.98 |
| 3000 | 2959.4 | 98.65 |
| 3000 | 2936.7 | 97.89 |
| 10000 | 9358.1 | 93.58 |
| 10000 | 9281.0 | 92.81 |
| 10000 | 9591.8 | 95.92 |
| | | $\bar{X}(SD)=94.22(2.94)$ %CV = 3.12 |

ตารางที่ 69 เปรอ์ เซนตการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยาอินโคเมทาซินในพลาสติก
เมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน
(analytical recovery; n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสติก (นาโนกรัม/มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัม/มล.) | เปอร์ เซนตการคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|---|---|--|
| 600 | 555.5 | 92.58 |
| 600 | 578.9 | 96.48 |
| 600 | 558.9 | 93.15 |
| 3000 | 2817.1 | 93.90 |
| 3000 | 2748.4 | 91.61 |
| 3000 | 2736.1 | 91.20 |
| 10000 | 10032.8 | 100.33 |
| 10000 | 9487.7 | 94.88 |
| 10000 | 9942.0 | 99.42 |
| | | $\bar{X}(SD)=94.84(3.29)$ %CV = 3.46 |

ตารางที่ 70 สรุปการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาอินโดเมทาซินโดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน

| | conc. ($\mu\text{g/ml}$) | $\text{Zn}^{2+}+\text{CH}_3\text{CN}$ | $\text{Zn}^{2+}+\text{CH}_3\text{OH}$ |
|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <u>%Phy.Reco.</u> (n=30) | 0.6-10.0 | | |
| -peak area \bar{X} (SD) | | 92.25(2.94) | 99.28(3.00) |
| %CV | | 3.19 | 3.02 |
| -peak height \bar{X} (SD) | | 90.24(4.08) | 93.14(5.17) |
| %CV | | 4.52 | 5.55 |
| <u>Linearity</u> | 0.1-10.0 | | |
| Eq. Y= | | 2073.9725+24.2638X | 2295.7507+20.9924X |
| r^2 | | 0.99908 | 0.99998 |
| <u>Specificity</u> | | | |
| <u>LLD</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.1 | 0.1 |
| <u>Precision</u> %CV | 0.1-10.0 | | |
| -within-run (n=3) | | | |
| peak area | | 1.27-7.89 | 1.52-6.56 |
| peak height | | 1.12-5.97 | 1.34-6.91 |
| -between-run (n=5) | | | |
| peak area | | 1.56-7.91 | 1.89-9.02 |
| peak height | | 2.68-5.71 | 2.32-5.21 |
| <u>LLQ</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.1 | 0.1 |
| <u>%Anal.Reco.</u> (n=9) | | | |
| \bar{X} (SD) | | 94.22(2.94) | 94.84(3.29) |
| %CV | | 3.12 | 3.46 |

ความเชื่อมั่น 95% (รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ง) ผลการทดสอบปรากฏว่า ค่าเบอส์ เซนต์การคืนกลับของยาจากการใช้สารแยกพลาสติกไมโครตีนทั้งสองแบบ ทั้งเมื่อคำนวณโดยวิธีพื้นที่พิกษาและความสูงพิกษา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % นั่นคือ การใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสซีโตไนโตรส์และสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกไมโครตีน ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาอินโดเมทาซินในพลาสติกไมโครตีนให้ผลที่แตกต่างกัน โดยการวิเคราะห์สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกไมโครตีน ให้ค่าเบอส์ เซนต์การคืนกลับของยาที่ดีกว่าการใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสซีโตไนโตรส์

3.8 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ยาซีโตโปรเฟนในพลาสติกไมโครตีน

3.8.ก การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสติกไมโครตีน

1) ลักษณะตัวอย่างพลาสติกไมโครตีนหลังเติมสารแยกพลาสติกไมโครตีนลงในตัวอย่างพลาสติกไมโครตีน

ก) เมื่อใช้แอสซีโตไนโตรส์เป็นสารแยกพลาสติกไมโครตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสติกไมโครตีนจับกันแน่น เป็นก้อนขนาดใหญ่สีเหลืองอมส้ม เกาะติดที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาตรน้อย ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่า

- สารละลายสีที่แยกออกมาเป็นสีเหลือง มีความใสสะอาด มีปริมาตรมาก มี pH ประมาณ 7

ข) เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกไมโครตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสติกไมโครตีน เป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อน จับกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาตรมาก ผิวหน้าตะกอนฟุ้งกระจายเล็กน้อย เมื่อเขย่าอย่างแรง

- สารละลายไอที่แยกออกมา เป็นสีเหลืองอ่อน มีความใสสะอาด มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่า ของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

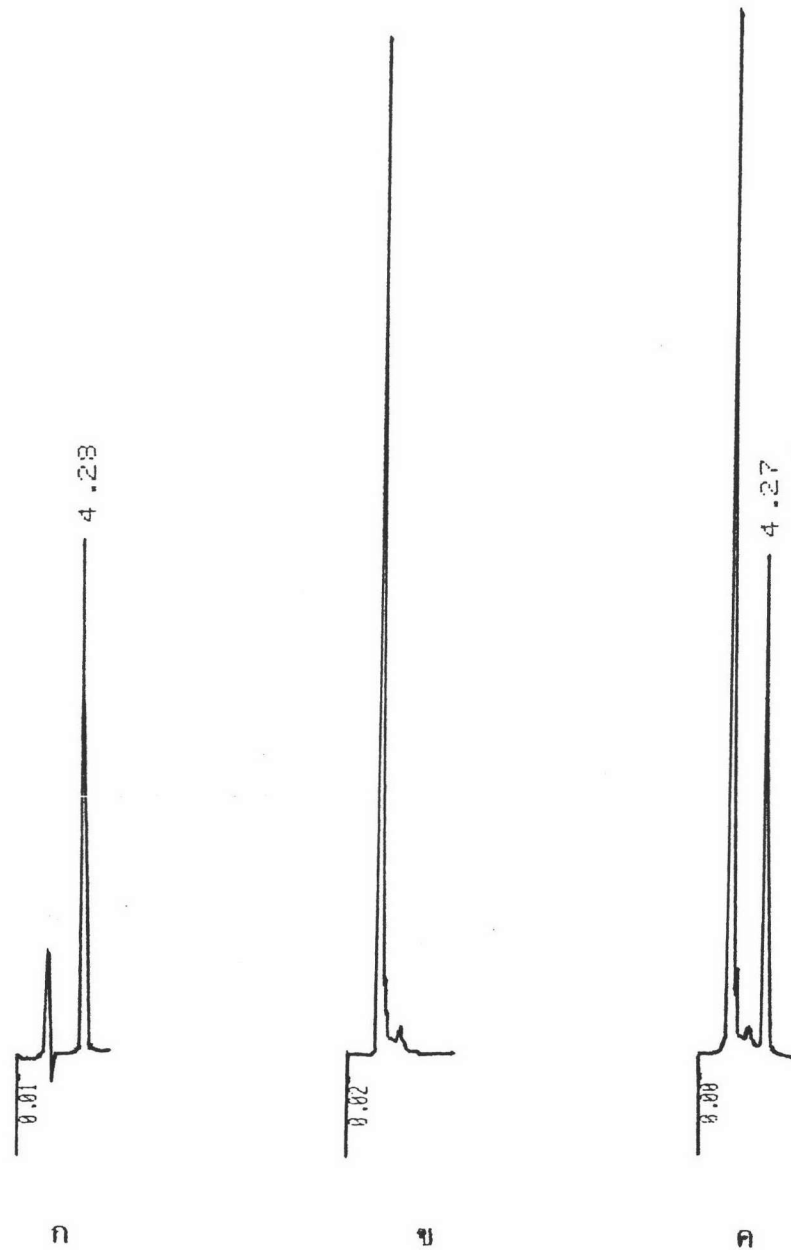
2) ลักษณะโครมาโทแกรม

ก) เมื่อใช้แอสีโตไนโตรส เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน

จากโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสติกและตัวอย่างพลาสติก จะเห็นว่าพีคของยาบนโครมาโทแกรม ปรากฏเป็นพีคเดี่ยว และไม่ถูกรบกวนจากพีคของ endogenous ซึ่งมีขนาดใหญ่ เนื่องจากพีคของ endogenous ถูกชะออกมาได้หมดก่อนพีคยา ดังแสดงในรูปที่ 31 พิจารณาจากพีคของยา คีโตโปรเฟน เมื่ออยู่ในพลาสติกและเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐานของสารแยกพลาสติกโปรตีนชนิดเดียวกัน จะเห็นว่า มีลักษณะเหมือนกันและมีค่าเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ที่เท่ากัน (คีโตโปรเฟน = 4.27 นาที และ 4.28 นาที ทั้งเมื่ออยู่ในพลาสติกและสารละลายมาตรฐาน) แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

ข) เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน

โครมาโทแกรมที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกับก. แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ พิจารณาจากค่าเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ของยา คีโตโปรเฟน เมื่ออยู่ในพลาสติก และเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐานของสารแยกพลาสติกโปรตีนชนิดเดียวกัน มีค่าเท่ากัน (คีโตโปรเฟน = 4.27 นาที และ 4.28 นาที เมื่ออยู่ในพลาสติกและสารละลายมาตรฐานตามลำดับ) ดังแสดงในรูปที่ 32



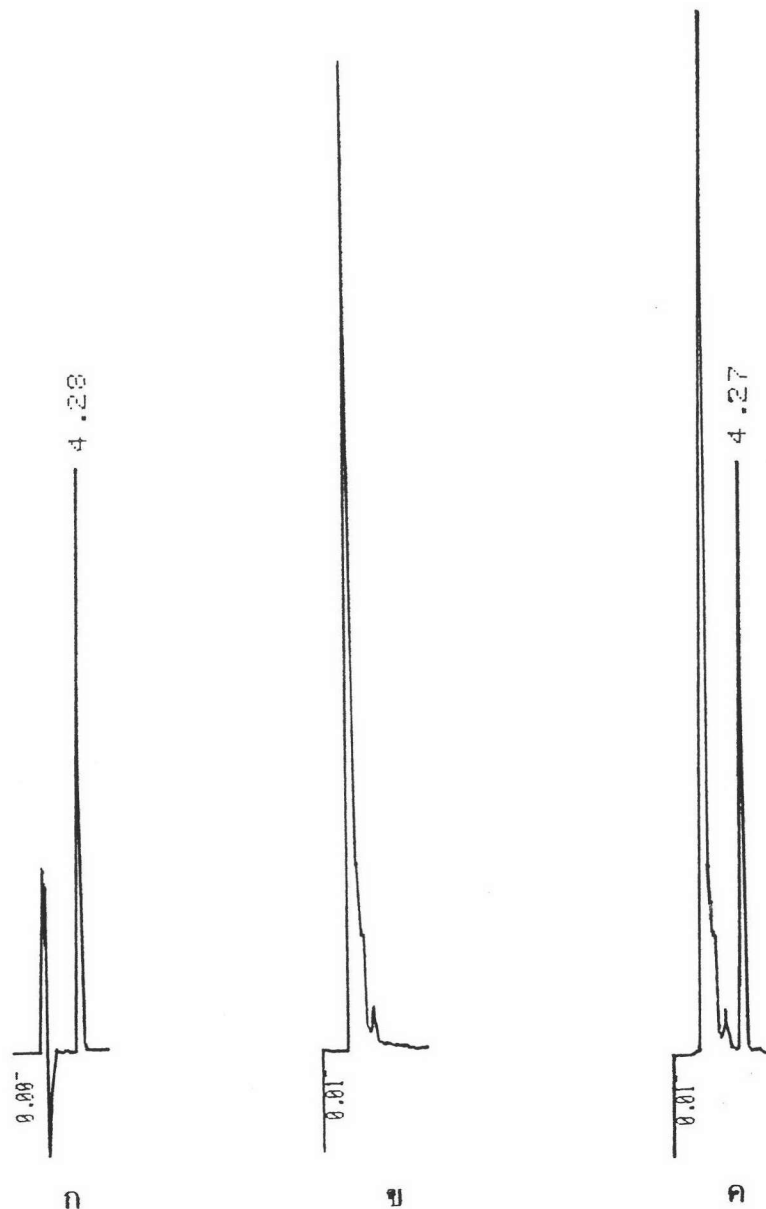
รูปที่ 31 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยา คีโตโพรเฟน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเอซีทีไนไตรล์ โดยเทคนิค HPLC

ก. เป็นโครมาโทแกรมของคีโตโพรเฟนในสารละลายมาตรฐาน

ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลนด์พลาสมา

ค. เป็นโครมาโทแกรมของคีโตโพรเฟนในพลาสมา

ความเข้มข้น 10.0 มคก./มล. (ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^4)



รูปที่ 32 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาดีลทียาโซรเฟน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล โดยเทคนิค HPLC

ก. เป็นโครมาโทแกรมของดีลทียาโซรเฟนในสารละลายมาตรฐาน

ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา

ค. เป็นโครมาโทแกรมของดีลทียาโซรเฟนในพลาสมา

ความเข้มข้น 10.0 มกก./มล. (ใช้แอทเทนชัน 2^4)

3) เบอร์เซนต์การคืนกลับของยา

ผลการทดลองหาเบอร์เซนต์การคืนกลับของยาในพลาสติกที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้แอสีโตไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกโบรตีน มีค่า = $97.62 \pm 3.89\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า = $96.49 \pm 3.72\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของพีคยา ดังแสดงในตารางที่ 71 และเมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโบรตีนมีค่า = $99.58 \pm 2.23\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า = $99.47 \pm 2.27\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีคยา โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก ดังแสดงในตารางที่ 72

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการแยกพลาสติกโบรตีนของตัวอย่างพลาสติกของยาซีโตโปรเฟน จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 73

3.8.ข การ validate วิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ยาซีโตโปรเฟนในพลาสติก ที่ผ่านการประเมินผลการแยกพลาสติกโบรตีน เป็นการใช้อัสีโตไนโตรส และเมทานอลในการแยกพลาสติกโบรตีน

1) การศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสาร

แสดงในเทอมของเบอร์เซนต์การคืนกลับของยา ดังรายละเอียดในข้อ 3.8 ก.3)

2) ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่พีคยา

กับความเข้มข้นของยาในพลาสติก

ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคยาซีโตโปรเฟนกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก เมื่อใช้แอสีโตไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกโบรตีนที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.1-20.0 มก./มล. พลาสติก ดังแสดงในรูปที่ 33 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = 1196.2371 + 10.6569 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่ฟิควายาคีโตโปรเพน และ X เป็นความเข้มข้นของยาคีโตโปรเพนในพลาสมา (นาโนกรัม/มล. พลาสมา) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) = 0.99948

ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ฟิควายาคีโตโปรเพน กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาคือ 0.1-20.0 มคก./มล. พลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 34 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = 919.4762 + 12.0134 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่ฟิควายาคีโตโปรเพน และ X เป็นความเข้มข้นของยาคีโตโปรเพนในพลาสมา (นาโนกรัม/มล. พลาสมา) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) = 0.99997

3) ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ พิจารณาจากโครมาโทแกรมดังรูปที่ 31 และ 32 แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาคีโตโปรเพนในพลาสมา โดยใช้แอซีโตนไนโตรสและเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนมีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังรายละเอียดในข้อ 3.8 ก.2) ก) และ ข)

4) การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์

จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยาคีโตโปรเพนในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 คือ 0.1 มคก./มล. พลาสมา (S/N ratio เฉลี่ย = 2.92 ± 0.14 ; %CV =

4.91%) และ 0.1 มคก./มล. (S/N ratio เฉลี่ย = 2.84 ± 0.17 ; %CV = 6.08%) สำหรับการวิเคราะห์แอสีโตไนโตรัสและเมทานอล ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 74

5) ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน โดยการวิเคราะห์แอสีโตไนโตรัสเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 75 และ 76 ตามลำดับ จะเห็นว่า ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.1-20.0 มคก./มล. พลาสติก มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 1.93-7.35% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 2.22 - 7.54% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 2.12-6.38% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 3.31-9.38 สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยาแอสีโตโปรเฟนในพลาสติก โดยการแยกพลาสติกมาโปรตีนด้วยแอสีโตไนโตรัสนี้ แม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ยาภายในวันเดียวกัน หรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

สำหรับการแยกพลาสติกมาโปรตีนด้วยเมทานอล ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.1-20.0 มคก./มล. พลาสติก ดังแสดงในตารางที่ 77 และ 78 มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 0.82-5.09 และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 2.28-9.89% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 0.72-7.85% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 2.97-8.44% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยาแอสีโตโปรเฟนในพลาสติกนี้ แม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ยาภายในวันเดียวกัน หรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

ตารางที่ 71 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาซีเตโพรเฟนในพลาสติกเมื่อใช้แอซีเตไนด์
เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน (physical recovery;n=6)

| ก. พื้นที่ผิวยา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.5 | 93.18 | 100.65 | 99.60 | 100.25 | 98.26 | 102.65 | 99.10(3.24) | 3.26 |
| 2.0 | 96.68 | 87.05 | 94.90 | 94.06 | 93.88 | 86.32 | 92.15(4.35) | 4.72 |
| 5.0 | 97.84 | 101.78 | 100.36 | 100.22 | 98.49 | 98.43 | 99.52(1.51) | 1.52 |
| 10.0 | 97.44 | 97.24 | 98.03 | 98.20 | 99.17 | 98.74 | 98.14(0.74) | 0.75 |
| 20.0 | 98.62 | 97.39 | 100.36 | 103.30 | 97.59 | 98.01 | 99.21(2.27) | 2.29 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 97.62(3.80) | 3.89 |
| ข. ความสูงผิวยา(มม.) | | | | | | | | |
| 0.5 | 100.00 | 95.00 | 97.50 | 100.00 | 92.50 | 102.56 | 97.93(3.69) | 3.77 |
| 2.0 | 94.37 | 92.05 | 99.28 | 93.38 | 94.63 | 83.83 | 92.92(5.08) | 5.47 |
| 5.0 | 95.17 | 99.40 | 97.59 | 100.90 | 97.35 | 99.70 | 98.35(2.06) | 2.09 |
| 10.0 | 93.85 | 96.46 | 95.44 | 93.50 | 97.03 | 96.39 | 95.44(1.47) | 1.54 |
| 20.0 | 96.93 | 95.75 | 98.65 | 101.08 | 98.00 | 96.91 | 97.89(1.86) | 1.90 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 96.49(3.59) | 3.72 |

* ความเข้มข้นของซีเตโพรเฟน

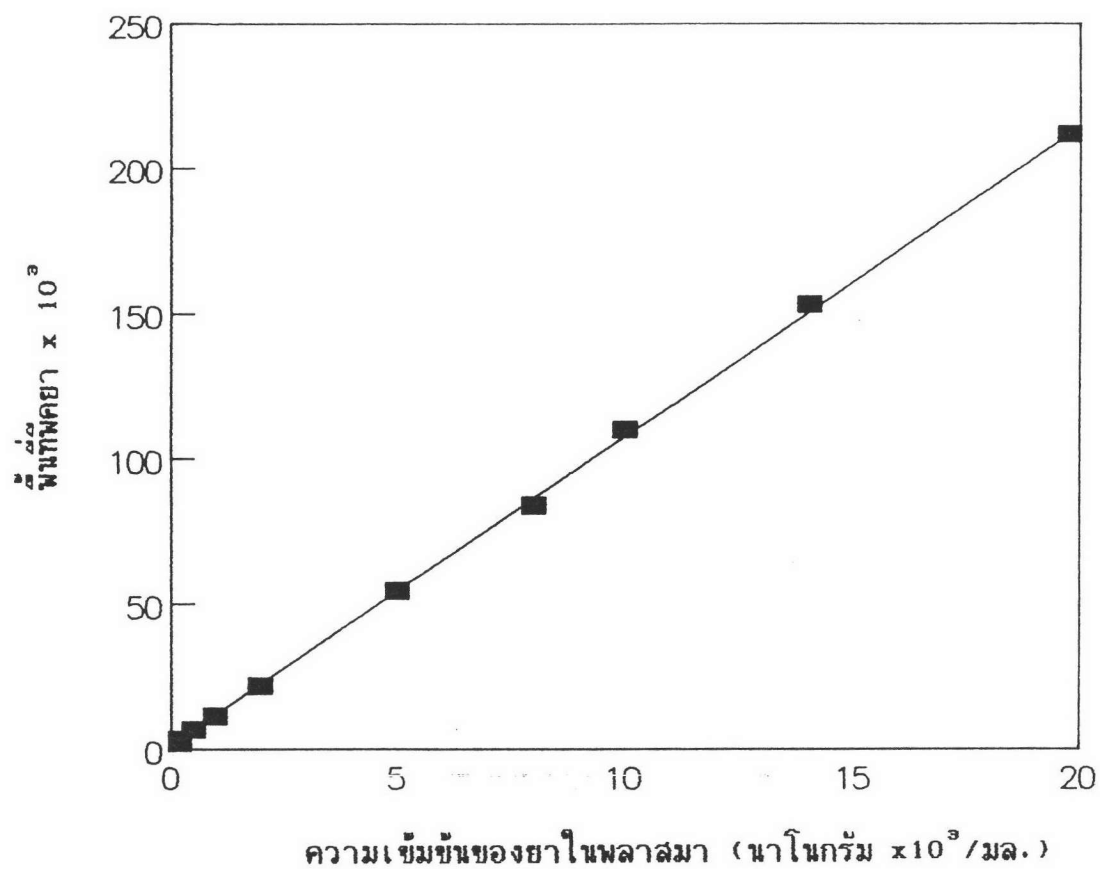
ตารางที่ 72 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาคีโตโปรเฟนในพลาสติกเมื่อใช้เมทานอล
เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน (physical recovery;n=6)

| ก. พื้นที่ผิวยาคีโตโปรเฟน | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.5 | 97.33 | 101.02 | 101.54 | 100.74 | 99.73 | 93.13 | 98.92(3.20) | 3.24 |
| 2.0 | 98.96 | 101.68 | 101.71 | 99.55 | 100.30 | 100.98 | 100.53(1.13) | 1.12 |
| 5.0 | 100.19 | 100.20 | 99.95 | 99.77 | 100.86 | 100.92 | 100.32(0.47) | 0.47 |
| 10.0 | 100.20 | 99.98 | 100.92 | 92.02 | 100.19 | 100.07 | 98.90(3.38) | 3.42 |
| 20.0 | 101.10 | 99.41 | 100.08 | 100.14 | 97.85 | 96.85 | 99.24(1.59) | 1.60 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 99.58(2.22) | 2.23 |
| ข. ความสูงฟิเคยา(มม.) | | | | | | | | |
| 0.5 | 100.38 | 97.62 | 100.38 | 102.50 | 101.88 | 95.24 | 99.67(2.75) | 2.76 |
| 2.0 | 101.31 | 101.26 | 100.62 | 97.06 | 100.60 | 100.55 | 100.23(1.59) | 1.59 |
| 5.0 | 98.40 | 98.21 | 100.00 | 99.73 | 100.80 | 101.82 | 99.83(1.39) | 1.39 |
| 10.0 | 100.00 | 98.83 | 100.26 | 90.80 | 99.87 | 99.61 | 98.23(3.67) | 3.74 |
| 20.0 | 100.29 | 101.14 | 99.14 | 98.00 | 99.50 | 98.36 | 99.40(1.18) | 1.18 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 99.47(2.26) | 2.27 |

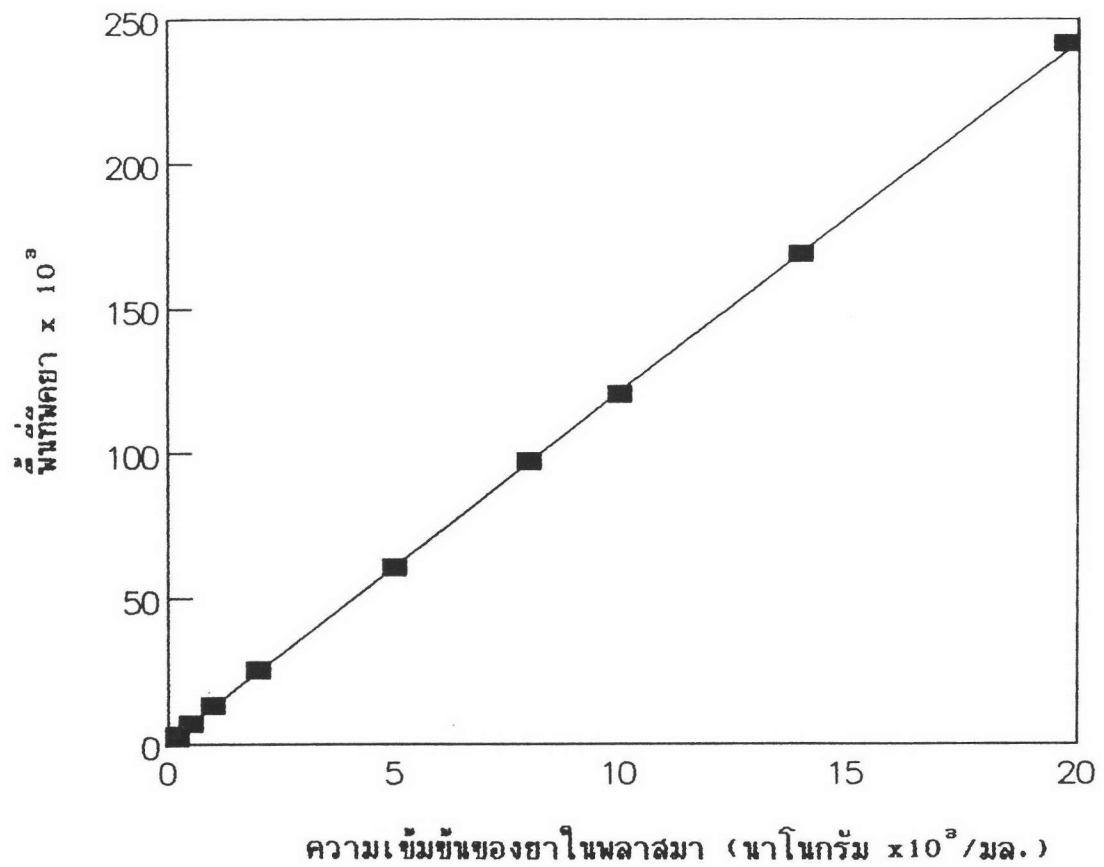
* ความเข้มข้นของคีโตโปรเฟน

ตารางที่ 73 สรุปการวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของยาดีโตนอร์เฟน

| | | CH ₃ CN | CH ₃ OH |
|---------------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| Appearance | | pass | pass |
| Chromatogram | | pass | pass |
| %Physical Recovery (n=30) | | pass | pass |
| -peak area | \bar{X} (SD) | 97.62(3.80) | 99.58(2.22) |
| | %CV | 3.89 | 2.23 |
| -peak height | \bar{X} (SD) | 96.49(3.59) | 99.47(2.26) |
| | %CV | 3.72 | 2.27 |



รูปที่ 33 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผกษาคีโตโปรเฟน กับความเข้มข้นของยาคีโตโปรเฟน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอสิตโนไตรล์ สมการเส้นตรง คือ $Y = 10.6569X + 1196.2371$
 $r^2 = 0.99948$



- รูปที่ 34 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผิวยาคีโตโปรเฟน กับความเข้มข้นของ ยาคีโตโปรเฟน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล
- สมการเส้นตรง คือ $Y = 12.0134X + 919.4762$
- $r^2 = 0.99997$

ตารางที่ 74 ค่าอัตราส่วน S/N ของการวิเคราะห์คีโตโพรเฟนในพลาสติก
เมื่อใช้แอซีโตนไนเตรสและเมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน

| S/N ratio | |
|--|--|
| แอซีโตนไนเตรส* | เมทานอล** |
| 2.82 | 2.73 |
| 2.73 | 2.80 |
| 3.02 | 2.73 |
| 3.14 | 2.86 |
| 3.02 | 2.82 |
| 2.89 | 2.73 |
| 3.00 | 2.92 |
| 2.98 | 3.28 |
| 2.88 | 2.67 |
| 2.68 | 2.87 |
| $\bar{X}(SD)=2.92(0.14)$ %CV = 4.91 | $\bar{X}(SD)=2.84(0.17)$ %CV = 6.08 |

* ความเข้มข้นของคีโตโพรเฟน = 0.1 มก./มล.

**ความเข้มข้นของคีโตโพรเฟน = 0.1 มก./มล.

ตารางที่ 75 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยา คีโตโพรเฟน ในพลาสมา
ภายในวันเดียวกันเมื่อใช้แอซีไตโนไตรด์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(within-run precision; n=3)

| ก. พื้นที่ผิวยา | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.1 | 1953 | 1974 | 2231 | 2052.7(154.8) | 7.54 |
| 0.5 | 6147 | 7101 | 6888 | 6712.0(500.8) | 7.46 |
| 2.0 | 24706 | 25824 | 25192 | 25240.7(560.6) | 2.22 |
| 5.0 | 57171 | 55712 | 62480 | 58454.3(3561.8) | 6.09 |
| 10.0 | 118337 | 110267 | 115704 | 114769.3(4115.4) | 3.59 |
| 20.0 | 235205 | 222776 | 238222 | 232067.7(8187.0) | 3.35 |
| ข. ความสูงพีคยา (มม.) | | | | | |
| 0.1 | 1.1 | 1.1 | 1.0 | 1.07(0.06) | 5.41 |
| 0.5 | 3.3 | 3.8 | 3.7 | 3.60(0.26) | 7.35 |
| 2.0 | 13.4 | 13.8 | 13.9 | 13.70(0.26) | 1.93 |
| 5.0 | 31.5 | 31.1 | 34.6 | 32.40(1.92) | 5.91 |
| 10.0 | 65.9 | 62.0 | 64.9 | 64.27(2.03) | 3.15 |
| 20.0 | 132.1 | 125.9 | 133.9 | 130.63(4.20) | 3.12 |

* ความเข้มข้นของคีโตโพรเฟน

ตารางที่ 76 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาซีโดโปรเฟนในพลาสมา ระหว่างวัน
เมื่อใช้แอสซีไตเนตรัสเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่ผิวดยา | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.1 | 2479 | 2571 | 2581 | 2486 | 2231 | 2469.6(141.4) | 5.73 |
| 0.5 | 6850 | 6699 | 6648 | 6075 | 5888 | 6432.0(423.1) | 6.58 |
| 2.0 | 22417 | 23195 | 22590 | 21470 | 25192 | 22972.8(1386.4) | 6.03 |
| 5.0 | 53610 | 56545 | 52080 | 48925 | 62480 | 54728.0(5131.6) | 9.38 |
| 10.0 | 106467 | 111664 | 109483 | 105871 | 115704 | 109837.8(4030.2) | 3.67 |
| 20.0 | 225459 | 223493 | 225396 | 217758 | 238222 | 226065.6(7487.1) | 3.31 |
| ข. ความสูงผิวดยา(มม.) | | | | | | | |
| 0.1 | 1.0 | 1.0 | 1.1 | 1.0 | 1.0 | 1.02(0.04) | 4.38 |
| 0.5 | 3.8 | 3.9 | 3.6 | 3.3 | 3.7 | 3.66(0.23) | 6.29 |
| 2.0 | 13.1 | 13.2 | 12.9 | 12.7 | 13.9 | 13.16(0.46) | 3.47 |
| 5.0 | 31.2 | 32.7 | 29.6 | 30.2 | 34.6 | 31.66(2.02) | 6.38 |
| 10.0 | 62.9 | 65.0 | 62.9 | 61.8 | 64.9 | 63.50(1.40) | 2.20 |
| 20.0 | 133.2 | 131.6 | 129.8 | 127.0 | 133.9 | 131.10(2.78) | 2.12 |

* ความเข้มข้นของซีโดโปรเฟน

ตารางที่ 77 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยา คีโตโพรเฟน ในพลาสมา
ภายในวันเดียวกัน เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(within-run precision;n=3)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.1 | 2115 | 1783 | 1797 | 1898.3(187.8) | 9.89 |
| 0.5 | 7019 | 6695 | 6132 | 6615.3(448.8) | 6.78 |
| 2.0 | 26835 | 27124 | 24823 | 26260.7(1253.4) | 4.77 |
| 5.0 | 62556 | 60227 | 59411 | 60731.3(1632.0) | 2.69 |
| 10.0 | 127376 | 124736 | 121700 | 124604.0(2840.3) | 2.28 |
| 20.0 | 248416 | 256200 | 239394 | 248003.3(8410.6) | 3.39 |
| ข. ความสูงพีคยา (มม.) | | | | | |
| 0.1 | 1.2 | 1.1 | 1.1 | 1.13(0.06) | 5.09 |
| 0.5 | 4.4 | 4.5 | 4.3 | 4.40(0.10) | 2.27 |
| 2.0 | 17.1 | 17.1 | 16.2 | 16.80(0.52) | 3.09 |
| 5.0 | 39.9 | 38.2 | 38.1 | 38.73(1.01) | 2.61 |
| 10.0 | 81.7 | 80.0 | 78.2 | 79.97(1.75) | 2.19 |
| 20.0 | 141.5 | 139.5 | 139.5 | 140.17(1.15) | 0.82 |

* ความเข้มข้นของคีโตโพรเฟน

ตารางที่ 78 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาซีเตโพรเฟนในพลาสมา ระหว่างวัน
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.1 | 2515 | 2053 | 2192 | 2103 | 2115 | 2195.6(185.4) | 8.44 |
| 0.5 | 7609 | 7593 | 6615 | 6922 | 7019 | 7151.6(436.6) | 6.10 |
| 2.0 | 25016 | 24163 | 26391 | 25286 | 26835 | 25538.2(1076.6) | 4.22 |
| 5.0 | 60402 | 58839 | 65812 | 64801 | 62556 | 62482.0(2918.5) | 4.67 |
| 10.0 | 117529 | 121696 | 122371 | 119203 | 127376 | 121635.0(3751.0) | 3.08 |
| 20.0 | 236390 | 234295 | 244245 | 250561 | 248416 | 242781.4(7198.6) | 2.97 |
| ข. ความสูงพีคยา (มม.) | | | | | | | |
| 0.1 | 1.2 | 1.1 | 1.0 | 1.2 | 1.2 | 1.14(0.09) | 7.85 |
| 0.5 | 4.7 | 4.7 | 4.3 | 4.7 | 4.4 | 4.56(0.19) | 4.27 |
| 2.0 | 15.9 | 15.4 | 16.8 | 16.0 | 17.1 | 16.24(0.69) | 4.28 |
| 5.0 | 38.0 | 37.7 | 41.9 | 41.1 | 39.9 | 39.72(1.85) | 4.66 |
| 10.0 | 75.9 | 78.2 | 79.5 | 75.8 | 81.7 | 78.22(2.50) | 3.20 |
| 20.0 | 140.2 | 138.9 | 139.4 | 139.5 | 141.5 | 139.90(1.01) | 0.72 |

* ความเข้มข้นของซีเตโพรเฟน

6) ปริมาณต่ำสุดของตัวยาในตัวอย่างพลาสติก

สามารถวิเคราะห์ได้

จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.1-20.0 มก./มล. พลาสติก สำหรับความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 7.54 และ 5.73% เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีค และให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 5.41 และ 4.38% เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีค สำหรับการแยกพลาสติกโปรตีนด้วยแอสีโตรไนโตรส ดังนั้นจึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยาซีโตโปรเฟน 0.1 มก./มล. เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย

สำหรับการแยกพลาสติกโปรตีนด้วยเมทานอล ผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน ของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.1-20.0 มก./มล. พลาสติก สำหรับความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์นั้น ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 9.89 และ 8.44% เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีค และให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 5.09 และ 7.85% เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีค ดังนั้นจึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยาซีโตโปรเฟน 0.1 มก./มล. พลาสติก เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย

7) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมิน (จากขั้นตอนที่ 4) มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกที่รับมาจำนวน 9 ตัวอย่าง คือ ที่ความเข้มข้น 0.5, 5.0 และ 10.0 มก./มล. (ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% Analytical recovery) ดังแสดงในตารางที่ 79 และ 80 พบว่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่แยกพลาสติกโปรตีนด้วยแอสีโตรไนโตรส และเมทานอลในความเข้มข้นที่แตกต่าง

กัน ก็ทำให้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ = $97.16 \pm 1.89\%$ และ $98.18 \pm 1.26\%$ ตามลำดับ ซึ่งเป็นเครื่องยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้ สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยาซีโตโปรเฟนได้ถูกต้องแม่นยำจริง ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาซีโตโปรเฟนในพลาสมา โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 81

เนื่องจากผลการศึกษาการวิเคราะห์ยาซีโตโปรเฟนในพลาสมาในแง่การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน และ validate วิธีวิเคราะห์นั้น ปรากฏว่าผ่านการประเมิน ทั้งการใช้แอสีโตไนโตรัสและเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ดังนั้นเพื่อเป็นการทดสอบความแตกต่างในเชิงสถิติของค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาจากการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้งสองตัวดังกล่าว ผลจากตารางที่ 71 และ 72 ทั้งเมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและความสูงพีคยา จึงทำการเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าว โดยใช้ 2 tailed unpaired student t-test (รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ง) ผลการทดสอบปรากฏว่าค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยา จากการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้งสองตัว ทั้งเมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและความสูงพีคยา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นั่นคือ การใช้แอสีโตไนโตรัสและเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาซีโตโปรเฟนในพลาสมา ให้ผลที่แตกต่างกัน โดยการ ใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาที่ดีกว่าการใช้แอสีโตไนโตรัส

ตารางที่ 79 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยาเคีโตโพรเฟนในพลาสติก
เมื่อใช้แอซีโตนไตรล์เป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสติก (นาโนกรัม/มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัม/มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|---|---|---|
| 500 | 484.2 | 96.84 |
| 500 | 468.2 | 93.64 |
| 500 | 491.4 | 98.28 |
| 5000 | 4938.4 | 98.77 |
| 5000 | 4761.4 | 95.23 |
| 5000 | 4805.0 | 96.10 |
| 10000 | 9848.7 | 98.49 |
| 10000 | 9864.0 | 98.64 |
| 10000 | 9846.3 | 98.46 |
| | | $\bar{X}(SD)=97.16(1.83)$ %CV = 1.89 |

ตารางที่ 80 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยาเค็โตโพรเฟนในพลาสติก
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสติก (นาโนกรัม/มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัม/มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|---|---|---|
| 500 | 495.1 | 99.02 |
| 500 | 494.3 | 98.86 |
| 500 | 477.6 | 95.52 |
| 5000 | 4972.6 | 99.45 |
| 5000 | 4931.3 | 98.63 |
| 5000 | 4920.2 | 98.40 |
| 10000 | 9825.9 | 98.26 |
| 10000 | 9678.0 | 96.78 |
| 10000 | 9868.7 | 98.69 |
| | | $\bar{X}(SD)=98.18(1.24)$ %CV = 1.26 |

ตารางที่ 81 สรุปการvalidateวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยา คีโตโพรเฟน โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน

| | conc. ($\mu\text{g/ml}$) | CH_3CN | CH_3OH |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| <u>%Phy.Reco.</u> (n=30) | 0.5-20.0 | | |
| -peak area \bar{X} (SD) | | 97.62(3.80) | 99.58(2.22) |
| %CV | | 3.89 | 2.23 |
| -peak height \bar{X} (SD) | | 96.49(3.59) | 99.47(2.26) |
| %CV | | 3.72 | 2.27 |
| <u>Linearity</u> | 0.1-20.0 | | |
| Eq. Y= | | 1196.2371+10.6569X | 919.4762+12.0134X |
| r^2 | | 0.99948 | 0.99997 |
| <u>Specificity</u> | | | |
| <u>LLD</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.1 | 0.1 |
| <u>Precision</u> %CV | 0.1-20.0 | | |
| -within-run (n=3) | | | |
| peak area | | 2.22-7.56 | 2.28-9.89 |
| peak height | | 1.93-7.35 | 0.82-5.09 |
| -between-run (n=5) | | | |
| peak area | | 3.31-9.38 | 2.97-8.44 |
| peak height | | 2.12-6.38 | 0.72-7.85 |
| <u>LLQ</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.1 | 0.1 |
| <u>%Anal.Reco.</u> (n=9) | | | |
| \bar{X} (SD) | | 97.16(1.83) | 98.18(1.24) |
| %CV | | 1.89 | 1.26 |

3.9 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ยากรดมีเพนนามิคในพลาสติก

3.9.ก การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสติกโปรตีน

1) ลักษณะตัวอย่างพลาสติกหลังเติมสารแยกพลาสติกโปรตีนลงในตัวอย่างพลาสติก

ก) เมื่อใช้แอสซีโตไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสติกโปรตีนจับกันแน่น เป็นก้อนขนาดใหญ่สีเหลืองอมส้มเกาะติดที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณน้อย ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่า

- สารละลายสีที่แยกออกมาเป็นสีเหลือง มีความใสสะอาด มีปริมาณมาก มี pH ประมาณ 7

ข) เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสติกโปรตีน เป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อน จับกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณมาก ผิวหน้าตะกอนฟุ้งกระจายเล็กน้อย เมื่อเขย่าอย่างแรง

- สารละลายสีที่แยกออกมา เป็นสีเหลืองอ่อน มีความใสสะอาด มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่า ของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

2) ลักษณะโครมาโทแกรม

ก) เมื่อใช้แอสซีโตไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน

จากโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสติกและตัวอย่างพลาสติก จะเห็นว่าพีคของยาบนโครมาโทแกรม ปรากฏเป็นพีคเดี่ยว และไม่ถูกรบกวนจากพีคของ endogenous ซึ่งมีขนาดใหญ่ เนื่องจากพีคของ endogenous ถูกชะออกมาได้หมดก่อนพีคยา ดังแสดงในรูปที่ 35 พิจารณาจากพีคของยากรดมีเพนนามิค เมื่ออยู่ในพลาสติกและเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐาน

ของสารแยกพลาสติกมาโพรตีนชนิดเดียวกัน จะเห็นว่ามีลักษณะเหมือนกันและมีค่าเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ที่เท่ากัน (กรดมีเพนนามิค = 6.83 นาที ทั้งเมื่ออยู่ในพลาสติกมาและสารละลายมาตรฐาน) แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

ข) เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสติกมาโพรตีน

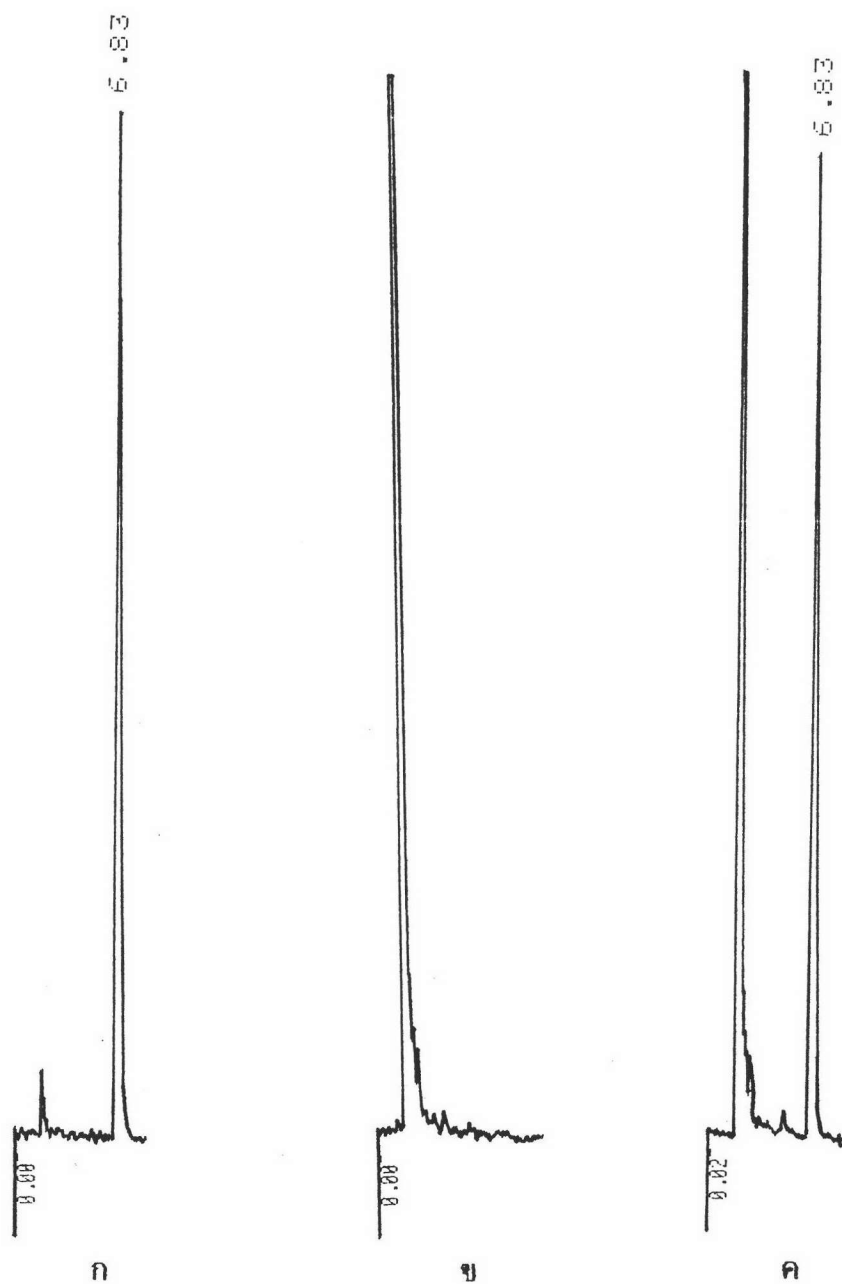
โครมาโทแกรมที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกับก.

แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ พิจารณาจากค่าเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ของยากรดมีเพนนามิคเมื่ออยู่ในพลาสติกมาและเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐานของสารแยกพลาสติกมาโพรตีนชนิดเดียวกันมีค่าเท่ากัน (กรดมีเพนนามิค = 6.87 นาที ทั้งเมื่ออยู่ในพลาสติกมาและสารละลายมาตรฐาน) ดังแสดงในรูปที่ 36

3) เบอร์เซนต์การคืนกลับของยา

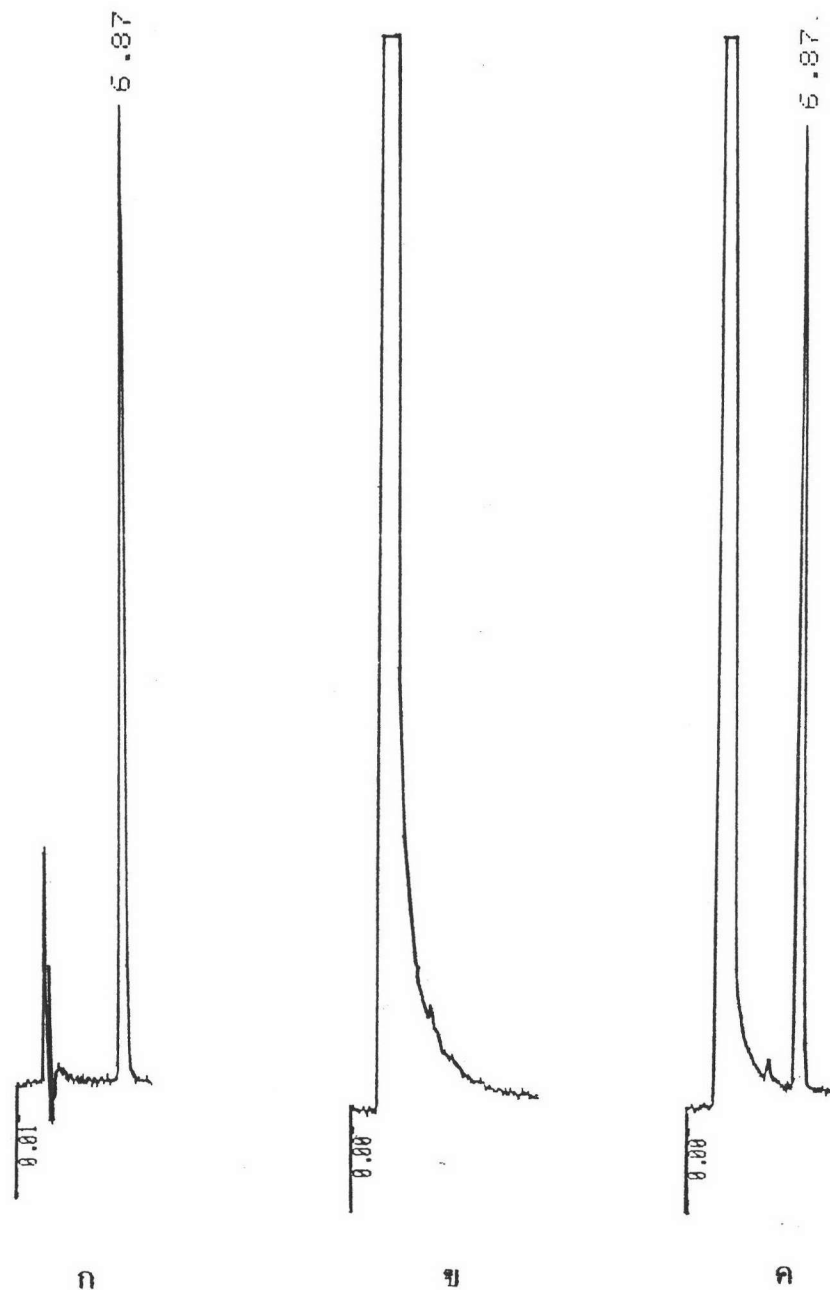
ผลการทดลองหาเบอร์เซนต์การคืนกลับของยาในพลาสติกมาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้แอสซิโตนไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกมาโพรตีน มีค่า = $97.57 \pm 2.65\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า = $97.38 \pm 4.49\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของพีคยา ดังแสดงในตารางที่ 82 และเมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกมาโพรตีนมีค่า = $96.10 \pm 5.06\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า = $98.59 \pm 2.54\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีคยา โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติกมา ดังแสดงในตารางที่ 83

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการแยกพลาสติกมาโพรตีนของตัวอย่างพลาสติกมาของยากรดมีเพนนามิคจึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 84



รูปที่ 35 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ ยามิเฟนามิค แอซิด ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอซิติโนไตรล์ โดยเทคนิค HPLC

- ก. เป็นโครมาโทแกรมของมีเฟนามิค แอซิดในสารละลายมาตรฐาน
- ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบบลค์พลาสมา
- ค. เป็นโครมาโทแกรมของมีเฟนามิค แอซิดในพลาสมา
ความเข้มข้น 10.0 มคก./มล. (ใช้แอทเทนนูเอชั่น 2^2)



รูปที่ 36 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ ยามีเฟนามิค แอซิด ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล โดยเทคนิค HPLC

- ก. เป็นโครมาโทแกรมของมีเฟนามิค แอซิดในสารละลายมาตรฐาน
- ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา
- ค. เป็นโครมาโทแกรมของมีเฟนามิค แอซิดในพลาสมา
ความเข้มข้น 10.0 มคก./มล. (ใช้แอทเทนนูเอชั่น 2^2)

ตารางที่ 82 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยากรณีมีเพนนามิคในพลาสมาเมื่อใช้แอซีเตนไนโตรส
เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (physical recovery; n=6)

| ก. พื้นที่พิกษา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.5 | 96.62 | 105.85 | 97.35 | 96.86 | 93.38 | 95.75 | 97.64(4.26) | 4.37 |
| 1.0 | 97.39 | 95.95 | 95.87 | 100.57 | 96.17 | 95.89 | 96.97(1.85) | 1.91 |
| 3.0 | 95.45 | 96.09 | 96.87 | 93.76 | 95.29 | 96.74 | 95.70(1.15) | 1.20 |
| 5.0 | 99.25 | 98.02 | 97.45 | 96.54 | 94.71 | 98.22 | 97.36(1.58) | 1.62 |
| 10.0 | 100.47 | 98.80 | 99.92 | 100.93 | 100.99 | 99.93 | 100.17(0.82) | 0.82 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 97.57(2.59) | 2.65 |
| ข. ความสูงพิกษา (มม.) | | | | | | | | |
| 0.5 | 97.44 | 104.05 | 98.67 | 94.74 | 95.00 | 98.70 | 98.10(3.39) | 3.45 |
| 1.0 | 108.13 | 95.28 | 96.97 | 95.65 | 91.43 | 91.60 | 96.51(6.12) | 6.34 |
| 3.0 | 99.25 | 92.99 | 95.44 | 93.30 | 98.76 | 98.26 | 96.33(2.80) | 2.91 |
| 5.0 | 98.57 | 95.64 | 100.31 | 98.21 | 94.35 | 96.41 | 97.25(2.18) | 2.24 |
| 10.0 | 99.22 | 99.54 | 98.69 | 98.05 | 99.10 | 97.80 | 98.73(0.69) | 0.70 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 97.38(3.40) | 3.49 |

* ความเข้มข้นของกรณีมีเพนนามิค

ตารางที่ 83 เปรูเซ็นต์การคืนกลับของยากรณีเพนนามิคในพลาสติกเมื่อใช้เมทานอล
เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน (physical recovery;n=6)

| ก. พื้นที่พิกษา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.5 | 85.64 | 88.35 | 86.68 | 85.52 | 91.42 | 91.55 | 88.19(2.74) | 3.11 |
| 1.0 | 98.48 | 94.77 | 96.42 | 95.32 | 99.52 | 98.19 | 97.12(1.90) | 1.95 |
| 3.0 | 98.34 | 99.07 | 100.04 | 91.46 | 90.09 | 99.77 | 96.46(4.47) | 4.63 |
| 5.0 | 100.57 | 100.21 | 97.69 | 100.82 | 100.42 | 100.68 | 100.06(1.18) | 1.18 |
| 10.0 | 99.32 | 97.85 | 99.14 | 99.17 | 96.74 | 99.78 | 98.67(1.14) | 1.16 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 96.10(4.86) | 5.06 |
| ข. ความสูงพิกษา(มม.) | | | | | | | | |
| 0.5 | 98.61 | 96.30 | 88.46 | 98.57 | 101.43 | 98.61 | 97.00(4.49) | 4.63 |
| 1.0 | 99.22 | 100.77 | 96.15 | 100.78 | 99.22 | 96.90 | 98.84(1.94) | 1.96 |
| 3.0 | 100.25 | 98.48 | 96.58 | 100.24 | 98.12 | 100.09 | 98.96(1.50) | 1.51 |
| 5.0 | 99.27 | 100.12 | 100.12 | 100.89 | 101.34 | 100.36 | 100.35(0.71) | 0.71 |
| 10.0 | 98.67 | 95.61 | 98.30 | 99.46 | 97.62 | 97.04 | 97.78(1.35) | 1.38 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 98.59(2.50) | 2.54 |

* ความเข้มข้นของกรณีเพนนามิค

ตารางที่ 84 สรุปการวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของยากรณีเพนนามิด

| | | CH ₃ CN | CH ₃ OH |
|---------------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| Appearance | | pass | pass |
| Chromatogram | | pass | pass |
| %Physical Recovery (n=30) | | pass | pass |
| -peak area | \bar{X} (SD) | 97.57(2.59) | 96.10(4.86) |
| | %CV | 2.65 | 5.06 |
| -peak height | \bar{X} (SD) | 97.38(3.40) | 98.59(2.50) |
| | %CV | 3.49 | 2.54 |

3.9.ข การ validate วิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ยากรดมีเพนนามิคในพลาสติก ผ่านการประเมินผลการแยกพลาสติกโปรตีน เป็นการใช้อีโตนไตรส์ และเมทานอลในการแยกพลาสติกโปรตีน

1) การศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสาร

แสดงในเทอมของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยา

ดังรายละเอียดในข้อ 3.9 ก.3)

2) ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ที่คยา

กับความเข้มข้นของยาในพลาสติก

ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ที่คยากรดมีเพนนามิค

กับความเข้มข้นของยาในพลาสติก เมื่อใช้อีโตนไตรส์เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีนที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.2-10.0 มก./มล. พลาสติก ดังแสดงในรูปที่ 37 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = 256.5840 + 5.4449 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่ที่คยากรดมีเพนนามิค และ X เป็นความเข้มข้นของยากรดมีเพนนามิคในพลาสติก (นาโนกรัม/มล. พลาสติก) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ $(r^2) = 0.99737$

ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ที่คยากรดมีเพนนามิค

กับความเข้มข้นของยาในพลาสติก เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีนที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.2-10.0 มก./มล. พลาสติก ดังแสดงในรูปที่ 38 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = 537.8621 + 7.5257 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่พืคยากรดมีเพนนามิค และ X เป็นความเข้มข้นของยากรดมีเพนนามิคในพลาสติก (นาโนกรัม/มล. พลาสติก) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) = 0.99976

3) ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์พิจารณาจากโครมาโทแกรมดังรูปที่ 35 และ 36 แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยากรดมีเพนนามิคในพลาสติก โดยใช้แอซีโตนไนโตรส และ เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโพรตีนมีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังรายละเอียดในข้อ 3.9 ก 2) ก) และ ข)

4) การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์

จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยากรดมีเพนนามิคในพลาสติกที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 คือ 0.2 มก./มล.พลาสติก (S/N ratio เฉลี่ย = 2.27 ± 0.15 ; %CV = 6.42%) และ 0.1 มก./มล. (S/N ratio เฉลี่ย = 2.35 ± 0.16 ; %CV = 6.93%) สำหรับการใช้อีโตนไนโตรสและเมทานอล ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 85

5) ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน โดยการใช้อีโตนไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกโพรตีน ดังแสดงในตารางที่ 86 และ 87 ตามลำดับ จะเห็นว่า ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.2-10.0 มก./มล. พลาสติก มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 0.88-5.63% และ %CV ของพื้นที่พืคยาอยู่ในช่วง 2.62-9.54% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 3.66-9.38% และ %CV ของ

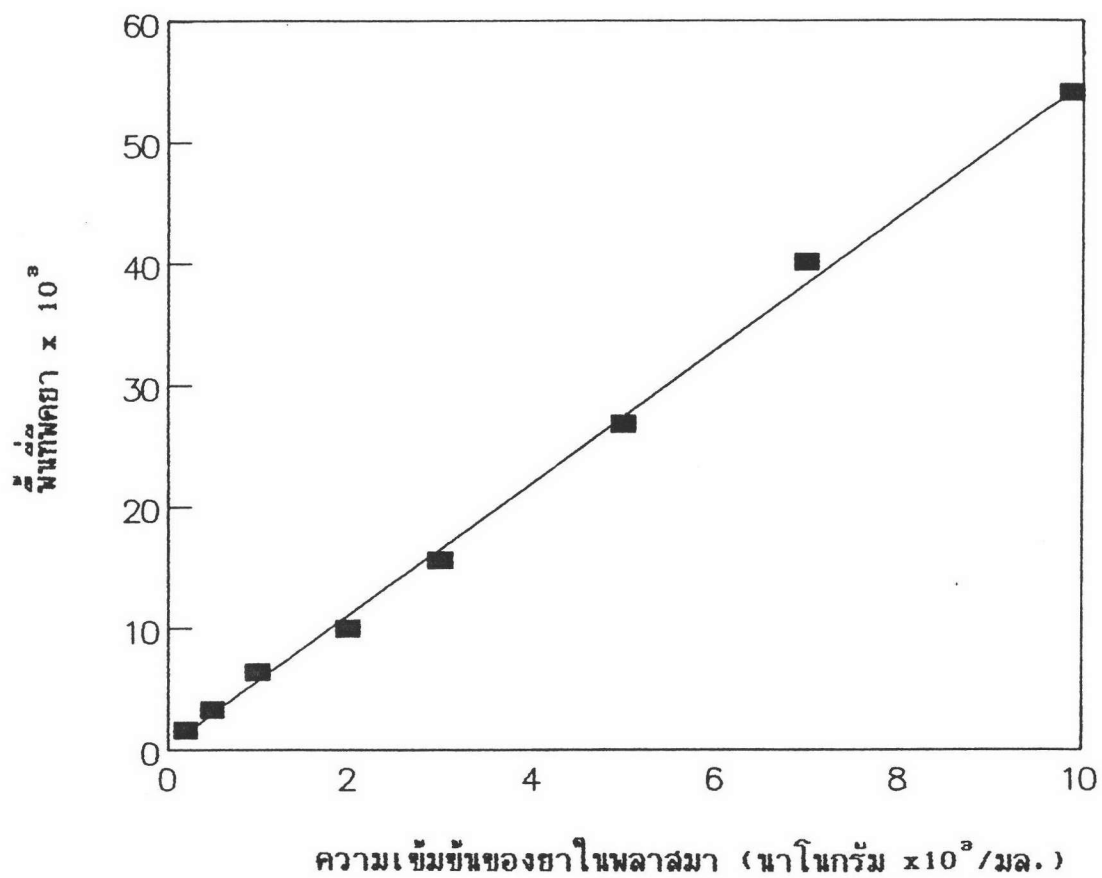
พื้นที่ที่คอกอยู่ในช่วง 1.38-7.81% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยากกรณีเพนนามิคในพลาสติก โดยการแยกพลาสติกโปรตีนด้วยแอสิตอนไนโตรสนี้ แม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

สำหรับการแยกพลาสติกโปรตีนด้วยเมทานอล ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.2-10.0 มก./มล.พลาสติก ดังแสดงในตารางที่ 88 และ 89 มีค่า %CV ของความสูงที่คอกอยู่ในช่วง 1.30-7.26% และ %CV ของพื้นที่ที่คอกอยู่ในช่วง 1.19-8.11% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงที่คอกอยู่ในช่วง 3.91-9.81% และ %CV ของพื้นที่ที่คอกอยู่ในช่วง 2.12-5.20% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยากกรณีเพนนามิคในพลาสติกนี้ แม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

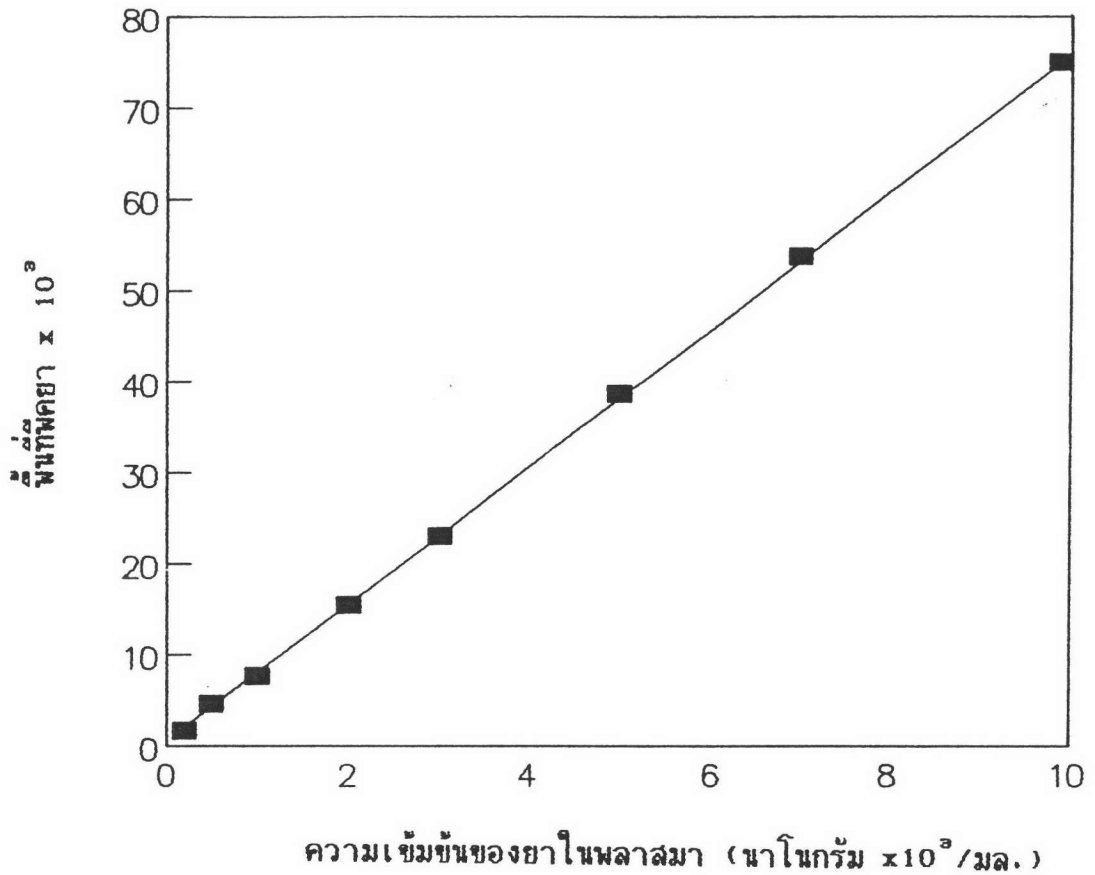
6) ปริมาณต่ำสุดของตัวอย่างในตัวอย่างพลาสติกที่

สามารถวิเคราะห์ได้

จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.2-10.0 มก./มล. พลาสติก สำหรับความเข้มข้น 0.2 มก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 3.93 และ 7.48% เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่ที่คอก และให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 5.59 และ 9.38% เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงที่คอก สำหรับการแยกพลาสติกโปรตีนด้วยแอสิตอนไนโตรส ดังนั้นจึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยากกรณีเพนนามิค 0.2 มก./มล. เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย



รูปที่ 37 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ที่ฟิตยามิเฟนามิค แอนทิต กับความเข้มข้นของ ยามิเฟนามิค แอนทิต ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอนติโตไนโตรลล์ สมการเส้นตรง คือ $Y = 5.4449X + 256.5840$
 $r^2 = 0.99737$



- รูปที่ 38 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผิวยามีเฟนนามิค แอซิด กับความเข้มข้นของ ยามีเฟนนามิค แอซิด ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล สมการเส้นตรง คือ $Y = 7.5257X + 537.8621$
 $r^2 = 0.99967$

ตารางที่ 85 ค่าอัตราส่วน S/N ของการวิเคราะห์กรดมีเฟนนามิคในพลาสมา
เมื่อใช้แอสซีไตไนโตรสและเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

| S/N ratio | |
|--|--|
| แอสซีไตไนโตรส* | เมทานอล** |
| 2.08 | 2.52 |
| 2.15 | 2.14 |
| 2.29 | 2.35 |
| 2.28 | 2.54 |
| 2.50 | 2.30 |
| 2.24 | 2.42 |
| 2.29 | 2.10 |
| 2.52 | 2.48 |
| 2.24 | 2.45 |
| 2.12 | 2.17 |
| $\bar{X}(SD)=2.27(0.15)$ %CV = 6.42 | $\bar{X}(SD)=2.35(0.16)$ %CV = 6.93 |

* ความเข้มข้นของกรดมีเฟนนามิค = 0.2 มคก./มล.

**ความเข้มข้นของกรดมีเฟนนามิค = 0.2 มคก./มล.

ตารางที่ 86 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดมีเฟนนามิคในพลาสมา
ภายในวันเดียวกัน เมื่อใช้แอซีทานาโครส์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(within-run precision;n=3)

| ก. พื้นที่ฟิคยา | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.2 | 1975 | 1871 | 2021 | 1955.7(76.8) | 3.93 |
| 0.5 | 4194 | 4020 | 4808 | 4340.7(414.0) | 9.54 |
| 1.0 | 6892 | 7035 | 7840 | 7255.7(511.1) | 7.04 |
| 3.0 | 24527 | 23474 | 23422 | 23807.7(623.5) | 2.62 |
| 5.0 | 37866 | 36247 | 38524 | 37545.7(1171.8) | 3.12 |
| 10.0 | 66190 | 70382 | 74398 | 70323.3(4104.3) | 5.84 |
| ข. ความสูงฟิคยา (มม.) | | | | | |
| 0.2 | 2.9 | 2.6 | 2.7 | 2.73(0.15) | 5.59 |
| 0.5 | 6.5 | 6.5 | 6.6 | 6.53(0.06) | 0.88 |
| 1.0 | 11.0 | 11.1 | 12.0 | 11.37(0.55) | 4.85 |
| 3.0 | 38.0 | 37.7 | 36.9 | 37.53(0.57) | 1.51 |
| 5.0 | 58.0 | 58.6 | 60.5 | 59.03(1.30) | 2.21 |
| 10.0 | 106.9 | 111.9 | 119.5 | 112.77(6.34) | 5.63 |

* ความเข้มข้นของกรดมีเฟนนามิค

ตารางที่ 87 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดมีเฟนนามิคในพลาสติก ระหว่างวัน
เมื่อใช้แอซีทานไตรล์เป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน (between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่ผิวยุ | | | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.2 | 1926 | 1972 | 1681 | 2035 | 2021 | 1927.0(144.1) | 7.48 |
| 0.5 | 3841 | 4137 | 4183 | 4362 | 4808 | 4266.2(356.1) | 8.35 |
| 1.0 | 7815 | 8101 | 7308 | 8081 | 7840 | 7829.0(319.9) | 4.09 |
| 3.0 | 26244 | 25793 | 22371 | 22307 | 23422 | 24027.4(1877.5) | 7.81 |
| 5.0 | 40248 | 39731 | 36245 | 39770 | 38524 | 38903.6(1616.7) | 4.16 |
| 10.0 | 74367 | 74406 | 73795 | 76474 | 74398 | 74688.0(1031.3) | 1.38 |
| ข. ความสูงพิคยา(มม.) | | | | | | | |
| 0.2 | 3.5 | 3.3 | 3.3 | 3.2 | 2.7 | 3.20(0.30) | 9.38 |
| 0.5 | 7.1 | 7.2 | 6.9 | 6.6 | 6.6 | 6.88(0.28) | 4.03 |
| 1.0 | 13.1 | 13.3 | 11.9 | 11.9 | 12.0 | 12.44(0.70) | 5.62 |
| 3.0 | 43.7 | 40.8 | 36.3 | 35.8 | 36.9 | 38.70(3.42) | 8.84 |
| 5.0 | 68.7 | 68.0 | 59.3 | 61.7 | 60.5 | 63.64(4.39) | 6.90 |
| 10.0 | 125.8 | 129.0 | 118.9 | 120.1 | 119.5 | 122.66(4.49) | 3.66 |

* ความเข้มข้นของกรดมีเฟนนามิค

ตารางที่ 88 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดมีเฟนนามิคในพลาสมา
ภายในวันเดียวกัน เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(within-run precision;n=3)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.2 | 2325 | 2009 | 2047 | 2127.0(172.5) | 8.11 |
| 0.5 | 5360 | 4567 | 4963 | 4963.3(396.5) | 7.99 |
| 1.0 | 7143 | 7619 | 7644 | 7468.7(282.3) | 3.78 |
| 3.0 | 25349 | 22991 | 23455 | 23931.7(1249.2) | 5.22 |
| 5.0 | 40538 | 41154 | 41504 | 41065.3(489.1) | 1.19 |
| 10.0 | 73729 | 75869 | 74570 | 74722.7(1078.1) | 1.44 |
| ข. ความสูงพีคยา(มม.) | | | | | |
| 0.2 | 3.2 | 3.7 | 3.5 | 3.47(0.25) | 7.26 |
| 0.5 | 7.5 | 7.1 | 7.7 | 7.43(0.31) | 4.11 |
| 1.0 | 12.1 | 12.7 | 12.2 | 12.33(0.32) | 2.61 |
| 3.0 | 39.7 | 38.2 | 39.0 | 38.97(0.75) | 1.93 |
| 5.0 | 67.8 | 64.7 | 67.5 | 66.67(1.71) | 2.56 |
| 10.0 | 121.9 | 125.0 | 124.2 | 123.70(1.61) | 1.30 |

* ความเข้มข้นของกรดมีเฟนนามิค

ตารางที่ 89 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยากรณีเพนนามิคินพลาสติก ระหว่างวัน
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกมาปรีคั้น (between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่ผิวยา | | | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.2 | 1931 | 2154 | 1984 | 2180 | 2047 | 2059.2(107.0) | 5.20 |
| 0.5 | 4310 | 4506 | 4627 | 4582 | 4963 | 4597.6(237.6) | 5.17 |
| 1.0 | 8731 | 8439 | 8521 | 8328 | 7644 | 8332.6(412.2) | 4.95 |
| 3.0 | 25717 | 25895 | 22752 | 22458 | 23455 | 24055.4(1639.8) | 6.82 |
| 5.0 | 42048 | 42105 | 40288 | 40405 | 41504 | 41270.0(876.0) | 2.12 |
| 10.0 | 78294 | 77784 | 73954 | 75026 | 74570 | 75925.6(1974.7) | 2.60 |
| ข. ความสูงพีคยา (มม.) | | | | | | | |
| 0.2 | 3.5 | 3.5 | 3.0 | 3.3 | 3.5 | 3.36(0.22) | 6.52 |
| 0.5 | 7.4 | 7.3 | 7.3 | 6.9 | 7.7 | 7.32(0.29) | 3.91 |
| 1.0 | 14.7 | 14.0 | 12.5 | 13.0 | 12.2 | 13.28(1.05) | 7.89 |
| 3.0 | 44.6 | 43.9 | 36.3 | 36.7 | 39.0 | 40.10(3.93) | 9.81 |
| 5.0 | 73.9 | 73.5 | 65.8 | 66.0 | 67.5 | 69.34(4.04) | 5.82 |
| 10.0 | 137.9 | 137.6 | 120.0 | 122.8 | 124.2 | 128.50(8.58) | 6.68 |

* ความเข้มข้นของกรณีเพนนามิค

สำหรับการแยกพลาสติกไมโครด้วยเมทานอล ผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน ของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.2-10.0 มคก./มล. พลาสติก สำหรับความเข้มข้น 0.2 มคก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์นั้น ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 8.11 และ 5.20% เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีค และให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 7.26 และ 6.52% เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีค ดังนั้นจึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยากรดมีเพนนามิค 0.2 มคก./มล. พลาสติก เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย

7) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมิน (จากขั้นตอนที่ 4) มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกที่รับมาจำนวน 9 ตัวอย่าง คือ ที่ความเข้มข้น 0.5, 3.0 และ 10.0 มคก./มล. (ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% Analytical recovery) ดังแสดงในตารางที่ 90 และ 91 พบว่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่แยกพลาสติกไมโครด้วยเอซีโตนไทรล์ และเมทานอลในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ก็ให้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ = $98.14 \pm 1.73\%$ และ $99.06 \pm 1.35\%$ ตามลำดับ ซึ่งเป็นเครื่องยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้ สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยากรดมีเพนนามิคได้ถูกต้องแม่นยำจริงในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดมีเพนนามิคในพลาสติก โดยหลักการแยกพลาสติกไมโคร จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 92

ตารางที่ 90 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยากรณีพ่นนามิคในพลาสติก
เมื่อใช้แอซีเตไนเตรต์เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสติก (นาโนกรัม/มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัม/มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|---|---|---|
| 500 | 488.0 | 97.60 |
| 500 | 496.4 | 99.28 |
| 500 | 471.3 | 94.26 |
| 3000 | 2983.6 | 99.45 |
| 3000 | 2976.5 | 99.22 |
| 3000 | 2971.7 | 99.06 |
| 10000 | 9791.6 | 97.92 |
| 10000 | 9708.2 | 97.08 |
| 10000 | 9942.1 | 99.42 |
| | | $\bar{X}(SD)=98.14(1.70)$ %CV = 1.73 |

ตารางที่ 91 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยากรรมิเพนนามิคในพลาสติก
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโพรตีน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสติก (นาโนกรัม/มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัม/มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|---|---|---|
| 500 | 485.8 | 97.16 |
| 500 | 501.0 | 100.20 |
| 500 | 491.2 | 98.24 |
| 3000 | 2965.4 | 98.85 |
| 3000 | 2965.2 | 98.84 |
| 3000 | 2917.2 | 97.24 |
| 10000 | 10091.3 | 100.91 |
| 10000 | 10014.2 | 100.14 |
| 10000 | 9996.8 | 99.97 |
| | | $\bar{X}(SD)=99.06(1.34)$ %CV = 1.35 |

ตารางที่ 92 สรุปการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยากรณีเพนนาไมคโดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน

| | conc. ($\mu\text{g/ml}$) | CH_3CN | CH_3OH |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| <u>%Phy.Reco.</u> (n=30) | 0.5-10.0 | | |
| -peak area \bar{x} (SD) | | 97.57(2.59) | 96.10(4.86) |
| %CV | | 2.65 | 5.06 |
| -peak height \bar{x} (SD) | | 97.38(3.40) | 98.59(2.50) |
| %CV | | 3.49 | 2.54 |
| <u>Linearity</u> | 0.2-10.0 | | |
| Eq. Y= | | 256.5840+5.4449X | 537.8621+7.5257X |
| r^2 | | 0.99737 | 0.99976 |
| <u>Specificity</u> | | | |
| <u>LLD</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.2 | 0.2 |
| <u>Precision</u> %CV | 0.2-10.0 | | |
| -within-run (n=3) | | | |
| peak area | | 2.62-9.54 | 1.19-8.11 |
| peak height | | 0.88-5.63 | 1.30-7.26 |
| -between-run (n=5) | | | |
| peak area | | 1.38-8.35 | 2.12-6.82 |
| peak height | | 3.66-9.38 | 3.91-9.81 |
| <u>LLQ</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.2 | 0.2 |
| <u>%Anal.Reco.</u> (n=9) | | | |
| \bar{x} (SD) | | 98.14(1.70) | 99.06(1.34) |
| %CV | | 1.73 | 1.35 |

เนื่องจากผลการศึกษาการวิเคราะห์ยากรณีเพนนามิคในพลาสมาในแง่ การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน และ validate วิธีวิเคราะห์นั้น ปรากฏว่าผ่านการประเมิน ทั้งการใช้แอสซีโตไนโตรสและเมทานอลเป็นสารแยก พลาสมาโปรตีน ดังนั้นเพื่อเป็นการทดสอบความแตกต่างในเชิงสถิติของค่า เบอร์เซนต์การคืนกลับของยาจากการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้งสองตัวดังกล่าว ผลจากตารางที่ 82 และ 83 ทั้งเมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและความสูงพีคยา จึงทำการเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าว โดยใช้ 2 tailed unpaired student t-test (รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ง) ผลการทดสอบปรากฏว่า ค่าเบอร์เซนต์การคืนกลับของยา จากการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้งสองตัว ทั้งเมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและความสูงพีคยา ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นั่นคือ ทั้งเมทานอลและแอสซีโตไนโตรส สามารถใช้เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ในการวิเคราะห์ยากรณีเพนนามิคใน พลาสมาได้ผลที่ไม่ต่างกัน

3.10 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ยานาโปรเซนในพลาสมา

3.10.ก การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน

1) ลักษณะตัวอย่างพลาสมาหลังเติมสารแยกพลาสมา โปรตีนลงในตัวอย่างพลาสมา

ก) เมื่อใช้แอสซีโตไนโตรสเป็นสารแยกพลาสมา โปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสมาโปรตีนจับกันแน่น เป็นก้อนขนาดใหญ่สีเหลืองอมส้มเกาะติดที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาตรน้อย ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่า

- สารละลายใสที่แยกออกมาเป็นสีเหลือง มีความใสสะอาด มีปริมาตรมาก มี pH ประมาณ 7

ข) เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกไมโครตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสติกไมโครตีน เป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อน จับกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณมาก ผิวหน้าตะกอนฟุ้งกระจายเล็กน้อย เมื่อเขย่าอย่างแรง

- สารละลายสีที่แยกออกมา เป็นสีเหลืองอ่อน มีความใสสะอาด มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่า ของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

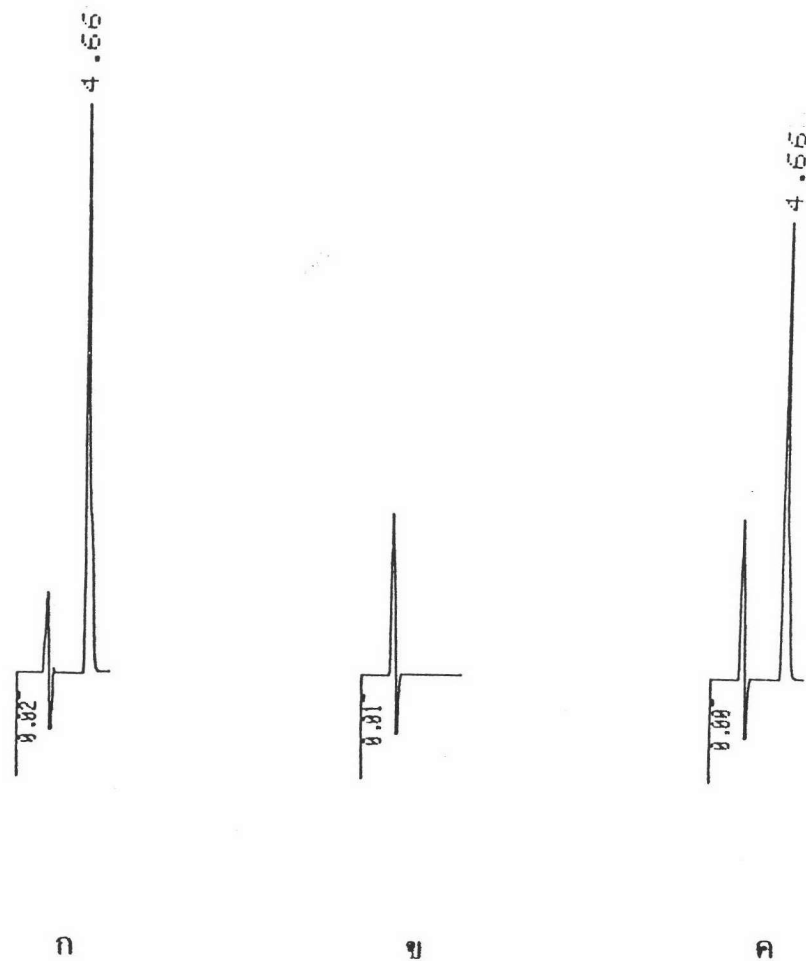
2) ลักษณะโครมาโทแกรม

ก) เมื่อใช้แอสิตอนไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกไมโครตีน

จากโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสติกและตัวอย่างพลาสติก จะเห็นว่าพีคของยานโครมาโทแกรม ปรากฏเป็นพีคเดี่ยวและไม่ถูกรบกวนจากพีคของ endogenous ซึ่งมีขนาดใหญ่ เนื่องจากพีคของ endogenous ถูกชะออกมาได้หมดก่อนพีคยา ดังแสดงในรูปที่ 39 พิจารณาจากพีคของยานาโปรเซน เมื่ออยู่ในพลาสติกและเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐานของสารแยกพลาสติกไมโครตีนชนิดเดียวกัน จะเห็นว่า มีลักษณะเหมือนกัน และมีค่าเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ที่เท่ากัน (นาโปรเซน = 4.66 นาที ทั้งเมื่ออยู่ในพลาสติกและสารละลายมาตรฐาน) แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

ข) เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสติกไมโครตีน

โครมาโทแกรมที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกับก. แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ พิจารณาจากค่าเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ของยานาโปรเซน เมื่ออยู่ในพลาสติกและเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐานของสารแยกพลาสติกไมโครตีนชนิดเดียวกัน มีค่าเท่ากัน (นาโปรเซน = 4.87 นาที ทั้งเมื่ออยู่ในพลาสติกและสารละลายมาตรฐาน) ดังแสดงในรูปที่ 40



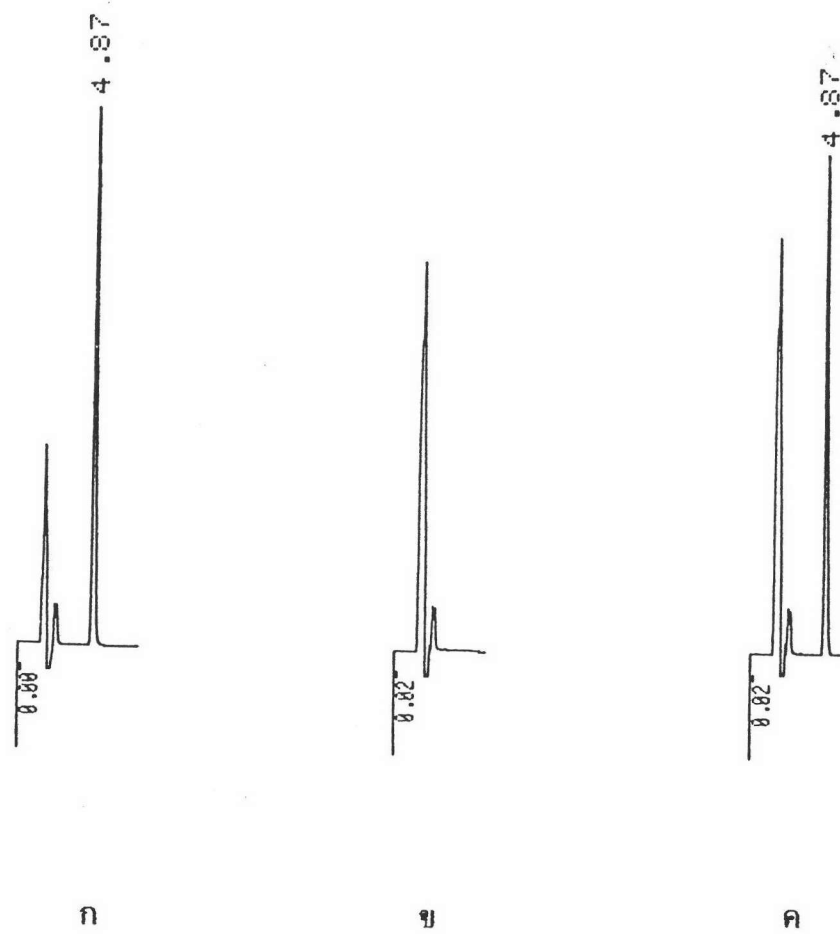
รูปที่ 39 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ
 ยานาโปรเซน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอสिटโนไตรลล์
 โดยเทคนิค HPLC

ก. เป็นโครมาโทแกรมของนาโปรเซนในสารละลายมาตรฐาน

ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา

ค. เป็นโครมาโทแกรมของนาโปรเซนในพลาสมา

ความเข้มข้น 120.0 มกค./มล. (ใช้แอทเทนนูเอชั่น 2^7)



รูปที่ 40 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ
 ยานาโปรเซน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล
 โดยเทคนิค HPLC

ก. เป็นโครมาโทแกรมของนาโปรเซนในสารละลายมาตรฐาน

ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบบลค์พลาสมา

ค. เป็นโครมาโทแกรมของนาโปรเซนในพลาสมา

ความเข้มข้น 120.0 มคก./มล. (ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^7)

3) เบอร์เซนต์การคืนกลับของยา

ผลการทดลองหาเบอร์เซนต์การคืนกลับของยาในพลาสติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้แอสซีโตนไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน มีค่า = $86.39 \pm 2.93\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่ฟิควาและมีค่า = $82.65 \pm 2.78\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของฟิควา ดังแสดงในตารางที่ 93 และเมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีนมีค่า = $92.14 \pm 5.39\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่ฟิควาและมีค่า = $92.70 \pm 4.64\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงฟิควา โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก ดังแสดงในตารางที่ 94

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการแยกพลาสติกโปรตีนของตัวอย่างพลาสติกของยานาโปรเซน จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 95

3.10.ข การ validate วิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ยานาโปรเซนในพลาสติก ที่ผ่านการประเมินผลการแยกพลาสติกโปรตีน เป็นการใช้อัสซีโตนไนโตรส และเมทานอลในการแยกพลาสติกโปรตีน

1) การศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสาร

แสดงในเทอมของเบอร์เซนต์การคืนกลับของยา ดังรายละเอียดในข้อ 3.10.ก. 3)

2) ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ฟิควากับความเข้มข้นของยาในพลาสติก

ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ฟิความีนาโปรเซนกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก เมื่อใช้อัสซีโตนไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีนที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.24 - 120.0 มก./มล.พลาสติก ดังแสดงในรูปที่ 41 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = - 4721.0018 + 7.4238 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่พืดยานาโปรเซน และ X เป็นความเข้มข้นของยานาโปรเซน
ในพลาสติก (นาโนกรัม/มล. พลาสติก) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2)
= 0.99780

ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พืดยานาโปรเซน กับ
ความเข้มข้นของยาในพลาสติก เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน
ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาคือ 0.24-120.0 มคก./มล.
พลาสติก ดังแสดงในรูปที่ 42 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear
regression คือ

$$Y = 8053.8625 + 9.9222 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่พืดยานาโปรเซน และ X เป็นความเข้มข้นของยานาโปรเซน
ในพลาสติก (นาโนกรัม/มล. พลาสติก) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2)
= 0.99936

3) ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของ
วิธีวิเคราะห์พิจารณาจากโครมาโทแกรมดังรูปที่ 39 และ 40 แสดงให้เห็นว่าวิธี
วิเคราะห์หาปริมาณยานาโปรเซนในพลาสติกโดยใช้แอซีโตไนโตรสและเมทานอล
เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน มีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังรายละเอียดในข้อ
3.10 ก. 2) ก) และ ข)

4) การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์

จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของ
ยานาโปรเซนในพลาสติกที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 คือ 0.24
มคก./มล.พลาสติก (S/N ratio เฉลี่ย = 2.64 ± 0.14 ; %CV = 5.30%)

และ 0.24 มก./มล. (S/N ratio เฉลี่ย = 2.50 ± 0.16 ; %CV = 6.40%) สำหรับการวิเคราะห์ไอโซโทปไนโตรเจนและเมทานอล ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 96

5) ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวัน

เดียวกันและระหว่างวัน โดยใช้ไอโซโทปไนโตรเจนเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 97 และ 98 ตามลำดับ จะเห็นว่า ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.24-120.0 มก./มล. พลาสติก มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 2.00-6.65% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 2.33-7.70% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 4.16-8.60% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 4.53-9.17% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยานาโปรเซนในพลาสติก โดยการแยกพลาสติกมาโปรตีนด้วยไอโซโทปไนโตรเจนนี้ แม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

สำหรับการแยกพลาสติกมาโปรตีนด้วยเมทานอล ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.24-120.0 มก./มล. พลาสติก ดังแสดงในตารางที่ 99 และ 100 มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 1.08-5.26% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 1.16-6.94% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 1.38-5.98% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 1.76-7.84% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยานาโปรเซนในพลาสติกนี้ แม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

ตารางที่ 93 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยานาโปรเซนในพลาสมาเมื่อใช้แอซีไดนาโดรล์
เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (physical recovery;n=6)

| ก. พื้นที่พิกษา | | | | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 2.4 | 86.38 | 88.05 | 87.65 | 82.67 | 86.72 | 89.73 | 86.87(2.37) | 2.73 |
| 12.0 | 86.32 | 84.86 | 85.07 | 88.19 | 85.35 | 84.75 | 85.76(1.32) | 1.54 |
| 48.0 | 87.10 | 83.96 | 84.60 | 83.15 | 84.68 | 82.04 | 84.26(1.71) | 2.03 |
| 84.0 | 88.26 | 87.98 | 88.39 | 84.69 | 83.40 | 84.40 | 86.19(2.26) | 2.62 |
| 120.0 | 83.40 | 90.92 | 90.63 | 89.59 | 88.73 | 90.10 | 88.90(2.80) | 3.15 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 86.39(2.53) | 2.93 |
| ข. ความสูงพิกษา(มม.) | | | | | | | | |
| 2.4 | 82.35 | 82.35 | 82.35 | 84.21 | 81.25 | 81.25 | 82.29(1.08) | 1.32 |
| 12.0 | 87.50 | 81.33 | 82.05 | 81.25 | 83.12 | 81.25 | 82.75(2.44) | 2.95 |
| 48.0 | 84.00 | 80.28 | 79.21 | 80.07 | 80.73 | 79.70 | 80.66(1.71) | 2.12 |
| 84.0 | 86.03 | 84.23 | 84.39 | 81.44 | 79.58 | 81.43 | 82.85(2.41) | 2.91 |
| 120.0 | 80.75 | 86.31 | 86.23 | 85.22 | 83.31 | 86.23 | 84.68(2.24) | 2.64 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 82.65(2.30) | 2.78 |

* ความเข้มข้นของนาโปรเซน

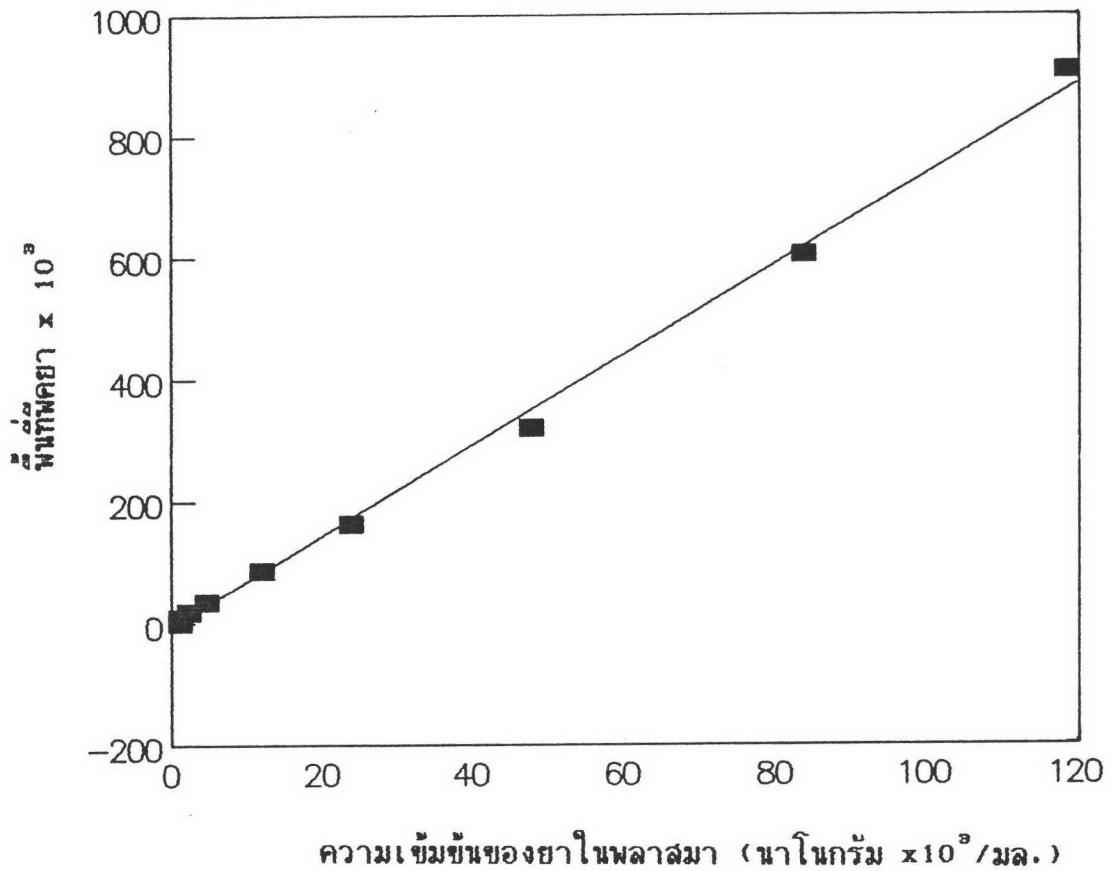
ตารางที่ 94 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยานาโปรเซนในพลาสติกเมื่อใช้เมทานอล
เป็นสารแยกพลาสติกนาโปรตีน (physical recovery;n=6)

| ก. พื้นที่พิกษา | | | | | | | | |
|----------------------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 2.4 | 97.72 | 92.78 | 86.18 | 80.33 | 82.80 | 80.05 | 86.64(7.19) | 8.30 |
| 12.0 | 93.10 | 89.44 | 88.43 | 90.89 | 89.88 | 90.69 | 90.40(1.59) | 1.76 |
| 48.0 | 99.13 | 100.42 | 93.42 | 93.66 | 88.99 | 96.09 | 95.28(4.18) | 4.39 |
| 84.0 | 96.82 | 94.47 | 91.58 | 92.25 | 91.78 | 92.79 | 93.28(2.02) | 2.16 |
| 120.0 | 95.54 | 94.24 | 94.47 | 92.85 | 98.23 | 95.35 | 95.11(1.80) | 1.90 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 92.14(4.96) | 5.39 |
| ข. ความสูงพิกษา(มม.) | | | | | | | | |
| 2.4 | 95.45 | 100.00 | 82.14 | 96.30 | 92.00 | 96.43 | 93.72(6.22) | 6.64 |
| 12.0 | 95.18 | 89.00 | 83.91 | 87.78 | 84.85 | 92.44 | 88.86(4.35) | 4.89 |
| 48.0 | 97.99 | 98.80 | 90.37 | 91.33 | 87.81 | 95.02 | 93.55(4.41) | 4.72 |
| 84.0 | 95.40 | 93.69 | 91.36 | 92.46 | 90.94 | 92.54 | 92.73(1.63) | 1.75 |
| 120.0 | 93.93 | 93.84 | 94.70 | 92.70 | 97.80 | 94.93 | 94.65(1.73) | 1.83 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 92.70(4.30) | 4.64 |

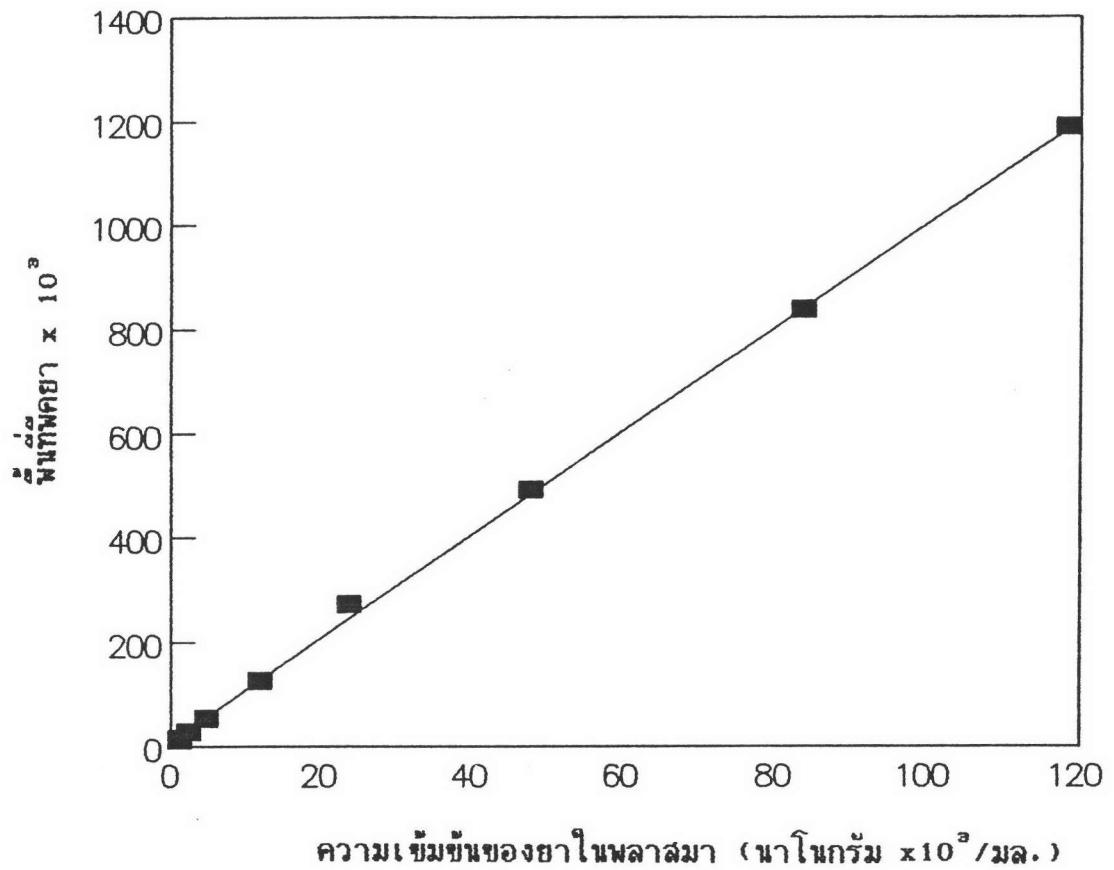
* ความเข้มข้นของนาโปรเซน

ตารางที่ 95 สรุปการวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของยานาโปรเซน

| | | CH ₃ CN | CH ₃ OH |
|---------------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| Appearance | | pass | pass |
| Chromatogram | | pass | pass |
| %Physical Recovery (n=30) | | pass | pass |
| -peak area | \bar{X} (SD) | 86.39(2.53) | 92.14(4.96) |
| | %CV | 2.93 | 5.39 |
| -peak height | \bar{X} (SD) | 82.65(2.30) | 92.70(4.30) |
| | %CV | 2.78 | 4.64 |



- รูปที่ 41 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผิวคานาโปรเซน กับความเข้มข้นของคานาโปรเซน ในพลาสติก เมื่อแยกพลาสติกโปรตีนด้วยแอสิตอนไตรล์
สมการเส้นตรง คือ $Y = 7.4238X - 4721.0018$
 $r^2 = 0.99780$



รูปที่ 42 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผกยานาโปรเซน กับความเข้มข้นของยานาโปรเซน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล
สมการเส้นตรง คือ $Y = 9.9222X + 8053.8625$
 $r^2 = 0.99936$

ตารางที่ 96 ค่าอัตราส่วน S/N ของการวิเคราะห์นาโปรเซนในพลาสมา
เมื่อใช้แอสีโตไนโตรสและเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

| S/N ratio | |
|--------------------------|--------------------------|
| แอสีโตไนโตรส* | เมทานอล** |
| 2.69 | 2.63 |
| 2.60 | 2.46 |
| 2.62 | 2.30 |
| 2.73 | 2.60 |
| 2.85 | 2.28 |
| 2.71 | 2.53 |
| 2.58 | 2.38 |
| 2.65 | 2.51 |
| 2.31 | 2.46 |
| 2.69 | 2.81 |
| $\bar{X}(SD)=2.64(0.14)$ | $\bar{X}(SD)=2.50(0.16)$ |
| %CV = 5.30 | %CV = 6.40 |

* ความเข้มข้นของนาโปรเซน = 0.24 มคก./มล.

**ความเข้มข้นของนาโปรเซน = 0.24 มคก./มล.

ตารางที่ 97 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยานาโปรเซนในพลาสมา
 ภายในวันเดียวกันเมื่อใช้แอซีไตโนไตรด์เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
 (within-run precision;n=3)

| ก. พื้นที่ผิวยา | | | | | |
|----------------------------|--------|---------|---------|-------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.24 | 3295 | 3642 | 3674 | 3537.0(210.2) | 5.94 |
| 2.4 | 37371 | 34305 | 37970 | 36548.7(1966.0) | 5.38 |
| 12.0 | 118074 | 113349 | 113506 | 114976.3(2683.8) | 2.33 |
| 48.0 | 408836 | 470968 | 466159 | 448654.3(34567.4) | 7.70 |
| 84.0 | 674342 | 698846 | 707935 | 693707.7(17376.0) | 2.50 |
| 120.0 | 894958 | 1013720 | 1020091 | 976256.3(70478.4) | 7.22 |
| ข. ความสูงพีคยา (มม.) | | | | | |
| 0.24** | 1.0 | 1.1 | 1.0 | 1.03(0.06) | 5.59 |
| 2.4 | 1.7 | 1.7 | 1.6 | 1.67(0.06) | 3.46 |
| 12.0 | 5.1 | 5.0 | 4.9 | 5.00(0.10) | 2.00 |
| 48.0 | 18.1 | 20.3 | 20.1 | 19.50(1.22) | 6.24 |
| 84.0 | 28.8 | 29.9 | 30.2 | 29.63(0.74) | 2.49 |
| 120.0 | 38.1 | 42.8 | 42.9 | 41.27(2.74) | 6.65 |

* ความเข้มข้นของยานาโปรเซน

** ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^5

ตารางที่ 98 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณนาโปรเซนในพลาสมา ระหว่างวัน
เมื่อใช้แอซีไตโนเตรสเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | | | |
|----------------------------|---------|---------|--------|---------|--------|--------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.24 | 3062 | 3404 | 2997 | 3280 | 3295 | 3207.6(171.0) | 5.33 |
| 2.4 | 40659 | 36765 | 36561 | 38910 | 37371 | 38053.2(1723.1) | 4.53 |
| 12.0 | 103011 | 108294 | 98810 | 109204 | 118074 | 107478.6(7263.1) | 6.76 |
| 48.0 | 494750 | 481692 | 409214 | 429286 | 408836 | 444755.6(40793.6) | 9.17 |
| 84.0 | 705518 | 763560 | 641570 | 642184 | 674342 | 685434.8(51050.7) | 7.45 |
| 120.0 | 1072324 | 1129129 | 989485 | 1012952 | 894958 | 1019769.6(88406.8) | 8.67 |
| ข. ความสูงพีคยา (มม.) | | | | | | | |
| 0.24** | 0.9 | 0.9 | 0.8 | 0.9 | 1.0 | 0.90(0.07) | 7.86 |
| 2.4 | 1.8 | 1.6 | 1.7 | 1.7 | 1.7 | 1.70(0.07) | 4.16 |
| 12.0 | 4.8 | 4.7 | 4.1 | 4.8 | 5.1 | 4.70(0.37) | 7.82 |
| 48.0 | 21.1 | 20.7 | 17.6 | 18.1 | 18.1 | 19.12(1.64) | 8.60 |
| 84.0 | 29.6 | 32.5 | 27.0 | 26.5 | 28.8 | 28.88(2.39) | 8.27 |
| 120.0 | 44.3 | 46.9 | 41.0 | 41.9 | 38.1 | 42.44(3.34) | 7.86 |

* ความเข้มข้นของนาโปรเซน

**ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^5

ตารางที่ 99 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยานาโปรเซนในพลาสติก
ภายในวันเดียวกัน เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกนาโปรตีน
(within-run precision;n=3)

| ก. พื้นที่ผิวยา | | | | | |
|----------------------------|---------|---------|---------|--------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.24 | 4863 | 4567 | 4338 | 4589.3(263.2) | 5.74 |
| 2.4 | 34055 | 34092 | 38343 | 35496.7(2465.1) | 6.94 |
| 12.0 | 153354 | 154890 | 149659 | 152634.3(2688.7) | 1.76 |
| 48.0 | 576983 | 590073 | 586683 | 584579.7(6793.7) | 1.16 |
| 84.0 | 876964 | 875543 | 896713 | 883073.3(11833.6) | 1.34 |
| 120.0 | 1291848 | 1250347 | 1291680 | 1277958.3(23912.3) | 1.87 |
| ข. ความสูงพีคยา(มม.) | | | | | |
| 0.24** | 2.0 | 1.9 | 1.8 | 1.90(0.10) | 5.26 |
| 2.4 | 2.0 | 1.9 | 2.0 | 1.97(0.06) | 2.94 |
| 12.0 | 7.8 | 8.1 | 7.6 | 7.83(0.25) | 3.21 |
| 48.0 | 29.3 | 29.9 | 29.8 | 29.67(0.32) | 1.08 |
| 84.0 | 44.1 | 43.9 | 44.9 | 44.30(0.53) | 1.19 |
| 120.0 | 64.3 | 62.3 | 64.2 | 63.60(1.13) | 1.77 |

* ความเข้มข้นของนาโปรเซน

** ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^5

ตารางที่ 100 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณนาโปรเซนในพลาสติก ระหว่างวัน
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติก (between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่ผิวยา | | | | | | | |
|----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|--------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.24 | 4376 | 4096 | 4167 | 4778 | 4863 | 4456.0(349.6) | 7.84 |
| 2.4 | 33404 | 38031 | 39712 | 38333 | 34055 | 36707.0(2800.4) | 7.63 |
| 12.0 | 143752 | 144155 | 153201 | 151812 | 153354 | 149254.8(4878.6) | 3.27 |
| 48.0 | 536083 | 540300 | 566218 | 576012 | 576983 | 559119.2(19619.5) | 3.51 |
| 84.0 | 919772 | 906122 | 894852 | 904965 | 876964 | 900535.0(15880.7) | 1.76 |
| 120.0 | 1285694 | 1315647 | 1256296 | 1227842 | 1291848 | 1275465.4(33996.4) | 2.66 |
| ข. ความสูงพียา (มม.) | | | | | | | |
| 0.24** | 1.8 | 1.8 | 1.8 | 1.9 | 2.0 | 1.86(0.09) | 4.81 |
| 2.4 | 1.8 | 1.9 | 1.9 | 1.9 | 2.0 | 1.90(0.07) | 3.72 |
| 12.0 | 7.0 | 7.1 | 7.9 | 7.9 | 7.8 | 7.54(0.45) | 5.98 |
| 48.0 | 26.8 | 26.8 | 28.1 | 28.2 | 29.3 | 27.84(1.06) | 3.81 |
| 84.0 | 45.4 | 44.0 | 43.9 | 44.2 | 44.1 | 44.32(0.61) | 1.38 |
| 120.0 | 62.9 | 63.9 | 60.7 | 60.0 | 64.3 | 62.36(1.92) | 3.08 |

* ความเข้มข้นของนาโปรเซน

**ใช้แอทเทนนูเอชั่น 2^5

6) ปริมาณต่ำสุดของตัวยาในตัวอย่างพลาสติก

สามารถวิเคราะห์ได้

จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.24-120.0 มก./มล. พลาสติก สำหรับความเข้มข้น 0.24 มก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 5.94 และ 5.33% เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีค และให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 5.59 และ 7.86% เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีค สำหรับการแยกพลาสติกโปรตีนด้วยแอสิตาโนไตรล ดังนั้นจึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยานาโปรเซน 0.24 มก./มล. เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย

สำหรับการแยกพลาสติกโปรตีนด้วยเมทานอล ผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน ของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.24-120.0 มก./มล. พลาสติก สำหรับความเข้มข้น 0.24 มก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์นั้น ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 5.74 และ 7.84% เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีค และให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 5.26 และ 4.81% เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีค ดังนั้นจึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยานาโปรเซน 0.24 มก./มล. พลาสติก เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย

7) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมิน (จากขั้นตอนที่ 4) มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกที่รับมาจากจำนวน 9 ตัวอย่าง คือ ที่ความเข้มข้น 12.0, 48.0 และ 120.0 มก./มล. (ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% Analytical recovery) ดังแสดงในตารางที่ 101 และ 102 พบว่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่แยกพลาสติกโปรตีนด้วยแอสิตาโนไตรล และเมทานอลใน

ความเข้มข้นที่แตกต่างกันก็ทำให้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ = $97.73 \pm 3.34\%$ และ $99.28 \pm 1.88\%$ ตามลำดับ ซึ่งเป็นเครื่องยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยาโปรเซนได้ถูกต้องแม่นยำจริง ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาโปรเซนในพลาสมา โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 103

เนื่องจากผลการศึกษาการวิเคราะห์ยานาโปรเซนในพลาสมาในแง่การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน และ validate วิธีวิเคราะห์นั้น ปรากฏว่าผ่านการประเมินทั้งการใช้ แอซีโตไนโตรสและเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ดังนั้นเพื่อเป็นการทดสอบความแตกต่างในเชิงสถิติของค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาจากการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้งสองตัวดังกล่าว ผลจากตารางที่ 93 และ 94 ทั้งเมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและความสูงพีคยา จึงทำการเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าว โดยใช้ 2 tailed unpaired student t-test (รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ง) ผลการทดสอบปรากฏว่าค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยา จากการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้งสองตัว ทั้งเมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและความสูงพีคยา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นั่นคือ การใช้แอซีโตไนโตรสและเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ในการวิเคราะห์หาปริมาณยาโปรเซนในพลาสมาให้ผลที่แตกต่างกัน โดยการใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาที่ดีกว่าการใช้แอซีโตไนโตรส

ตารางที่ 101 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยานาโปรเซนในพลาสติก
เมื่อใช้แอสซีไตไนตรัสเป็นสารแยกพลาสติกนาโปรตีน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสติก (มก./มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (มก./มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|--|--|---|
| 12 | 12.1 | 100.83 |
| 12 | 11.3 | 94.17 |
| 12 | 10.9 | 90.83 |
| 48 | 48.5 | 101.04 |
| 48 | 47.5 | 98.96 |
| 48 | 47.2 | 98.33 |
| 120 | 118.9 | 99.08 |
| 120 | 117.2 | 97.67 |
| 120 | 118.4 | 98.67 |
| | | $\bar{X}(SD)=97.73(3.27)$ %CV = 3.34 |

ตารางที่ 102 เปรอ์เซนต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยานาโปรเซนในพลาสติก
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกนาโปรตีน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสติก (มคก./มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (มคก./มล.) | เปอร์เซนต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|---|---|--|
| 12 | 12.1 | 100.83 |
| 12 | 11.9 | 99.17 |
| 12 | 11.6 | 97.67 |
| 48 | 48.9 | 101.88 |
| 48 | 48.0 | 100.00 |
| 48 | 48.7 | 101.46 |
| 120 | 117.9 | 98.25 |
| 120 | 117.3 | 97.75 |
| 120 | 117.0 | 97.50 |
| | | $\bar{X}(SD)=99.28(1.86)$ $\%CV = 1.88$ |

ตารางที่ 103 สรุปการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาในปัสสาวะโดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน

| | conc. ($\mu\text{g/ml}$) | CH_3CN | CH_3OH |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------|
| <u>%Phy.Reco.</u> (n=30) | 2.4-120.0 | | |
| -peak area \bar{X} (SD) | | 86.39(2.53) | 92.14(4.96) |
| %CV | | 2.93 | 5.39 |
| -peak height \bar{X} (SD) | | 82.65(2.30) | 92.70(4.30) |
| %CV | | 2.78 | 4.64 |
| <u>Linearity</u> | 0.24-120.0 | | |
| Eq. Y= | | -4721.0018+7.4238X | 8053.8625+9.9222X |
| r^2 | | 0.99780 | 0.99936 |
| <u>Specificity</u> | | | |
| <u>LLD</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.24 | 0.24 |
| <u>Precision</u> %CV | 0.24-120.0 | | |
| -within-run (n=3) | | | |
| peak area | | 2.33-7.70 | 1.16-6.94 |
| peak height | | 2.00-6.65 | 1.08-5.26 |
| -between-run (n=5) | | | |
| peak area | | 4.53-9.17 | 1.76-7.48 |
| peak height | | 4.16-8.60 | 1.38-5.98 |
| <u>LLQ</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.24 | 0.24 |
| <u>%Anal.Reco.</u> (n=9) | | | |
| \bar{X} (SD) | | 97.73(3.27) | 99.28(1.86) |
| %CV | | 3.34 | 1.88 |

3.11 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ยาฟิโนลปีวทาโซนในพลาสติก

3.11.ก การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสติกโปรตีน (ขั้นที่ 1)

1) ลักษณะตัวอย่างพลาสติกหลังเติมสารแยกพลาสติกโปรตีนลงในตัวอย่างพลาสติก

ก) เมื่อใช้แอสซีไตไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสติกโปรตีนจับกันแน่น เป็นก้อนขนาดใหญ่สีเหลืองอมส้มเกาะติดที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาตรน้อย ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่า

- สารละลายสีที่แยกออกมาเป็นสีเหลือง มีความใสสะอาด มีปริมาณมาก มี pH ประมาณ 7

ข) เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสติกโปรตีน เป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อน จับกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณมาก ผิวหน้าตะกอนฟุ้งกระจายเล็กน้อย เมื่อเขย่าอย่างแรง

- สารละลายสีที่แยกออกมา เป็นสีเหลืองอ่อน มีความใสสะอาด มีปริมาตรประมาณ 2.5 เท่า ของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

2) ลักษณะโครมาโทแกรม

ก) เมื่อใช้แอสซีไตไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน

จากโครมาโทแกรมของแบบลงค์พลาสติกและตัวอย่างพลาสติก จะเห็นว่าพีคของยาบนโครมาโทแกรม ปรากฏเป็นพีคเดี่ยว และไม่ถูกรบกวนจากพีคของ endogenous ซึ่งมีขนาดใหญ่ เนื่องจากพีคของ endogenous ถูกชะออกมาได้หมดก่อนพีคยา ดังแสดงรูปที่ 43 พิจารณาจากพีคของยาฟิโนลปีวทาโซน เมื่ออยู่ในพลาสติกและเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐาน

ของสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกัน จะเห็นว่ามีลักษณะเหมือนกันและมีค่าเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ที่เท่ากัน (ฟีนิลบิวทาไซน = 5.76 นาที ทั้งเมื่ออยู่ในพลาสติกและสารละลายมาตรฐาน ตามลำดับ) แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

ข) เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกัน

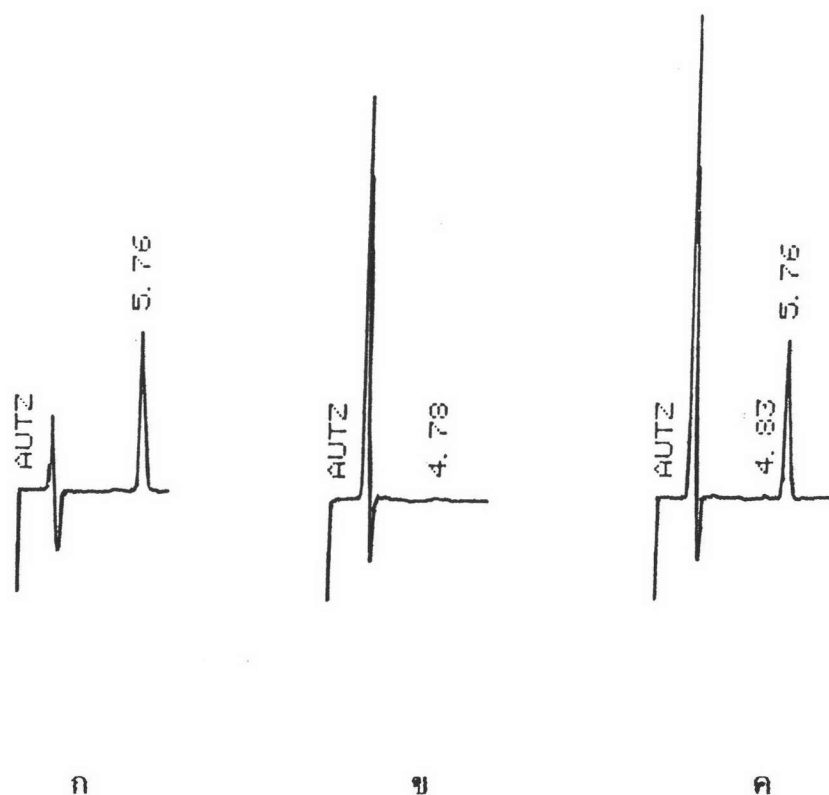
โครมาโทแกรมที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกับก.

แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ พิจารณาจากค่าเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ของยาอินโดเมทาซินเมื่ออยู่ในพลาสติก และเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐานของสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกันมีค่าเท่ากัน (ฟีนิลบิวทาไซน = 5.67 นาที เมื่ออยู่ในพลาสติกและสารละลายมาตรฐานตามลำดับ) ดังแสดงในรูปที่ 44

3) เบอร์เซนต์การคืนกลับของยา

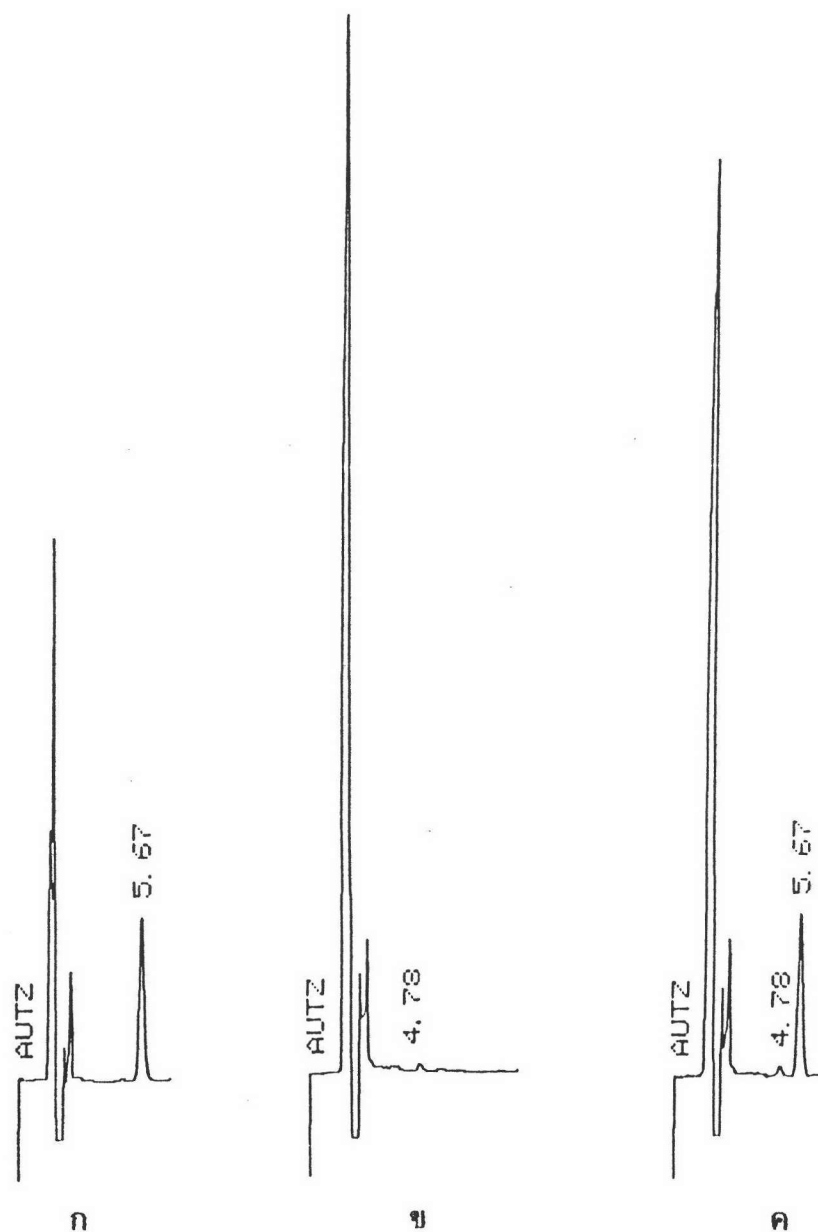
ผลการทดลองหาเบอร์เซนต์การคืนกลับของยาในพลาสติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้แอซีโตไนโตรล์เป็นสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกันมีค่า $106.62 \pm 6.79\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและอยู่มีค่า = $105.65 \pm 7.38\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของพีคยา ดังแสดงในตารางที่ 104 และเมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกันมีค่า = $102.88 \pm 2.38\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า = $103.52 \pm 6.20\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีคยา ดังแสดงในตารางที่ 105 ซึ่งจะเห็นว่าเบอร์เซนต์การคืนกลับของยาในพลาสติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้แอซีโตไนโตรล์และเมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกชนิดเดียวกัน มีแนวโน้มที่ค่าเกิน 100% จึงไม่ผ่านเกณฑ์การประเมิน

ดังนั้นการทดลองขั้นต่อไป จะเป็นการวิเคราะห์ปริมาณยาฟีนิลบิวทาไซน โดยใช้ซิงค์ซัลเฟต ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ประจำตัว ร่วมกับแอซีโตไนโตรล์และเมทานอล ตามลำดับ ในการแยกพลาสติกชนิดเดียวกัน



รูปที่ 43 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาฟิโนบิวทาโซน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยแอซีโตไนไตรล์ โดยเทคนิค HPLC

- ก. เป็นโครมาโทแกรมของฟิโนบิวทาโซนในสารละลายมาตรฐาน
- ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลนด์พลาสมา
- ค. เป็นโครมาโทแกรมของฟิโนบิวทาโซนในพลาสมา
ความเข้มข้น 25.0 มคก./มล. (ใช้แอทเทนชัน 2^7)



รูปที่ 44 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาฟีนิลบิวทาโซน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล โดยเทคนิค HPLC

ก. เป็นโครมาโทแกรมของฟีนิลบิวทาโซนในสารละลายมาตรฐาน

ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบบลค์พลาสมา

ค. เป็นโครมาโทแกรมของฟีนิลบิวทาโซนในพลาสมา

ความเข้มข้น 25.0 มคก./มล. (ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^7)

ตารางที่ 104 เปอร์เซนต์การคืนกลับของยาฟีนิลปิวทาโซนในพลาสมาเมื่อใช้แอสีไตโนดรัส
เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (physical recovery; n=6)

| ก. พื้นที่ผิวยา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.5 | 106.35 | 111.47 | 98.87 | 123.55 | 118.58 | 104.18 | 110.50(9.26) | 8.38 |
| 2.0 | 104.75 | 108.19 | 106.36 | 119.98 | 116.87 | 122.36 | 113.08(7.57) | 6.69 |
| 5.0 | 112.48 | 100.68 | 110.96 | 106.80 | 104.70 | 100.37 | 106.00(5.08) | 4.79 |
| 25.0 | 97.82 | 103.38 | 101.60 | 100.68 | 100.92 | 100.80 | 100.87(1.80) | 1.78 |
| 100.0 | 104.12 | 101.50 | 100.76 | 100.26 | 106.18 | 103.14 | 102.66(2.26) | 2.20 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 106.62(7.24) | 6.79 |
| ข. ความสูงผิวยา(มม.) | | | | | | | | |
| 0.5 | 104.84 | 102.95 | 107.98 | 106.12 | 96.47 | 102.12 | 103.41(4.01) | 3.88 |
| 2.0 | 103.04 | 106.57 | 101.59 | 100.07 | 105.78 | 98.71 | 102.63(3.12) | 3.04 |
| 5.0 | 102.43 | 101.64 | 104.92 | 102.25 | 106.95 | 102.93 | 103.52(2.02) | 1.95 |
| 25.0 | 101.41 | 103.54 | 101.08 | 102.52 | 102.64 | 101.07 | 102.04(1.01) | 1.00 |
| 100.0 | 104.51 | 101.04 | 104.07 | 103.51 | 101.42 | 102.30 | 102.81(1.43) | 1.40 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 102.88(2.45) | 2.38 |

* ความเข้มข้นของฟีนิลปิวทาโซน

ตารางที่ 105 เปรู เซนต์การคืนกลับของยาฟีนิลปิวทาโซนในพลาสมาเมื่อใช้เมทานอล
เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (physical recovery; n=6)

| ก. พื้นที่ผิวยา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|-------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.5 | 106.67 | 100.00 | 100.00 | 126.67 | 105.88 | 118.78 | 109.66(10.79) | 9.84 |
| 2.0 | 105.26 | 100.00 | 100.00 | 111.76 | 125.00 | 105.56 | 107.93(9.43) | 8.74 |
| 5.0 | 112.20 | 106.67 | 108.89 | 119.05 | 102.08 | 104.17 | 108.84(6.13) | 5.63 |
| 25.0 | 94.57 | 103.24 | 100.45 | 99.08 | 102.26 | 101.36 | 100.16(3.09) | 3.09 |
| 100.0 | 103.55 | 100.22 | 98.39 | 99.56 | 105.63 | 102.55 | 101.65(2.73) | 2.69 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 105.65(7.80) | 7.38 |
| ข. ความสูงที่คยา(มม.) | | | | | | | | |
| 0.5 | 105.88 | 111.76 | 111.76 | 105.00 | 90.00 | 100.00 | 104.07(8.21) | 7.89 |
| 2.0 | 110.00 | 94.74 | 118.75 | 95.00 | 100.00 | 116.67 | 105.86(10.73) | 10.14 |
| 5.0 | 106.52 | 100.00 | 104.44 | 108.33 | 100.00 | 104.26 | 103.92(3.39) | 3.26 |
| 25.0 | 99.14 | 101.70 | 100.42 | 101.32 | 103.07 | 97.41 | 100.51(2.01) | 2.00 |
| 100.0 | 112.18 | 101.74 | 104.08 | 102.81 | 99.38 | 99.26 | 103.24(4.77) | 4.62 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 103.52(6.42) | 6.20 |

* ความเข้มข้นของฟีนิลปิวทาโซน

3.11.ก การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน (ขั้นที่ 2)

1) ลักษณะตัวอย่างพลาสมาหลังเติมสารแยกพลาสมาโปรตีนลงในตัวอย่างพลาสมา

ก) เมื่อใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสซีโตไนโตรส เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสมาโปรตีน เป็นผงละเอียดสีขาวนวล จับกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณน้อย ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่า

- สารละลายใสที่แยกออกมาเป็นสีเหลือง มีความใสสะอาด มีปริมาตรประมาณ 2 เท่าของปริมาตรตะกอน มี pH ประมาณ 7

ข) เมื่อใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสมาโปรตีน ลักษณะเช่นเดียวกับ ก)

- สารละลายใสที่แยกออกมา มีลักษณะเช่นเดียวกับ ก)

2) ลักษณะโครมาโทแกรม

ก) เมื่อใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสซีโตไนโตรส เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

จากโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมาและตัวอย่างพลาสมา จะเห็นว่าพีคของยาบนโครมาโทแกรม ปรากฏเป็นพีคเดี่ยวและไม่ถูกรบกวนจากพีคของ endogenous ซึ่งมีขนาดใหญ่ เนื่องจากพีคของ endogenous ถูกชะออกมาได้หมดก่อนพีคยา ดังแสดงในรูปที่ 45 พิจารณาจากพีคของยาฟิโนลพิวทาโซน เมื่ออยู่ในพลาสมาและเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐานของสารแยกพลาสมาโปรตีนชนิดเดียวกัน จะเห็นว่ามีลักษณะเหมือนกันและมีค่า

เวลาที่รีเทนในคอลัมน์ที่เท่ากัน (ฟีนิลบิวทาโซน = 5.65 นาที ทั้งเมื่ออยู่ในพลาสติกและสารละลายมาตรฐาน) แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

ข) เมื่อใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล
เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน

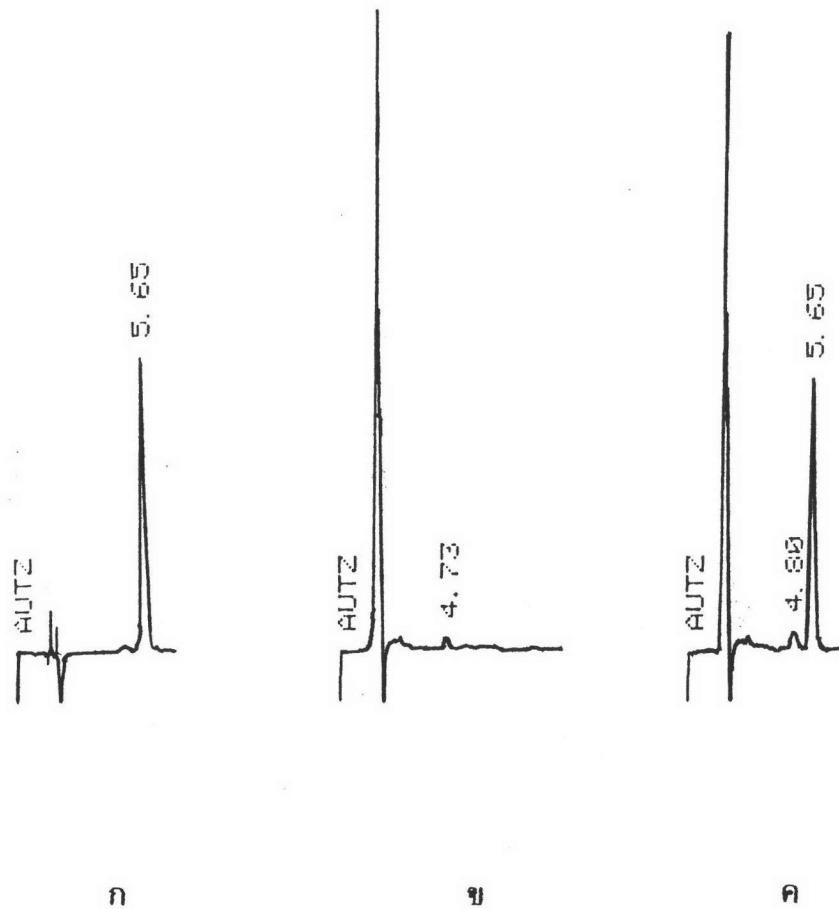
โครมาโทแกรมที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกับก.

แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ พิจารณาจากค่าเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ของยาฟีนิลบิวทาโซน เมื่ออยู่ในพลาสติกและเมื่ออยู่ในสารละลายมาตรฐานของสารแยกพลาสติกโปรตีนชนิดเดียวกันมีค่าเท่ากัน (ฟีนิลบิวทาโซน = 5.71 นาที และ 5.69 นาที เมื่ออยู่ในพลาสติกและสารละลายมาตรฐานตามลำดับ) ดังแสดงในรูปที่ 46

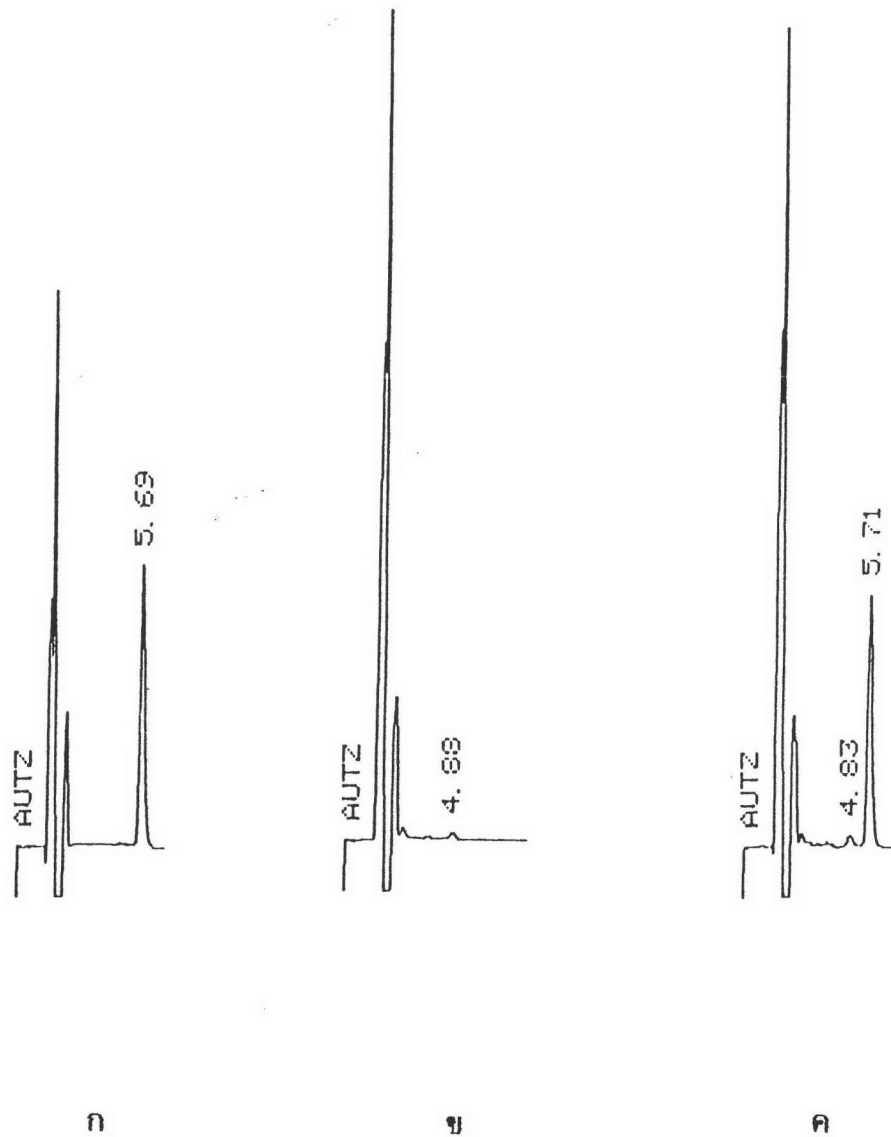
3) เพอร์เซนต์การคืนกลับของยา

ผลการทดลองหาเปอร์เซนต์การคืนกลับของยาในพลาสติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอซีโตนไนโตรส เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน มีค่า = $96.91 \pm 3.77\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า $98.08 \pm 3.57\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของพีคยา และเมื่อใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล เป็นสารแยกพลาสติกโปรตีนมีค่า $95.95 \pm 4.98\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยา และมีค่า = $97.22 \pm 3.18\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีคยา โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก ดังแสดงในตารางที่ 106 และ 107 ตามลำดับ

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการแยกพลาสติกโปรตีนของตัวอย่างพลาสติกของยาฟีนิลบิวทาโซน จึงทำการรวบรวมดังแสดงในตารางที่ 108



- รูปที่ 45** โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาฟิโนลิวทาโซน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสีโตไนไตรล์ โดยเทคนิค HPLC
- ก. เป็นโครมาโทแกรมของฟิโนลิวทาโซนในสารละลายมาตรฐาน
 - ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบบลค์พลาสมา
 - ค. เป็นโครมาโทแกรมของฟิโนลิวทาโซนในพลาสมา
- ความเข้มข้น 25.0 มก./มล. (ใช้แอกแทนนูเอชั่น 2^7)



- รูปที่ 46** โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาฟิโนลิวทาโซน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล โดยเทคนิค HPLC
- ก. เป็นโครมาโทแกรมของฟิโนลิวทาโซนในสารละลายมาตรฐาน
 - ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา
 - ค. เป็นโครมาโทแกรมของฟิโนลิวทาโซนในพลาสมา
- ความเข้มข้น 25.0 มคก./มล. (ใช้แอนเทนนูเอชั่น 2^7)

ตารางที่ 106 เบอร์เซนต์การคืนกลับของยาฟีนิลปิวทาโซนในพลาสมา เมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟต ร่วมกับแอสีไคนาโตรัสเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (physical recovery; n=6)

| ก. พื้นที่ผิวยา | | | | | | | | |
|----------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.5 | 99.70 | 98.24 | 99.02 | 100.53 | 105.32 | 88.20 | 98.50(5.63) | 5.72 |
| 2.0 | 89.98 | 95.79 | 92.73 | 100.05 | 96.26 | 95.78 | 95.10(3.42) | 3.60 |
| 5.0 | 92.27 | 93.53 | 92.51 | 96.85 | 94.44 | 95.42 | 94.17(1.76) | 1.88 |
| 25.0 | 98.42 | 98.17 | 97.18 | 98.05 | 100.34 | 98.29 | 98.41(1.04) | 1.06 |
| 100.0 | 93.27 | 96.66 | 100.45 | 100.85 | 99.62 | 99.52 | 98.40(2.91) | 2.96 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 96.91(3.65) | 3.77 |
| ข. ความสูงผิวยา(มม.) | | | | | | | | |
| 0.5 | 90.00 | 100.00 | 96.55 | 96.97 | 93.75 | 89.28 | 94.42(4.21) | 4.46 |
| 2.0 | 87.50 | 84.85 | 96.67 | 96.67 | 90.52 | 90.32 | 91.09(4.80) | 5.26 |
| 5.0 | 97.40 | 100.00 | 100.00 | 87.36 | 95.00 | 92.40 | 95.36(4.90) | 5.14 |
| 25.0 | 98.71 | 98.78 | 101.79 | 102.56 | 96.84 | 96.06 | 99.12(2.60) | 2.62 |
| 100.0 | 99.38 | 99.54 | 100.00 | 99.66 | 99.86 | 100.14 | 99.76(0.29) | 0.29 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 95.95(4.78) | 4.98 |

* ความเข้มข้นของฟีนิลปิวทาโซน

ตารางที่ 107 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาฟีนิลบิวทาไมนในพลาสมา เมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟต ร่วมกับเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (physical recovery;n=6)

| ก. พื้นที่พิกษา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.5 | 96.38 | 98.48 | 94.51 | 97.59 | 93.90 | 104.40 | 97.54(3.79) | 3.88 |
| 2.0 | 100.19 | 97.74 | 96.05 | 89.52 | 99.38 | 104.40 | 97.88(4.97) | 5.07 |
| 5.0 | 97.73 | 100.12 | 104.37 | 97.02 | 98.98 | 99.62 | 99.64(2.59) | 2.60 |
| 25.0 | 91.03 | 93.91 | 95.50 | 99.06 | 99.89 | 99.76 | 96.52(3.64) | 3.77 |
| 100.0 | 100.71 | 94.36 | 99.29 | 100.30 | 98.99 | 99.27 | 98.82(2.28) | 2.31 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 98.08(3.50) | 3.57 |
| ข. ความสูงพิกษา(มม.) | | | | | | | | |
| 0.5 | 100.00 | 90.91 | 96.77 | 96.77 | 103.33 | 100.00 | 97.96(4.24) | 4.32 |
| 2.0 | 100.00 | 96.43 | 93.10 | 96.55 | 100.00 | 96.30 | 97.06(2.62) | 2.69 |
| 5.0 | 98.57 | 98.61 | 94.28 | 95.65 | 95.89 | 97.33 | 96.72(1.74) | 1.80 |
| 25.0 | 89.06 | 94.47 | 93.77 | 95.99 | 95.71 | 98.26 | 94.54(3.10) | 3.28 |
| 100.0 | 99.65 | 99.69 | 99.25 | 100.69 | 99.86 | 99.79 | 99.82(0.48) | 0.48 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 97.22(3.09) | 3.18 |

* ความเข้มข้นของฟีนิลบิวทาไมน

ตารางที่ 108 สรุปการวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของยาฟีโลบิวทาโซน

| | | CH ₃ CN | CH ₃ OH |
|---------------------------|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Appearance | | pass | pass |
| Chromatogram | | pass | pass |
| %Physical Recovery (n=30) | | fail | fail |
| -peak area | \bar{X} (SD) | 106.62(7.24) | 105.65(7.80) |
| | %CV | 6.79 | 7.38 |
| -peak height | \bar{X} (SD) | 102.88(2.45) | 103.52(6.42) |
| | %CV | 2.38 | 6.20 |
| | | Zn ²⁺ +CH ₃ CN | Zn ²⁺ +CH ₃ OH |
| Appearance | | pass | pass |
| Chromatogram | | pass | pass |
| %Physical Recovery (n=30) | | pass | pass |
| -peak area | \bar{X} (SD) | 96.91(3.65) | 98.08(3.50) |
| | %CV | 3.77 | 3.57 |
| -peak height | \bar{X} (SD) | 95.95(4.78) | 97.22(3.09) |
| | %CV | 4.78 | 3.18 |

3.11.ข การ validate วิธีวิเคราะห์ที่

วิธีวิเคราะห์ยาฟีนิลบิวทาโซนในพลาสมา ที่ผ่าน การประเมินผลการแยกพลาสมาโปรตีน เป็นการใช้อิงค์ซิลเพตร่วมกับ แอซีโตนไนโตรส และอิงค์ซิลเพตร่วมกับเมทานอล ในการแยกพลาสมาโปรตีน

1) การศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสาร

แสดงในเทอมของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยา

ดังรายละเอียดในข้อ 3.11 ก.3)

2) ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ฟิควา

กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา

ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ฟิควาฟีนิลบิวทาโซนกับ

ความเข้มข้นของยาในพลาสมา เมื่อใช้อิงค์ซิลเพตร่วมกับแอซีโตนไนโตรส เป็น สารแยกพลาสมาโปรตีน ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.1-100.0 มคก./มล. พลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 47 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = - 879.5315 + 24.4427 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่ฟิควาฟีนิลบิวทาโซน และ X เป็นความเข้มข้นของยาฟีนิลบิวทาโซน ในพลาสมา (นาโนกรัม/มล. พลาสมา) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) = 0.99998

ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ฟิควาฟีนิลบิวทาโซน กับ

ความเข้มข้นของยาในพลาสมา เมื่อใช้อิงค์ซิลเพตร่วมกับเมทานอลเป็นสารแยก พลาสมาโปรตีน ที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.1-100.0 มคก./มล.พลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 48 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = 590.3081 + 24.6865 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่ฟิควาฟิโนลพิวทาโซน และ X เป็นความเข้มข้นของยาฟิโนลพิวทาโซน
 นพลาสมา (นาโนกรัม/มล. พลาสมา) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2)
 $= 0.99979$

3) ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของ
 วิธีวิเคราะห์ พิจารณาจากโครมาโทแกรมดังรูปที่ 45 และ 46 แสดงให้เห็นว่า
 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาฟิโนลพิวทาโซนในพลาสมา โดยใช้ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับ
 แอซีไทรโนไตรล์ และซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
 มีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังรายละเอียดในข้อ 3.11 ก) 2) ก) และ ข)
 (ขั้นที่ 2)

4) การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์

จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยา
 ฟิโนลพิวทาโซนในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 คือ 0.1 มคก./มล.
 พลาสมา (S/N ratio = 3.79 ± 0.22 ; %CV = 5.84%) และ 0.1
 มคก./มล. (S/N ratio เฉลี่ย = 3.72 ± 0.13 ; %CV = 3.43%) สำหรับการ
 การใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอซีไทรโนไตรล์ และการใช้สารละลาย
 ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 109

5) ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียว
 กันและระหว่างวัน โดยการใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอซีไทรโนไตรล์ เป็น
 สารแยกพลาสมาโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 110 และ 111 ตามลำดับ จะ
 เห็นว่า ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่
 ทากการศึกษา คือ 1.0-100.0 มคก./มล. พลาสมา มีค่า %CV ของความสูง
 ฟิควาอยู่ในช่วง 0.32-3.76% และ %CV ของพื้นที่ฟิควาอยู่ในช่วง 0.10-9.38%

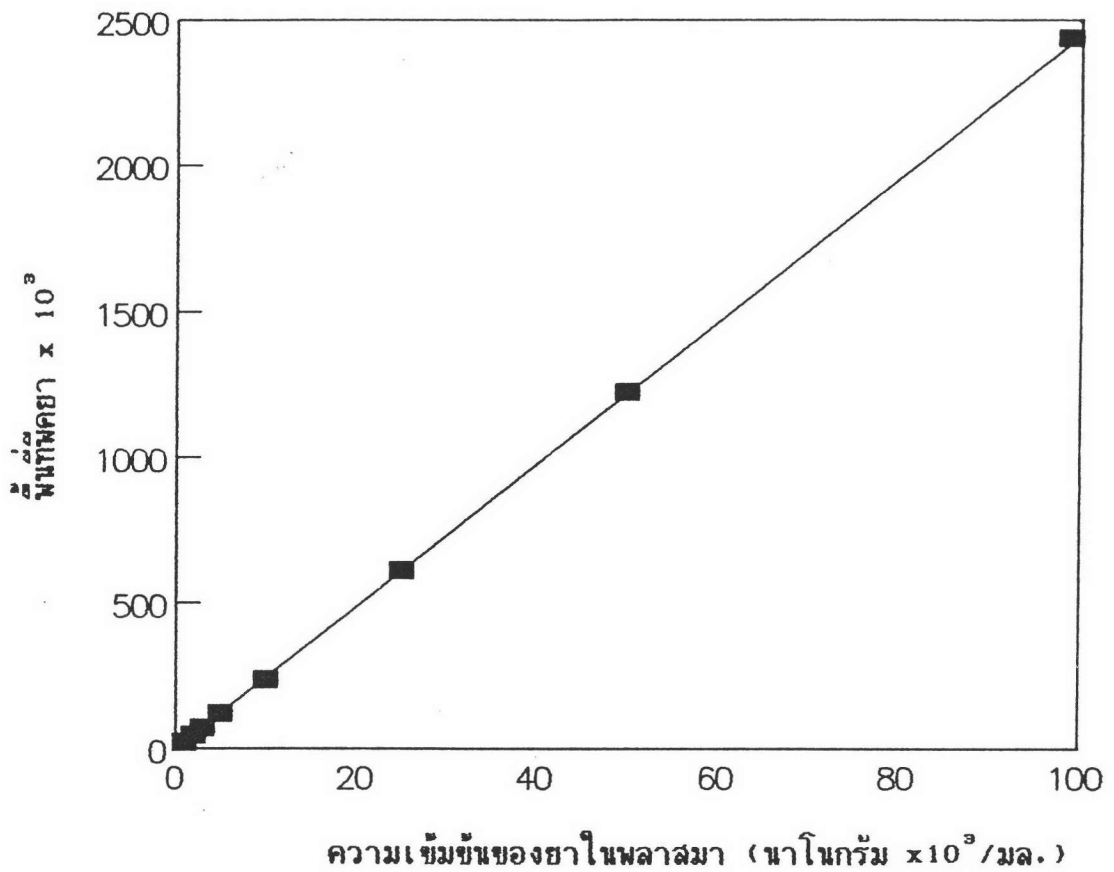
สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 1.11-5.08% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 0.54-9.31% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยาฟิโนลปิวทาโซนในพลาสมา โดยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟต ร่วมกับ แอซีโตนไนโตรสีนี แม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

สำหรับการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล ผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน ของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.1-100.0 มคก./มล. ดังแสดงในตารางที่ 112 และ 113 มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 0.39-9.22% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 0.47-9.57% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 0.28-9.81% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 1.60-9.83% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยาฟิโนลปิวทาโซนในพลาสมา นี้ แม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

6) ปริมาณต่ำสุดของตัวยาในตัวอย่างพลาสมาที่

สามารถวิเคราะห์ได้

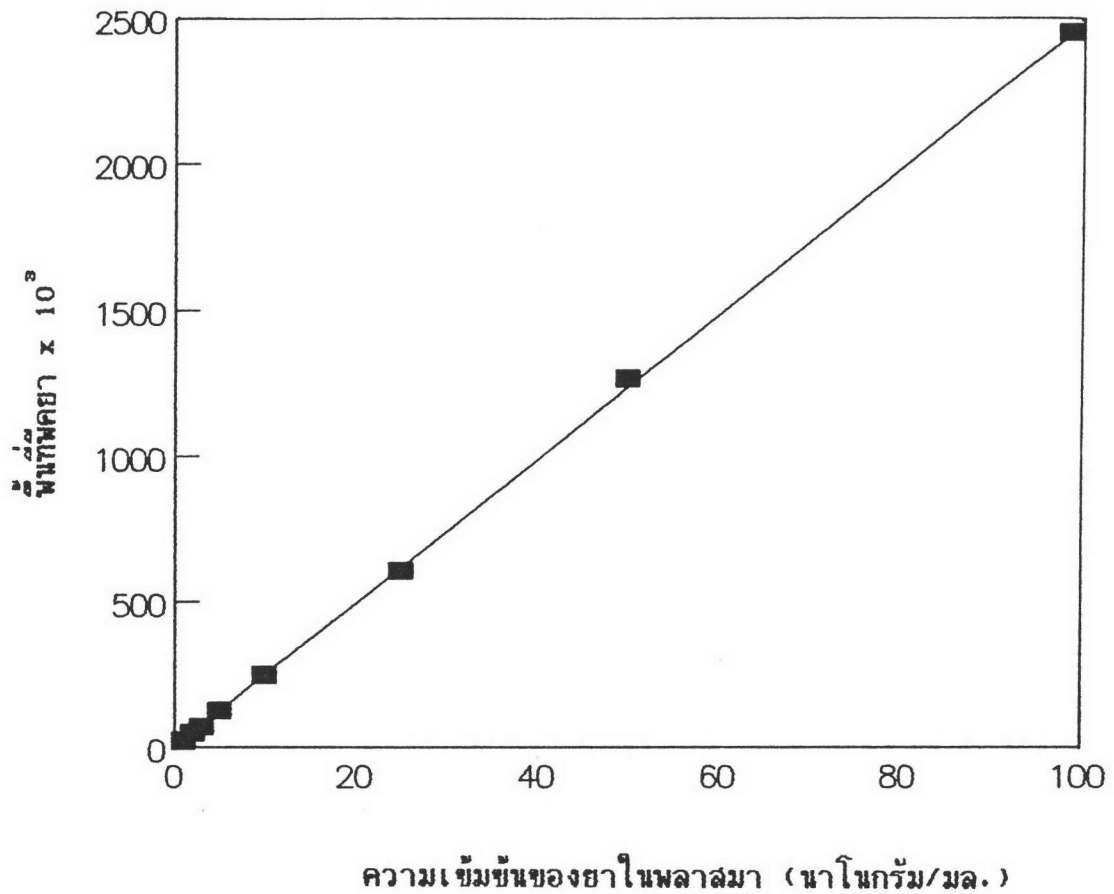
จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.1-100.0 มคก./มล. พลาสมา สำหรับความเข้มข้น 0.1 มคก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่วิเคราะห์นั้น ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 9.38 และ 9.31% เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีค และให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 3.76 และ 5.08% เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของพีคยา สำหรับการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอซีโตนไนโตรสีนี ดังนั้นจึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยาฟิโนลปิวทาโซน 0.1 มคก./มล.



รูปที่ 47 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผิวยานฟีนอลบิวทาโซน กับความเข้มข้นของยาฟีนอลบิวทาโซน ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟต ร่วมกับแอสิตไนไตรล์

สมการเส้นตรง คือ $Y = 24.4427X - 879.5315$

$r^2 = 0.99998$



รูปที่ 48 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผิวดูดที่ฟลูออโรสโคปกับความเข้มข้นของยาฟลูออโรสโคปในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล

สมการเส้นตรง คือ $Y = 24.6865X + 590.3081$

$r^2 = 0.99979$

ตารางที่ 109 ค่าอัตราส่วน S/N ของการวิเคราะห์ฟีนิลบิวทาโซนในพลาสมา
เมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสซีไดไนโตรส* และ
สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน

| S/N ratio | |
|--|--|
| Zn ⁺⁺ กับ แอสซีไดไนโตรส* | Zn ⁺⁺ กับ เมทานอล** |
| 3.57 | 3.61 |
| 4.11 | 3.50 |
| 3.54 | 3.77 |
| 3.68 | 3.88 |
| 3.89 | 3.81 |
| 4.07 | 3.54 |
| 3.50 | 3.73 |
| 4.00 | 3.73 |
| 3.78 | 3.85 |
| 3.78 | 3.73 |
| $\bar{X}(SD)=3.79(0.22)$ %CV = 5.84 | $\bar{X}(SD)=3.72(0.13)$ %CV = 3.43 |

* ความเข้มข้นของฟีนิลบิวทาโซน = 0.1 มคก./มล.

**ความเข้มข้นของฟีนิลบิวทาโซน = 0.1 มคก./มล.

ตารางที่ 110 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลบิวทาไซนในพลาสติก
ภายในวันเดียวกันเมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเอซีทีไนโตรส
เป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน (within-run precision;n=3)

| ก. พื้นที่ฟิเคยา | | | | | |
|----------------------------|---------|---------|---------|--------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.1 | 2525 | 2380 | 2095 | 2333.3(218.8) | 9.38 |
| 0.5 | 10773 | 12497 | 10892 | 11387.3(962.8) | 8.46 |
| 2.0 | 44684 | 45813 | 46202 | 45566.3(788.5) | 1.73 |
| 5.0 | 118774 | 118731 | 118543 | 118682.7(122.9) | 0.10 |
| 25.0 | 632162 | 633734 | 619852 | 628582.7(7601.7) | 1.21 |
| 100.0 | 2664252 | 2764346 | 2655114 | 2694570.7(60599.7) | 2.25 |
| ข. ความสูงฟิเคยา (มม.) | | | | | |
| 0.1** | 3.0 | 3.0 | 3.2 | 3.07(0.12) | 3.76 |
| 0.5** | 12.8 | 13.0 | 13.2 | 13.00(0.20) | 1.54 |
| 2.0 | 2.9 | 2.9 | 3.0 | 2.93(0.06) | 1.97 |
| 5.0 | 8.1 | 7.9 | 7.7 | 7.90(0.20) | 2.53 |
| 25.0 | 41.0 | 41.5 | 41.0 | 41.17(0.29) | 0.70 |
| 100.0 | 146.0 | 146.9 | 146.2 | 146.37(0.47) | 0.32 |

* ความเข้มข้นของฟีนอลบิวทาไซน

** ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^3

ตารางที่ 111 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาฟีโลบิวทาโซนในพลาสมา ระหว่างวัน
เมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอซีไคโนไตรด์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | | | |
|----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.1 | 2763 | 2365 | 2929 | 2932 | 2525 | 2702.8(251.1) | 9.31 |
| 0.5 | 11194 | 11400 | 11438 | 11768 | 10773 | 11314.6(366.0) | 3.24 |
| 2.0 | 48573 | 49616 | 43134 | 44168 | 44684 | 46035.0(2871.9) | 6.24 |
| 5.0 | 118852 | 120484 | 120023 | 121521 | 118774 | 119930.8(1156.0) | 0.96 |
| 25.0 | 617503 | 618413 | 621170 | 613180 | 632162 | 617566.5(3314.0) | 0.54 |
| 100.0 | 2288037 | 2288346 | 2426006 | 2441114 | 2664252 | 2421551.0(154009.7) | 6.36 |
| ข. ความสูงพีคยา(มม.) | | | | | | | |
| 0.1** | 2.7 | 2.9 | 2.9 | 3.1 | 3.0 | 2.92(0.15) | 5.08 |
| 0.5** | 12.1 | 12.7 | 12.4 | 12.5 | 12.8 | 12.50(0.27) | 2.19 |
| 2.0 | 2.9 | 3.1 | 2.8 | 2.8 | 2.9 | 2.90(0.12) | 4.22 |
| 5.0 | 7.5 | 7.8 | 7.6 | 7.1 | 8.1 | 7.62(0.37) | 4.86 |
| 25.0 | 38.6 | 39.1 | 38.0 | 39.4 | 41.0 | 39.22(1.13) | 2.88 |
| 100.0 | 143.0 | 143.7 | 146.6 | 146.1 | 146.0 | 145.08(1.61) | 1.11 |

* ความเข้มข้นของฟีโลบิวทาโซน

**ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^3

ตารางที่ 112 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาฟีนิลปิวกาโซนในพลาสมา
 ภายในวันเดียวกัน เมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล
 เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (within-run precision;n=3)

| ก. พื้นที่ผิวยา | | | | | |
|----------------------------|---------|---------|---------|--------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.1 | 1837 | 1778 | 2014 | 1876.3(122.8) | 6.54 |
| 0.5 | 12300 | 11755 | 14081 | 12712.0(1216.5) | 9.57 |
| 2.0 | 49259 | 49052 | 47007 | 48439.3(1244.7) | 2.57 |
| 5.0 | 122304 | 121170 | 121595 | 121689.7(572.9) | 0.47 |
| 25.0 | 630331 | 646548 | 627959 | 634946.0(10117.4) | 1.59 |
| 100.0 | 2617631 | 2572963 | 2568495 | 2586363.0(27170.9) | 1.05 |
| ข. ความสูงพีคยา (มม.) | | | | | |
| 0.1** | 2.5 | 2.6 | 2.7 | 2.60(0.10) | 3.85 |
| 0.5** | 13.3 | 13.4 | 15.6 | 14.10(1.30) | 9.22 |
| 2.0 | 3.5 | 3.6 | 3.7 | 3.60(0.10) | 2.78 |
| 5.0 | 8.1 | 8.2 | 8.0 | 8.10(0.10) | 1.23 |
| 25.0 | 42.0 | 42.6 | 40.7 | 41.77(0.97) | 2.32 |
| 100.0 | 146.4 | 146.5 | 146.5 | 146.47(0.06) | 0.39 |

* ความเข้มข้นของฟีนิลปิวกาโซน

** ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^3

ตารางที่ 113 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาฟิโนลิวทาโซนในพลาสมา ระหว่างวัน
เมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่พีคยา | | | | | | | |
|----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|--------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.1 | 2541 | 2334 | 2270 | 2590 | 2014 | 2349.8(231.1) | 9.83 |
| 0.5 | 11112 | 11955 | 11473 | 11763 | 14081 | 12076.8(1164.6) | 9.64 |
| 2.0 | 46334 | 46316 | 45486 | 42798 | 47007 | 45588.2(1650.3) | 3.62 |
| 5.0 | 117694 | 113424 | 120816 | 115787 | 121595 | 117863.2(3416.5) | 2.90 |
| 25.0 | 615488 | 615239 | 639392 | 624122 | 627959 | 624440.0(10010.5) | 1.60 |
| 100.0 | 2409187 | 2405733 | 2440539 | 2406255 | 2568495 | 2446041.8(69984.2) | 2.86 |
| ข. ความสูงพีคยา(มม.) | | | | | | | |
| 0.1** | 3.1 | 2.7 | 3.1 | 3.0 | 2.7 | 2.92(0.20) | 7.02 |
| 0.5** | 12.7 | 12.3 | 13.0 | 13.0 | 15.6 | 13.32(1.31) | 9.81 |
| 2.0 | 3.1 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.7 | 3.16(0.30) | 9.65 |
| 5.0 | 7.5 | 7.2 | 7.9 | 7.3 | 8.0 | 7.58(0.36) | 4.70 |
| 25.0 | 38.4 | 37.5 | 40.2 | 38.8 | 40.7 | 39.12(1.31) | 3.36 |
| 100.0 | 146.0 | 146.7 | 146.8 | 145.9 | 146.5 | 146.38(0.41) | 0.28 |

* ความเข้มข้นของฟิโนลิวทาโซน

**ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^3

พลาสติก เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย

สำหรับการแยกพลาสติกโปรตีนด้วยสารละลาย

ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล ผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน ของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาคือ 0.1-100.0 มก./มล. พลาสติก สำหรับความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์นั้น ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 6.54 และ 9.83% เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พิก และให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 3.85 และ 7.02% เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพิก ดังนั้นจึงยอมรับได้ว่าที่ระดับยาพินิลพิวทาไซน 0.1 มก./มล. พลาสติก เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย

7) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมิน (จากขั้นตอนที่ 4) มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกที่รับมาจำนวน 9 ตัวอย่าง คือ ที่ความเข้มข้น 2.0, 25.0 และ 100.0 มก./มล. (ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% Analytical recovery) ดังแสดงในตารางที่ 114 และ 115 พบว่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่แยกพลาสติกโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสีโตไนโตรล์ และสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ก็ให้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ = $98.07 \pm 1.29\%$ และ $97.95 \pm 2.27\%$ ตามลำดับ ซึ่งเป็นเครื่องยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณพินิลพิวทาไซนได้ถูกต้องแม่นยำจริง ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา

ตารางที่ 114 เปรอ์เซนต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยาฟีนิลปิวทาโซนในพลาสติก
เมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอซีโตนไทรล์เป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสติก (นาโนกรัม/มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัม/มล.) | เปอร์เซนต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|---|---|--|
| 2000 | 1996.5 | 99.82 |
| 2000 | 1949.6 | 97.48 |
| 2000 | 1965.6 | 98.28 |
| 25000 | 24321.4 | 97.28 |
| 25000 | 24020.8 | 96.08 |
| 25000 | 24162.8 | 96.65 |
| 100000 | 99223.7 | 99.22 |
| 100000 | 98841.1 | 98.84 |
| 100000 | 98962.6 | 98.96 |
| | | $\bar{X}(SD)=98.07(1.26)$ %CV = 1.29 |

ตารางที่ 115 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยาฟีนิลบิวทาโซนในพลาสมา
เมื่อใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสมา (นาโนกรัม/มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัม/มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|--|---|---|
| 2000 | 1990.9 | 99.54 |
| 2000 | 1920.4 | 96.02 |
| 2000 | 1966.7 | 98.33 |
| 25000 | 23821.3 | 95.28 |
| 25000 | 23959.8 | 95.84 |
| 25000 | 24014.8 | 96.06 |
| 100000 | 100675.9 | 100.68 |
| 100000 | 101099.9 | 101.10 |
| 100000 | 98678.5 | 98.68 |
| | | $\bar{X}(SD)=97.95(2.22)$ %CV = 2.27 |

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลบิวทาโซนในพลาสมา โดยหลักการแยก พลาสมาโปรตีน จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 116

เนื่องจากผลการศึกษาการวิเคราะห์ยาฟีนิลบิวทาโซนในพลาสมาในแง่ การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีน และ validate วิธีวิเคราะห์นั้น บปรากฏว่าผ่านการประเมินทั้งการใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสซีโตนไตรลล์ และสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ดังนั้น เพื่อเป็นการทดสอบความแตกต่างในเชิงสถิติของค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยา จากการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนทั้งสองตัวดังกล่าว ผลจากตารางที่ 106 และ 107 ทั้งเมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่ฟิคยาและความสูงฟิคยา จึงทำการเปรียบเทียบ ข้อมูลดังกล่าว โดยใช้ 2 tailed unpaired student t-test ที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95% (รายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก ง) ผลการทดสอบ บปรากฏว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาจากการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน ทั้งสองแบบ ทั้งเมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่ฟิคยาและความสูงฟิคยาไม่มีความแตกต่าง กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นั่นคือ ทั้งสารละลาย ซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสซีโตนไตรลล์ และสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับเมทานอล สามารถใช้เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลบิวทาโซน ได้ผลที่ไม่ต่างกัน

ตารางที่ 116 สรุปการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาฟีนิลบิวทาโซนโดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน

| | conc. ($\mu\text{g/ml}$) | $\text{Zn}^{2+}+\text{CH}_3\text{CN}$ | $\text{Zn}^{2+}+\text{CH}_3\text{OH}$ |
|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <u>%Phy.Reco.</u> (n=30) | 0.5-100.0 | | |
| -peak area \bar{X} (SD) | | 96.91(3.65) | 98.08(3.50) |
| %CV | | 3.77 | 3.57 |
| -peak height \bar{X} (SD) | | 95.95(4.78) | 97.22(3.09) |
| %CV | | 4.98 | 3.18 |
| <u>Linearity</u> | 0.1-100.0 | | |
| Eq. Y= | | -879.5315+24.4427X | 590.3081+24.6865X |
| r^2 | | 0.99998 | 0.99979 |
| <u>Specificity</u> | | | |
| <u>LLD</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.1 | 0.1 |
| <u>Precision</u> %CV | 0.1-100.0 | | |
| -within-run (n=3) | | | |
| peak area | | 0.10-9.38 | 0.47-9.57 |
| peak height | | 0.70-3.76 | 0.38-9.22 |
| -between-run (n=5) | | | |
| peak area | | 0.54-9.31 | 1.60-9.83 |
| peak height | | 1.11-5.08 | 0.28-9.81 |
| <u>LLQ</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.1 | 0.1 |
| <u>%Anal.Reco.</u> (n=9) | | | |
| \bar{X} (SD) | | 98.07(1.26) | 97.95(2.22) |
| %CV | | 1.29 | 2.27 |

3.12 ผลการศึกษาการวิเคราะห์ยาโปรออกซิแคมในพลาสติก

3.12.ก การวิเคราะห์ผลการแยกพลาสติกโปรตีน

1) ลักษณะตัวอย่างพลาสติกหลังเติมสารแยกพลาสติกโปรตีนลงในตัวอย่างพลาสติก

ก) เมื่อใช้แอสิตไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสติกโปรตีนจับกันแน่น เป็นก้อนขนาดใหญ่สีเหลืองอมส้มเกาะติดที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณน้อย ไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่า

- สารละลายสีที่แยกออกมาเป็นสีเหลือง มีความใสสะอาด มีปริมาณมาก มี pH ประมาณ 7

ข) เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน

- ลักษณะตะกอนพลาสติกโปรตีน เป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อน จับกันแน่นที่ก้นหลอดทดลอง ตะกอนมีปริมาณมาก ผิวหน้าตะกอนฟุ้งกระจายเล็กน้อย เมื่อเขย่าอย่างแรง

- สารละลายสีที่แยกออกมา เป็นสีเหลืองอ่อน มีความใสสะอาด มีปริมาณประมาณ 2.5 เท่า ของปริมาณตะกอน มี pH ประมาณ 7

2) ลักษณะโครมาโทแกรม

ก) เมื่อใช้แอสิตไนโตรสเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน

พีคของยาบนโครมาโทแกรมไม่เป็นพีคเดี่ยว

ดังแสดงในรูปที่ 49 ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะของโอบายเฟสที่ไม่เหมาะสม ทำให้ค่าความแรงของโอบายเฟสน้อยกว่าตัวทาลละลายในตัวอย่างพลาสติก ซึ่งในที่นี้คือแอสิตไนโตรส เป็นผลให้ได้พีคของยาบนโครมาโทแกรมในลักษณะเช่นนี้ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ จึงไม่ผ่านเกณฑ์การประเมิน

ข) เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสติก
โพรตีน

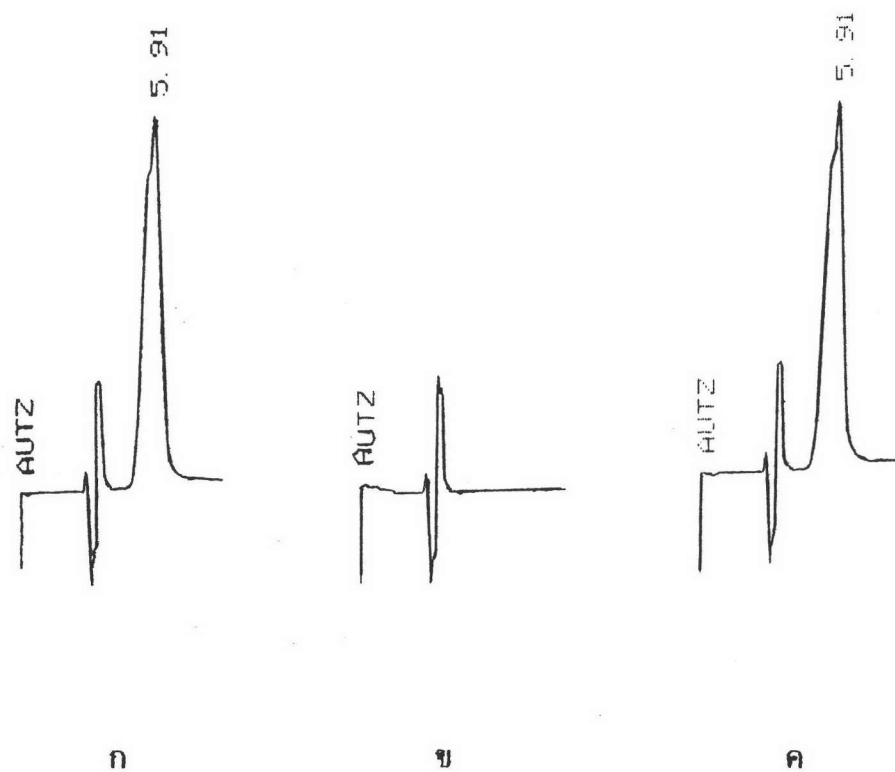
จากโครมาโทแกรมของแปลงค์พลาสติกและ
ตัวอย่างพลาสติก จะเห็นว่าพีคของยาบนโครมาโทแกรม ปรากฏเป็นพีคเดี่ยว
และไม่ถูกรบกวนจากพีคของ endogenous ซึ่งมีขนาดใหญ่เนื่องจากพีคของ
endogenous ถูกชะออกมาได้หมดก่อนพีคยา ดังแสดงในรูปที่ 50 พิจารณา
จากพีคของยาไพรอกซิแคม เมื่ออยู่ในพลาสติกและเมื่ออยู่สารละลายมาตรฐาน
ของสารแยกพลาสติกโพรตีนชนิดเดียวกัน จะเห็นว่ามีลักษณะเหมือนกันและมีค่า
เวลาที่รีเทนในคอลัมน์ที่เท่ากัน (ไพรอกซิแคม = 5.63 นาที ทั้งเมื่ออยู่ใน
พลาสติกและสารละลายมาตรฐาน) แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของ
วิธีวิเคราะห์

ดังนั้น การทดลองขั้นต่อไปในการวิเคราะห์
ยาไพรอกซิแคมในพลาสติก จะใช้เมทานอล เพียงอย่างเดียวเป็นสารแยกพลาสติก
โพรตีน

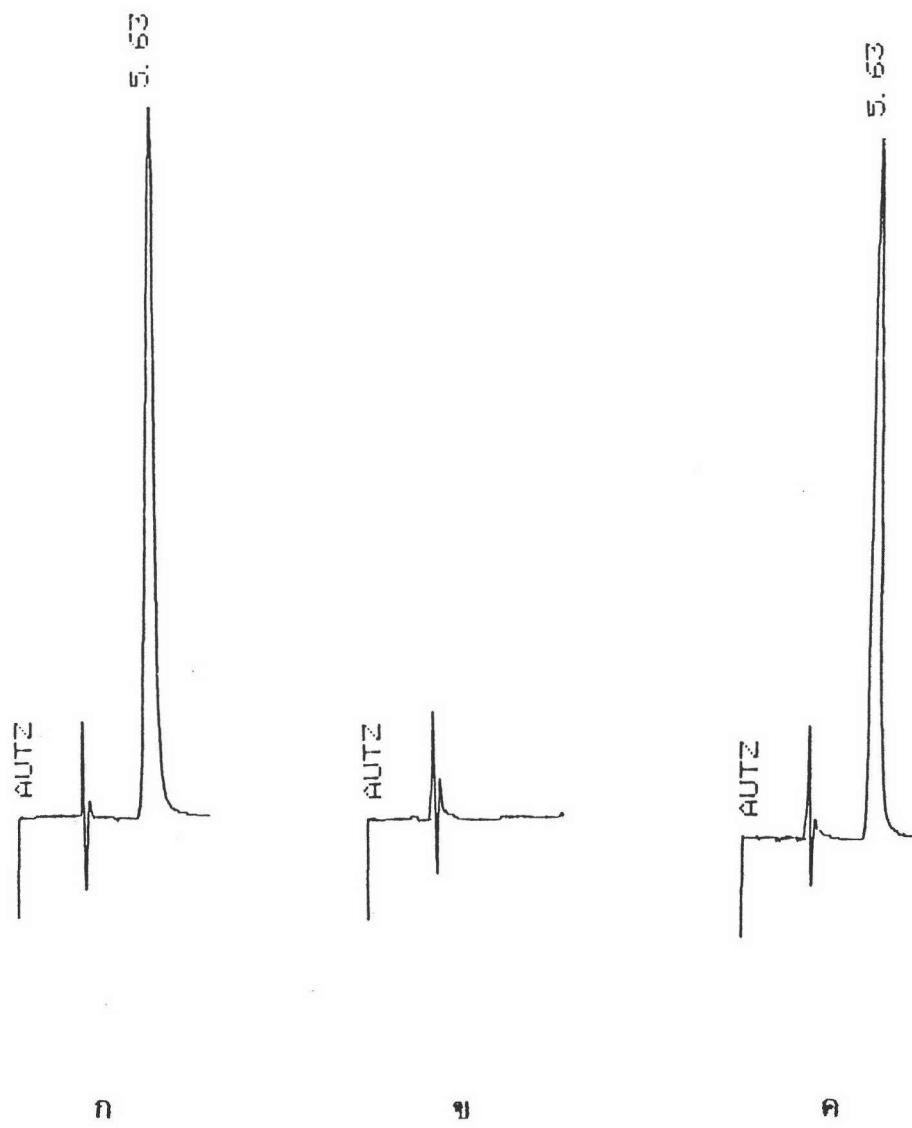
3) เบอร์เซนต์การคืนกลับของยา

ผลการทดลองหาเบอร์เซนต์การคืนกลับของยาใน
พลาสติก เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโพรตีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีค่า
 $= 96.71 \pm 4.42\%$ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคยาและมีค่า $= 97.40 \pm 4.70\%$
เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงของพีคยา โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก
ดังแสดงในตารางที่ 117

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการแยก
พลาสติกโพรตีนของตัวอย่างพลาสติกของยาไพรอกซิแคม จึงทำการรวบรวมดัง
แสดงในตารางที่ 118



- รูปที่ 49** โคโรมาโทแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณยาไพรอกซิแคมในพลาสมา
เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเอซีโตนไตรีล โดยเทคนิค HPLC
- ก. เป็นโคโรมาโทแกรมของยาไพรอกซิแคมในสารละลายมาตรฐาน
 - ข. เป็นโคโรมาโทแกรมของแบลนด์พลาสมา
 - ค. เป็นโคโรมาโทแกรมของยาไพรอกซิแคมในพลาสมา
- ความเข้มข้น 48.0 มคก./มล. (ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^5)



รูปที่ 50 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาไพรอกซิแคมในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล โดยเทคนิค HPLC

- ก. เป็นโครมาโทแกรมของยาไพรอกซิแคมในสารละลายมาตรฐาน
- ข. เป็นโครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสมา
- ค. เป็นโครมาโทแกรมของยาไพรอกซิแคมในพลาสมา
ความเข้มข้น 30.0 มคก./มล. (ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^5)

ตารางที่ 117 เปรอ์เซนต์การคืนกลับของยาไพรอกซิแคมในพลาสมาเมื่อใช้เมทานอล
เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน (physical recovery;n=6)

| ก. พื้นที่ผิวยา | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.5 | 90.36 | 101.16 | 99.54 | 92.16 | 99.63 | 91.96 | 95.80(4.80) | 5.00 |
| 2.0 | 89.76 | 90.92 | 91.58 | 91.04 | 92.63 | 94.01 | 91.66(1.48) | 1.62 |
| 5.0 | 99.21 | 103.40 | 94.55 | 99.37 | 100.75 | 100.82 | 99.68(2.93) | 2.94 |
| 15.0 | 93.69 | 101.76 | 92.15 | 95.03 | 100.83 | 96.81 | 96.71(3.88) | 4.01 |
| 30.0 | 97.39 | 99.35 | 100.27 | 100.20 | 103.13 | 97.98 | 99.72(2.04) | 2.04 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 96.71(4.28) | 4.42 |
| ข. ความสูงพิคยา(มม.) | | | | | | | | |
| 0.5 | 92.59 | 103.57 | 100.00 | 82.14 | 96.67 | 93.33 | 94.72(7.41) | 7.83 |
| 2.0 | 97.00 | 97.03 | 97.98 | 96.00 | 100.00 | 103.96 | 98.66(2.93) | 2.97 |
| 5.0 | 90.26 | 100.00 | 97.05 | 101.05 | 96.35 | 94.67 | 96.56(3.89) | 4.02 |
| 15.0 | 95.24 | 100.40 | 92.54 | 95.00 | 103.72 | 100.00 | 97.82(4.21) | 4.31 |
| 30.0 | 100.21 | 97.21 | 100.11 | 100.21 | 103.41 | 94.22 | 99.23(3.14) | 3.17 |
| ค่าเฉลี่ยรวม | | | | | | | 97.40(4.58) | 4.70 |

* ความเข้มข้นของไพรอกซิแคม

ตารางที่ 118 สรุปการวิเคราะห์ผลการแยกพลาสมาโปรตีนของยาไพรออกซิแคม

| | CH ₃ CN | CH ₃ OH |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|
| Appearance | pass | pass |
| Chromatogram | fail | pass |
| %Physical Recovery (n=30) | - | pass |
| -peak area \bar{X} (SD) | | 96.71(4.28) |
| %CV | | 4.42 |
| -peak height \bar{X} (SD) | | 97.40(4.58) |
| %CV | | 4.70 |

3.12.ข การ validate วิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ยาไพรอกซิแคมในพลาสมา ที่ผ่านการประเมินผลการแยกพลาสมาโปรตีน เป็นการใช้เมทานอล เพียงอย่างเดียวในการแยกพลาสมาโปรตีน

1) การศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดสาร

แสดงในเทอมของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยา

ดังรายละเอียดในข้อ 3.12.ก.3)

2) ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่พีคยากับความเข้มข้นของยาในพลาสมา

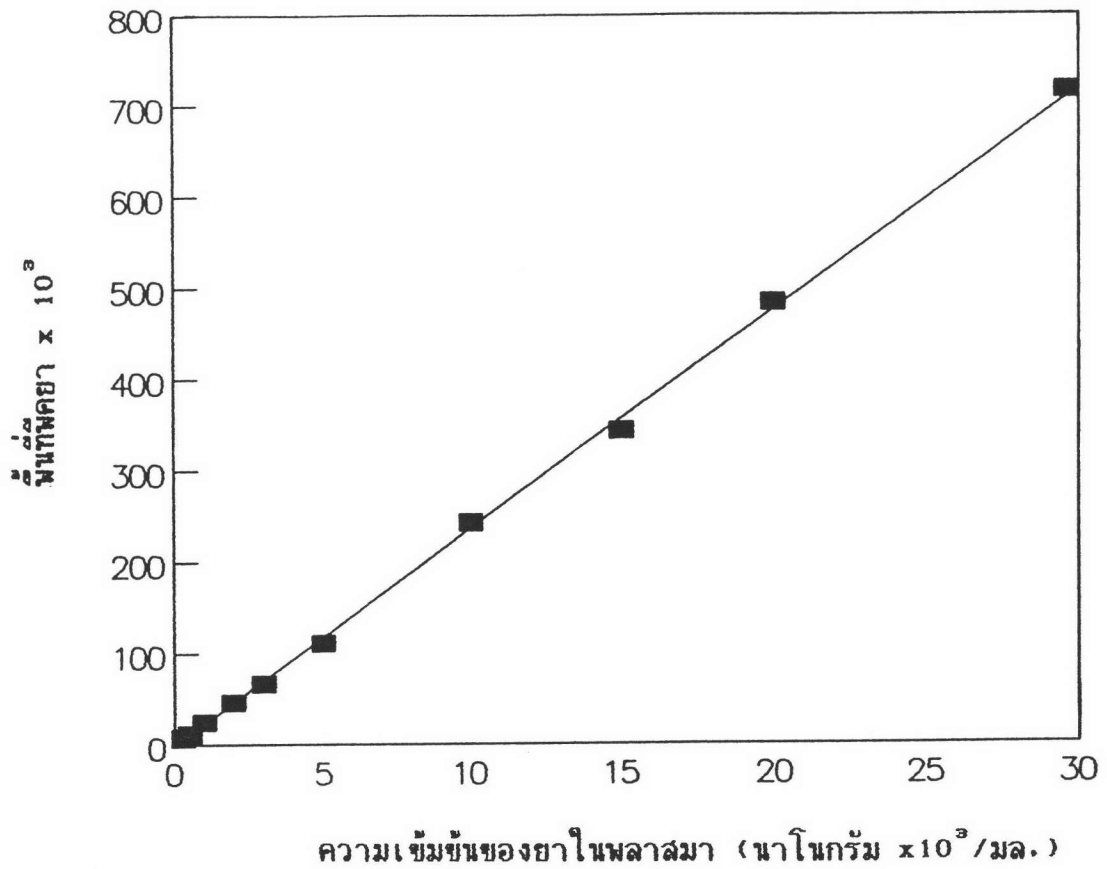
ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่พีคยาไพรอกซิแคม กับความเข้มข้นของยาในพลาสมา เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาคือ 0.1-30.0 มคก./มล.พลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 51 โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากการใช้ Linear regression คือ

$$Y = -1200.7746 + 23.8597 X$$

เมื่อ Y เป็นพื้นที่พีคยาไพรอกซิแคม และ X เป็นความเข้มข้นของยาไพรอกซิแคมในพลาสมา (นาโนกรัม/มล. พลาสมา) และสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (r^2) = 0.99938

3) ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ พิจารณาจากโครมาโทแกรมดังรูปที่ 50 แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาไพรอกซิแคมในพลาสมาโดยใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน มีความจำเพาะเจาะจงสูง ดังรายละเอียดในข้อ 3.12 ก. 2) ก) และ ข)



- รูปที่ 51 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ผิวยานีโรอกซีแคม กับความเข้มข้นของยาไฟรอกซีแคม ในพลาสมา เมื่อแยกพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล
- สมการเส้นตรง คือ $Y = 23.8597X - 1200.7746$
- $r^2 = 0.99938$

4) การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์

จากการทดลองความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของยา

ไพรอกซิแคมในพลาสมาที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 คือ 0.1 มคก./มล. พลาสมา (S/N ratio = 4.30 ± 0.30 ; %CV = 6.96%) ดังแสดงในตารางที่ 119

5) ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน

และระหว่างวัน ดังแสดงในตารางที่ 120 และ 121 ตามลำดับ จะเห็นว่าผลการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาคือ 0.1-30.0 มคก./มล. พลาสมา มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 2.78-8.24% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 2.84-9.54% สำหรับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน มีค่า %CV ของความสูงพีคอยู่ในช่วง 4.40-7.46% และ %CV ของพื้นที่พีคอยู่ในช่วง 3.82-8.33% สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ซึ่งให้ค่า %CV ไม่เกิน 10% แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ยาไพรอกซิแคมในพลาสมาโดยการแยกพลาสมาโปรตีนเมทานอลนี้ แม้ว่าจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หรือในวันใด ๆ ก็ได้ผลไม่ต่างกัน

6) ปริมาณต่ำสุดของตัวอย่างพลาสมาที่

สามารถวิเคราะห์ได้

จากผลการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.1-30.0 มคก./มล. พลาสมา สำหรับความเข้มข้น 0.1 มคก./มล. ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์นั้น ให้ค่า %CV ทั้งภายในวันเดียวกัน และระหว่างวัน = 9.54 และ 8.33% ตามลำดับ เมื่อคำนวณโดยใช้พื้นที่พีคและให้ค่า %CV ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน = 8.24 และ 4.61% ตามลำดับ เมื่อคำนวณโดยใช้ความสูงพีค ดังนั้นจึงยอมรับได้ที่ระดับยาไพรอกซิแคม 0.1 มคก./มล. เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่จะวิเคราะห์หาปริมาณได้ด้วย

ตารางที่ 119 ค่าอัตราส่วน S/N ของการวิเคราะห์ไพโรอกซิแคมในพลาสติก
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน

| S/N ratio |
|--------------------------|
| 4.60 |
| 4.55 |
| 4.20 |
| 4.00 |
| 4.00 |
| 4.20 |
| 4.00 |
| 4.15 |
| 4.50 |
| 4.85 |
| $\bar{X}(SD)=4.30(0.30)$ |
| %CV = 6.96 |

ความเข้มข้นของไพโรอกซิแคม = 0.1 มคก./มล.

ตารางที่ 120 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาไพโรคซิแคมในพลาสมา
ภายในวันเดียวกัน เมื่อใช้เมทานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีน
(within-run precision;n=3)

| ก. พื้นที่พิกัด | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|-------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.1 | 2478 | 2813 | 2341 | 2544.0(242.8) | 9.54 |
| 0.5 | 13066 | 13717 | 11711 | 12831.3(1023.4) | 7.98 |
| 2.0 | 48855 | 51209 | 48139 | 49401.0(1606.2) | 3.25 |
| 5.0 | 118487 | 126656 | 122491 | 122544.7(4084.8) | 3.33 |
| 15.0 | 362971 | 388150 | 372737 | 374619.3(12694.6) | 3.39 |
| 30.0 | 756956 | 758950 | 795871 | 770592.3(21914.7) | 2.84 |
| ข. ความสูงพิกัด (มม.) | | | | | |
| 0.1** | 13.0 | 15.3 | 13.9 | 14.07(1.16) | 8.24 |
| 0.5 | 2.1 | 2.2 | 2.0 | 2.10(0.10) | 4.76 |
| 2.0 | 7.2 | 7.5 | 7.1 | 7.27(0.21) | 2.86 |
| 5.0 | 17.5 | 19.0 | 18.1 | 18.20(0.75) | 4.15 |
| 15.0 | 52.9 | 55.9 | 54.8 | 54.53(1.52) | 2.78 |
| 30.0 | 108.0 | 108.5 | 114.5 | 110.33(3.62) | 3.28 |

* ความเข้มข้นของไพโรคซิแคม

** ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^0

ตารางที่ 121 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ยาไพрокซิแคมในพลาสติก ระหว่างวัน
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกมาโปรตีน (between-run precision;n=5)

| ก. พื้นที่ผิวยา | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------------|------|
| ความเข้มข้น* (มคก./มล.) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | \bar{X} (SD) | %CV |
| 0.1 | 2084 | 2598 | 2537 | 2395 | 2478 | 2418.4(201.4) | 8.33 |
| 0.5 | 11269 | 11643 | 12314 | 12003 | 13066 | 12059.0(685.4) | 5.68 |
| 2.0 | 47281 | 50273 | 46624 | 45009 | 48855 | 47608.4(2030.2) | 4.26 |
| 5.0 | 111619 | 108877 | 118929 | 115881 | 118487 | 114758.6(4387.6) | 3.82 |
| 15.0 | 334636 | 328416 | 352743 | 352459 | 362971 | 346245.0(14258.7) | 4.12 |
| 30.0 | 692766 | 725733 | 642230 | 766935 | 756956 | 716924.0(50852.9) | 7.09 |
| ข. ความสูงพีคยา (มม.) | | | | | | | |
| 0.1** | 14.1 | 14.0 | 14.0 | 12.8 | 13.0 | 13.58(0.63) | 4.61 |
| 0.5 | 1.8 | 2.0 | 2.0 | 1.9 | 2.1 | 1.96(0.11) | 5.82 |
| 2.0 | 7.5 | 7.3 | 7.0 | 6.8 | 7.2 | 7.16(0.27) | 3.77 |
| 5.0 | 16.3 | 16.0 | 17.5 | 17.5 | 17.5 | 16.96(0.75) | 4.40 |
| 15.0 | 47.2 | 49.5 | 51.4 | 52.9 | 52.9 | 50.78(2.44) | 4.81 |
| 30.0 | 97.1 | 107.7 | 94.3 | 112.3 | 108.0 | 103.88(7.75) | 7.46 |

* ความเข้มข้นของไพрокซิแคม

**ใช้แอทเทนนูเอชัน 2^0

7) ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมิน (จากขั้นตอนที่ 4) มาวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกที่รับมาจำนวน 9 ตัวอย่าง คือ ที่ความเข้มข้น 0.5, 5.0 และ 30.0 มก./มล. (ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (% Analytical recovery) ดังแสดงในตารางที่ 122 พบว่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ก็ให้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยาในพลาสติก ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ = $97.18 \pm 2.53\%$ ซึ่งเป็นเครื่องยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณยาพรอกซิแคมได้ถูกต้องแม่นยำจริง ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา

เพื่อให้สะดวกและรวดเร็วในการพิจารณาผลการ validate วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาพรอกซิแคมในพลาสติก โดยหลักการแยกพลาสติกมาโปรตีน จึงทำการรวบรวมและสรุปดังแสดงในตารางที่ 123

ตารางที่ 122 เปรอ์เซ็นต์การคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ยาไพโรคซิแคมในพลาสติก
เมื่อใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกโปรตีน
(analytical recovery;n=9)

| ความเข้มข้นที่แท้จริง ของตัวอย่างพลาสติก (นาโนกรัม/มล.) | ความเข้มข้นของยา ที่วิเคราะห์ได้ (นาโนกรัม/มล.) | เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ของวิธีวิเคราะห์ |
|---|---|---|
| 500 | 472.1 | 94.42 |
| 500 | 484.4 | 96.88 |
| 500 | 494.2 | 98.84 |
| 5000 | 4830.8 | 96.62 |
| 5000 | 5033.9 | 100.68 |
| 5000 | 4670.5 | 93.41 |
| 30000 | 29970.9 | 99.90 |
| 30000 | 28683.0 | 95.61 |
| 30000 | 29489.1 | 98.30 |
| | | $\bar{X}(SD)=97.18(2.46)$ %CV = 2.53 |

ตารางที่ 123 สรุปการvalidateวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยาไพโรอกซิแคม
โดยหลักการแยกผลสมาโปรตีน

| | conc. ($\mu\text{g/ml}$) | CH_3OH |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| <u>%Phy.Reco.</u> (n=30) | 0.5-30.0 | |
| -peak area \bar{X} (SD) | | 96.71(4.28) |
| %CV | | 4.42 |
| -peak height \bar{X} (SD) | | 97.40(4.58) |
| %CV | | 4.70 |
| <u>Linearity</u> | 0.1-30.0 | |
| Eq. Y= | | -1200.7746+23.8597X |
| r^2 | | 0.99938 |
| <u>Specificity</u> | | |
| <u>LLD</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.1 |
| <u>Precision</u> %CV | 0.1-30.0 | |
| -within-run (n=3) | | |
| peak area | | 2.84-9.54 |
| peak height | | 2.78-8.24 |
| -between-run (n=5) | | |
| peak area | | 3.82-8.33 |
| peak height | | 3.77-7.46 |
| <u>LLQ</u> ($\mu\text{g/ml}$) | | 0.1 |
| <u>%Anal.Reco.</u> (n=9) | | |
| \bar{X} (SD) | | 97.18(2.46) |
| %CV | | 2.53 |

4. การประมวลผลการศึกษาแต่ละตัวยา

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาโดยการแยกพลาสมาโปรตีนออกจากตัวอย่างพลาสมาของยาทุกตัวด้วยสารตกตะกอนโปรตีนที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ตัวคือ แอซีโตนไนโตรส และเมทานอล ปรากฏว่าตัวยา 10 ตัวจากทั้งหมด 12 ตัว ได้แก่ คลอกซาซิลิน โซเดียม ไดโคลฟีแนค ไดคลอกซาซิลิน โซเดียม ฟลูโรซีไมด์ โกลเบนคลาไมด์ ไอบูโพรเฟน คีโตโพรเฟน กรดมีเฟนามิค นาโพรเซน และไพรอกซิแคม ผ่านเกณฑ์การประเมินผลการแยกพลาสมาโปรตีน (ตามขั้นตอนที่ 4) โดยการใช้เมทานอลเป็นสารตกตะกอนโปรตีนและให้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาทั้ง 10 ตัว มากกว่า 80% โดยในตัวยา 10 ตัว ดังกล่าวนี้นี้มีเพียง 6 ตัวเท่านั้น ได้แก่ ไดโคลฟีแนค โกลเบนคลาไมด์ ไอบูโพรเฟน คีโตโพรเฟน กรดมีเฟนามิค และนาโพรเซน ที่สามารถใช้แอซีโตนไนโตรสในการแยกพลาสมาโปรตีนได้ เนื่องจากอีก 4 ตัวยาที่เหลือ ได้แก่ คลอกซาซิลิน โซเดียม ไดคลอกซาซิลิน โซเดียม ฟลูโรซีไมด์ และไพรอกซิแคม ให้โครมาโทแกรมของยากับแอซีโตนไนโตรส ที่ไม่เป็นพีคเดี่ยว แต่เกิดการแตกเป็นหลายพีค (ดังแสดงในรูปที่ 5, 12, 15 และ 50) ตามลำดับ จึงไม่ผ่านเกณฑ์การประเมิน

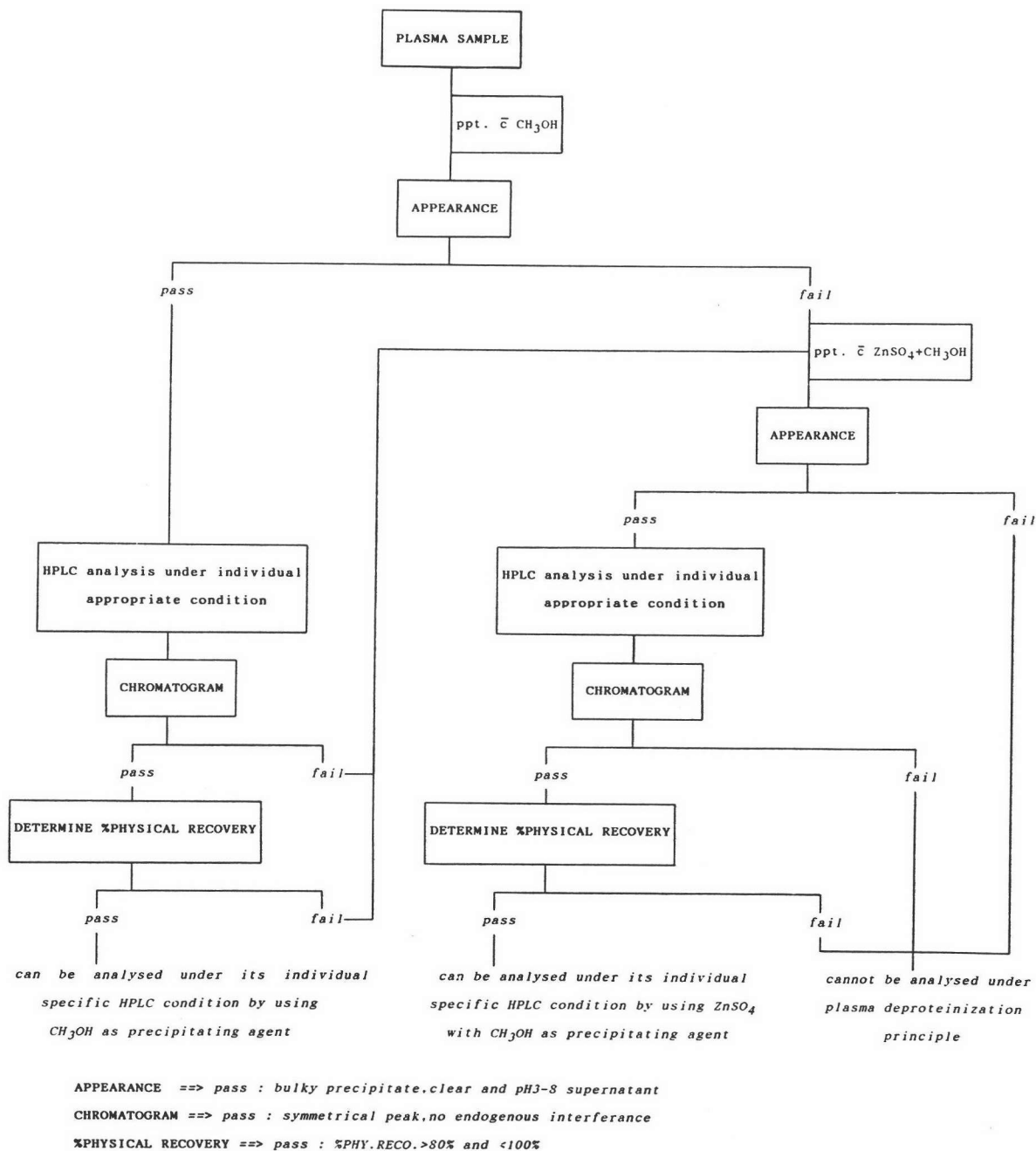
ส่วนอีก 2 ตัวยาที่เหลือใน 12 ตัวยา ได้แก่ อินโดเมทาซิน และฟิโนลิวทาเซน ไม่ผ่านเกณฑ์การประเมิน โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยาจากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ทั้งสองดังกล่าว เกิน 100% แสดงถึงการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนที่ไม่สมบูรณ์ มีการรบกวนของ endogenous substance ดังนั้น จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณอินโดเมทาซินและฟิโนลิวทาเซน ในตัวอย่างพลาสมาต่อ โดยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟต ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่มีประจุลบ ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ตัวดังกล่าวคือ แอซีโตนไนโตรส และเมทานอล ปรากฏว่า การใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับ

แอซีโตไนโตรสหรือเมทานอล ให้เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยามากกว่า 80% แต่ไม่เกิน 100% และผ่านเกณฑ์การประเมินผลการแยกพลาสติกไมโครทิน

ในกรณีอินโดเมทาซินและฟิโนลพิวทาโซน แม้จะมีรายงานการวิเคราะห์โดยการแยกพลาสติกไมโครทินด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ถ้าพิจารณาเฉพาะลักษณะของตัวอย่างพลาสติกหลังเติมสารแยกพลาสติกไมโครทินในตัวอย่างพลาสติกและโครมาโทแกรม โดยไม่มีการเปรียบเทียบด้วยการวางหลักเกณฑ์ที่แน่นอน อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการเลือกวิธีวิเคราะห์และอาจส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์และสรุปข้อมูลได้ จากแนวทางนี้จะทำให้สังเกตเห็นถึงความสำคัญของการศึกษา โดยใช้หลักเกณฑ์ที่แน่นอนในการพิจารณา วิธีวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติก โดยหลักการแยกพลาสติกไมโครทิน

5. การสร้างกระบวนการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกของยากุ่มกรดที่มีค่าการจับกับพลาสติกไมโครทินสูง โดยหลักการแยกพลาสติกไมโครทิน ด้วยเทคนิคทาง HPLC

จากการประมวลผลการศึกษา ยากุ่มกรดที่มีค่าการจับกับพลาสติกไมโครทินสูง 12 ตัวที่เลือกเป็นตัวแทนในการศึกษา สามารถสร้างกระบวนการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกของยากุ่มกรดที่มีค่าการจับกับพลาสติกไมโครทินสูง โดยหลักการแยกพลาสติกไมโครทินด้วยเทคนิคทาง HPLC ได้ดังรูปที่ 52 โดยตัวอย่างพลาสติกของยากุ่มกรดที่มีค่าการจับกับพลาสติกไมโครทินสูง จะทำการวิเคราะห์โดยการแยกพลาสติกไมโครทินด้วยเมทานอลเป็นอันดับแรกถึงแม้ว่ายาบ่างตัวจะวิเคราะห์ได้โดยใช้แอซีโตไนโตรสและเมทานอล แต่เนื่องจากการใช้เมทานอลจะทำให้ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่ำกว่า และเมทานอลก็เป็นสารตกตะกอนพลาสติกไมโครทินที่ใช้ได้ทั่วไป จึงเลือกเมทานอลเป็นสารแยกพลาสติกไมโครทินอันดับแรกมากกว่าแอซีโตไนโตรส ผลการทดลองจะประเมินตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด



รูปที่ 52 กระบวนการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของยากุ่มกรดที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูง โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน

ไว้โดยอาศัยทางทฤษฎีในแง่ต่าง ๆ ดังที่กล่าวไว้ในการวิเคราะห์ผลการแยก
 พลาสมาโปรตีน (ขั้นตอนที่ 4) ดังนี้

ก. ลักษณะของตัวอย่างพลาสมาหลังจากเติมสารแยกพลาสมาโปรตีน
 ในตัวอย่างพลาสมา (appearance)

Appearance ที่ดี ลักษณะของตัวอย่างพลาสมาหลังการเติมสาร
 แยกพลาสมาโปรตีนลงในตัวอย่างพลาสมา ตะกอนพลาสมาโปรตีนควรอยู่ในรูป
 ของตะกอนหนักที่สามารถแยกออกจากส่วนอื่น ๆ ของตัวอย่างพลาสมาได้อย่าง
 ชัดเจน ลักษณะของสารละลายใสที่แยกออกมาของตัวอย่างพลาสมาหลังการเติม
 สารแยกพลาสมาโปรตีนมีความใสสะอาด มี pH อยู่ในช่วง 3-8 ซึ่งสามารถนำ
 ไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยฉีดเข้า HPLC ได้โดยตรง โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนอื่น ๆ
 ในการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมอีก

ข. ลักษณะโครมาโทแกรม

โครมาโทแกรมที่ได้ไม่ควรมีการรบกวนของ endogenous
 substances ที่มีอยู่ในพลาสมา พีคของยาที่ได้ความสมมาตรและแคบ สามารถ
 แยกออกจากพีคอื่น ๆ ได้ และมีเวลาที่รีเทนในคอลัมน์ที่เหมาะสมที่ไม่ทำให้ใช้เวลา
 ในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างมากเกินไป

ค. เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของยา (% physical recovery)

การวิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาทั่วไป ควรให้เปอร์เซ็นต์
 การคืนกลับของยาไม่ต่ำกว่า 80% และไม่เกิน 100% โดยมีสัมประสิทธิ์
 ความแปรปรวนไม่เกิน 10%

ตัวอย่างพลาสมาของยาตัวใดที่ไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินในหัวข้อใดหัวข้อหนึ่งข้างต้นจะทำการวิเคราะห์โดยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสีโตไนโตรส หรือเมทานอล ผลการทดลองจะประเมินตามเกณฑ์มาตรฐานข้างต้น ในทำนองเดียวกันตัวอย่างพลาสมาของยาที่ไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินในหัวข้อใดหัวข้อหนึ่งข้างต้น จะแสดงว่าตัวอย่างพลาสมาของยานั้นไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธีการแยกพลาสมาโปรตีน โดยการยี่ดัวทาละลายอินทรีย์ และ/หรือตัวตกตะกอนพลาสมาโปรตีนที่มีประจุบวกร่วมกับตัวทาละลายอินทรีย์ดังกล่าว

6. การคาดการณ์เกี่ยวกับ binding site ของยา

จากการศึกษาและรวบรวมข้อมูลทางเอกสารเกี่ยวกับ binding sites บนอัลบูมินซึ่งเป็นพลาสมาโปรตีนที่มีมากที่สุดคในพลาสมา พบว่ามี binding site อย่างน้อย 2 binding sites ที่มี common binding กับยา (ดังที่ได้กล่าวรายละเอียดไว้ในบทหน้า) โดย binding site I หรือ warfarin binding site จะเป็น binding site ของยาที่มีลักษณะเป็นกรดอะโรมาติก และเป็นโมเลกุลเฮทเทอโรไซคลิกที่มีขนาดใหญ่ (bulk) มีการใช้ประจุลบร่วมกันระหว่างอินอล 2 กลุ่มหรือกลุ่มคีโตและกลุ่มอินอล ประจุลบมีการเคลื่อนที่มากและมักอยู่ที่ศูนย์กลางของโมเลกุลในส่วนที่ไม่มีขั้วที่มีขนาดใหญ่กว่า ในขณะที่ binding site II หรือ Tryptophan binding site จะเป็น binding site ของยาที่มีลักษณะเป็นกรดอะโรมาติก คาบอกซิลิกที่แตกตัวได้ดีที่ pH ของร่างกาย ในโมเลกุลสามารถมีได้หลายโครงแบบ แต่ละโครงแบบก็มีบทบาทในการจับกับ binding site นี้ด้วย ประจุลบบนโมเลกุลมักอยู่ที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งของโมเลกุลที่อยู่ห่างจากส่วนที่ไม่มีขั้ว

จากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของตัวยากุ่มกรดที่มีการจับกับพลาสมาโปรตีนสูงที่ได้คัดเลือกเป็นตัวแบบในการศึกษาทั้ง 12 ตัว โดยหลักการแยกพลาสมา เมื่อเชื่อมโยงไปยังกลุ่มยาที่มีการศึกษาในเรื่อง binding site ก็พอที่จะประมวลผลไปสู่การคาดการณ์ลักษณะ binding site ของตัวยาได้โดยไกลเบนคลาไมด์ กรดมีเพนนามิค ไอบูโพรเฟน และนาโพรเซน ซึ่งเป็นกลุ่มยาที่มีข้อมูลการศึกษาว่าจับกับ binding site II นั้นสามารถวิเคราะห์โดยใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนได้ ส่วนคลอกซาซิลิน โซเดียมโดโคลฟีแนค โดคลอกซาซิลิน โซเดียม ฟูโรซีไมด์ คีโตโพรเฟน และไพรอกซิแคม ไม่มีรายงานการศึกษาในเรื่อง binding site แต่สามารถวิเคราะห์โดยใช้เมทานอลเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนได้เช่นกัน และเป็นยาที่มีลักษณะใกล้เคียงกับลักษณะยาที่มักจับกับ binding site II จึงคาดการณ์ว่าน่าจะจับกับ binding site II ส่วนอินโดเมทาซิน และฟิโนลพิวทาเซนนั้นเป็นกลุ่มที่มีรายงานการศึกษาว่ามีการจับกับ binding site I ไม่สามารถวิเคราะห์โดยใช้เมทานอลเพียงอย่างเดียวเป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนได้ จำเป็นต้องใช้สารละลายซิงค์ซัลเฟตร่วมกับแอสีโตไนโตรล์ หรือเมทานอลในการแยกพลาสมาโปรตีน

จากการประมวลผลการศึกษาวิธีวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาโดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนของยาที่คัดเลือกมาศึกษา ประกอบกับข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับ binding site ของยาน่าจะทำให้การคาดการณ์เกี่ยวกับ binding site ของยาจากกระบวนการวิเคราะห์โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนได้ หรืออีกนัยหนึ่งอาจใช้เลือกวิธีการแยกพลาสมาโปรตีนที่ต้องการในการวิเคราะห์ จากข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับ binding site ที่มีได้ ถ้าสามารถคาดการณ์ binding site จากวิธีวิเคราะห์จะเป็นการสะดวก ประหยัด และรวดเร็วยิ่งขึ้นในการศึกษาข้อมูลของยาใหม่ ๆ ต่อไป เนื่องจากวิธีการศึกษาเกี่ยวกับ binding site จะมีความยุ่งยากและซับซ้อนมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

พลาสมาโดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน และหากมีการศึกษาเกี่ยวกับ binding site ที่กว้างขวางมากขึ้นในอนาคต ก็อาจทำให้สามารถเลือกวิธีวิเคราะห์ยา จากข้อมูล binding site ของยานั้นๆ ได้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก เป็นการเชื่อมโยงผลการศึกษาวิธีวิเคราะห์กับข้อมูลเกี่ยวกับ binding site ที่เคยมีรายงานเท่านั้น จึงควรจะมีการศึกษาเกี่ยวกับ binding site เพิ่มเติม ในโอกาสต่อไป เพื่อให้สามารถคาดการณ์เกี่ยวกับวิธีวิเคราะห์ และ binding site ได้ชัดเจนและกว้างขวางขึ้น