หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. **สารเคมี** สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ตลอดการศึกษาประกอบด้วย

1.1 ตัวยาที่ใช้ศึกษา

1.1.1 อะมิทริปทัยลินฮัยโดรคลอไรด์ (Amitriptyline Hydrochloride)

1.1.2 อะมิโลไรด์ (Amirolide)

1.1.3 ไซเมทิดีน (Cimetidine)

1.1.4 ไดอะซีแพม (Diazepam)

1.1.5 ไดเฟนฮัยดรามีนฮัยโดรคลอไรด์ (Diphenhydramine hydrochloride)

1.1.6 ฟาโมทิดีน (Famotidine)

1.1.7 อิมมิพรามีนฮัยโดรคลอไรด์ (Immipramine hydrochloride)

1.1.8 คีโตโคนาโซล (Ketoconazole)

1.1.9 พัยราซินาไมด์ (Pyracinamide)

1.1.10 รานิทิดีนฮัยโดรคลอไรด์ (Ranitidine hydrochloride)

1.1.11 ไทรเมโธพริม (Trimetroprim)

1.2 สารเคมีอื่น ๆ

1.2.1 เมธานอล เกรด HPLC (Methanol , HPLC grade ; J. T . Backer Cheical, New Jersey , USA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.2 เมธานอล เกรด AR (Methanol , AR grade ; E. Merck , Damstadt , Germany)

1.2.3 อะซีโตไนไตรล์ เกรด HPLC (Acetonitrile , HPLC grade ; J. T . Baker Chemical , New Jersey , USA)

1.2.4 อะซีโตไนไตรล์ เกรด AR (Acetonitrile , AR grade ; J. T . Backer Chemical , New Jersey , USA)

1.2.5 โปแตสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต เกรด AR (Potassium dihydrogen phostphate , KH_2PO_4 , AR grade ; E merck , Damstadt , Germany)

1.2.6 กรดฟอสฟอริค เกรด AR (orthophosphoric acid , H_3PO_4 , AR grade ; E . Merck , Damstadt , Germany)

1.2.7 ซิงค์ ซัลเฟต เกรด AR (Zinc sulphate ,AR grade ; E . merck , Damstadt , Germany)

1.2.8 ไทรเอทิลเอมีน เกรด AR

1.2.9 กรดไทรคลอโรอะซีติค เกรด AR

1.2.10 กรดเปอร์คลอริค เกรด AR

1.2.11 โซเดียมฮัยดรอกไซด์ เกรด AR (Sodium hydroxide , AR grade , E . Merck , Damstadt , Germany)

2. พลาสมาของคน ตลอดการศึกษาใช้พลาสมาของคน (pooled plasma) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสภากาชาดไทย โดยเก็บรักษาไว้ในช่องแช่แข็งของตู้เย็น (อุณหภูมิประมาณ - 4 องศาเซลเซียส) จนกว่าจะนำมาใช้

3. เครื่องมือ เครื่องมือในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย

3.1 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี (High performance liquid Chromatography , HPLC)

3.1.1 HPLC ; Millipore Waters Chromatography Division , Millford , Massachusetts , USA ซึ่งประกอบด้วย

3.1.1.1 Model 680 automated gradient controller

3.1.1.2 Model 600A solvent dilivary system

3.1.1.3 Model 510 solvent dilivary system

3.1.1.4 Waters 740 data module

3.1.1.5 Waters 484 tunable absorbace detector

3.1.2 HPLC ; Milton Roy LDC Division , Florida , USA ซึ่งประกอบด้วย

3.1.2.1 Model CM 4000 multiple solvent delivary system

3.1.2.2 Model SM 4000 programable wavelength detector

3.1.2.3 Model CI - 4000 computing integrator

3.2 อินเจคเตอร์ (Injector ; Rheodyne 7100 injector port , Rheodyne , California , USA)

3.3 ไดโอดแอเรย์สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (Dioed - array Spectrophotometer , Milton Roy)

3.4 เครื่องหมุนเหวี่ยง

3.5 เครื่องชั่งสำหรับการวิเคราะห์ (Presica 300 A , PAG Oerikon AG , Switzerland)

3.6 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (Consort pH meter , P307 , Germany)

3.7 เครื่องผสมวอร์เทกซ์ (Vortex Mixer ; Vortex - Genie , Scientific Industries Inc . , New York , USA)

3.8 คอลัมน์สำหรับโครมาโตกราฟี (Chromatography column)

3.8.1 μ Bondapak C18 column (Waters ® Waters) เป็นคอลัมน์เหล็กกล้าไร้สนิม ขนาดความยาว 30 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3.9 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C 18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 10 ไมโครเมตร

3.8.2 Bonclone 10 C18 Column (Phenomenex ®, California , USA) เป็นคอลัมน์เหล็กกล้าไร้สนิม ขนาดความยาว 30 เซนติเมตร เส้นผ่าน ศูนย์กลางภายใน 3.9 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C 18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 10 ไมโครเมตร

3.8.3 Spherisorb CN Column (Phase Separation ® ,) เป็นคอลัมน์เหล็กกล้าไร้สนิม ขนาดความยาว 15 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค CN ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 5 ไมโครเมตร

3.8.4 Ultracarb ODS 20 column (Phenomenex ® , California ,USA) เป็นคอลัมน์เหล็กกล้าไร้สนิม ขนาดความยาว 15 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C 18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 5 ไมโครเมตร

3.8.5 Ultracarb ODS 20 column (Phenomenex ® , California , USA) เป็นคอลัมน์เหล็กกล้าไร้สนิม ขนาดความยาว 10 เซนติเมตร เส้น ผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร บรรจุด้วยอนุภาค C 18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 5 ไมโครเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการใช้กระสวนการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของยากลุ่มกรดที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูง โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน ซึ่งเป็นแบบแผนที่มีอยู่แล้วกับยาที่มีสมบัติเป็นด่าง เพื่อศึกษาถึงความเหมาะสมของกระสวน ฯ ดังกล่าวต่อยาที่มีสมบัติแตกต่างออกไป

ดังนั้นข้อกำหนดในการศึกษาจึงดำเนินไปในแนวทางของกระสวน ฯ เดิม กล่าวคือ

ก. ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการเติมสารละลายของยาที่ต้องการศึกษาลงในพลาสมาเปล่าของคน

ข. เทคนิคในการวิเคราะห์ปริมาณยาเน้นการใช้ Isocratic Reversed Phase HPLC ที่มีการตรวจวัดด้วยการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต เพราะเป็นเทคนิคที่สะดวก มีอุปกรณ์แพร่หลาย เหมาะสมกับสภาพความเป็นจริงในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

ค. ยาที่ศึกษาในครั้งนี้คัดเลือกจากยาที่มีคุณสมบัติที่เป็นด่าง โดยให้มีระดับการจับกับพลาสมาโปรตีนแตกต่างกัน โดยยาเหล่านี้เป็นยาที่มีการผลิต หรือมีแนวโน้มในการผลิตเพิ่มขึ้นภายในประเทศ มีความสำคัญด้านเภสัชกรรมคลินิกและการรักษา เพื่อประโยชน์ของการนำผลการศึกษาไปใช้ ทั้งนี้ในเบื้องต้นจะไม่พิจารณาว่ายาเหล่านี้มีรายงานการวิเคราะห์ปรากฏในวารสารหรือไม่

สำหรับยาต้นแบบที่คัดเลือกมาศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วยตัวยา 11 ตัวยาที่มีระดับการจับกับพลาสมาโปรตีนต่ำ กลาง และสูงดังแสดงรายชื่อ และระดับการจับกับพลาสมาโปรตีนในตารางที่ 1 (ดูภาคผนวก ก .)

ง. ระดับความเข้มข้นของยาในพลาสมาจะพิจารณาจากข้อมูลด้านเภสัชจลนศาสตร์ และรายงานการวิเคราะห์ที่ปรากฏในวารสาร โดยระดับความเข้มข้นของยาที่ตรวจพบในร่างกาย และระดับยาที่ให้ผลในการรักษา รวมถึงขนาดยาที่ใช้ปรากฏรายละเอียดในตารางที่ 2 (ดูภาคผนวก ข.)

จ. ลำดับขั้นในการเลือกสารตกตะกอนพลาสมาโปรตีนจะใช้แนวทางของกระสวน ฯ เดิมคือเริ่มด้วยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ คือเมธานอลเป็นลำดับ

แรก หากไม่ผ่านเกณฑ์ในการประเมินผลการแยกพลาสมาโปรตีนตามที่กำหนดไว้ในขั้นตอนที่ 3 ของขั้นตอนการศึกษา จะเลือกใช้อะซีโตไนไตรล์เป็นลำดับถัดมา และหากไม่ผ่านการประเมินผลการแยกพลาสมาโปรตีนอีกจะเลือกใช้สารอนินทรีย์ที่มีประจุบวก คือ ซิงค์ ซัลเฟตซึ่งมีกลไกการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยการเกิดเกลือที่ไม่ละลายน้ำกับโปรตีนเป็นสารตกตะกอนพลาสมาโปรตีนในลำดับต่อไป

หากการตกตะกอนตามกระบวนการข้างต้นไม่ได้ผลจะเลือกใช้การตกตะกอนพลาสมาโปรตีน ซึ่งเป็นสารละลายอนินทรีย์ที่มีประจุลบ คือ กรดไทรคลอโรอะซีติค และ / หรือกรดเปอร์คลอริค ซึ่งมีกลไกในการตกตะกอนโปรตีนด้วยการเกิดเกลือที่ไม่ละลายน้ำกับโปรตีนที่อยู่ในรูปประจุบวก เนื่องจากมีข้อแนะนำในการใช้กับยาที่มีสมบัติเป็นด่าง (Smith and Steward ,1981 ; Szepesi , 1990)

สำหรับยาที่ไม่สามารถใช้กระสวนการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของยากลุ่มกรดที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูงได้ แต่สามารถใช้สารตกตะกอนพลาสมาโปรตีนที่เป็นสารละลายอนินทรีย์ที่มีประจุลบหรือสารตกตะกอนพลาสมาโปรตีนที่เป็นกรดได้ ถือว่ายังสามารถใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีนในการวิเคราะห์ได้ แต่ต้องมีการปรับกระสวนการวิเคราะห์ให้เหมาะสม

ฉ. หากการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนดังกล่าวไม่ผ่านเกณฑ์การประเมินจะจัดยาตัวนั้นอยู่ในกลุ่มที่ไม่สามารถใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารตกตะกอนพลาสมาโปรตีนได้

เพื่อให้การศึกษาดำเนินไปตามข้อกำหนดดังกล่าวจึงได้มีการกำหนดขั้นตอนในการศึกษาไว้ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาสภาวะทางโครมาโตกราฟี (HPLC conditions) ที่เหมาะสม เนื่องจากตัวยาที่นำมาศึกษาในครั้งนี้เป็นตัวยาที่มีการผลิตออกจำหน่ายเป็นระยะเวลาหนึ่งแล้ว การศึกษาครั้งนี้จึงทำการทดลองสภาวะทางโครมาโตกราฟีที่เหมาะสมจากวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาในพลาสมาที่มีรายงานในวารสารหรือเอกสารอ้างอิงก่อน โดยพิจารณาควบคู่กับสมบัติทางเคมี และกายภาพของยานั้น ถ้าสภาวะที่นำมาทดลองไม่เหมาะสมจึงทำการแก้ไขดัดแปลง หรือพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมต่อไป

สำหรับการตรวจวัดสัญญาณในการวิเคราะห์นั้นถ้ายามีความเข้มข้นในพลาสมาต่ำมากจะตรวจวัดสัญญาณจากค่าความสูงพีค (หน่วยวัด : มิลลิเมตร) ทั้งนี้เนื่องจากการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดที่ใช้ มีความแปรปรวนของการตรวจวัดด้วยค่าพื้นที่พีคค่อนข้างสูง แต่ถ้ายาใดมีความเข้มข้นในพลาสมาสูงพอจะทำการตรวจวัดสัญญาณทั้งค่าความสูงและพื้นที่พีคซึ่งจะนำมาเลือกใช้อีกครั้ง โดยเลือกใช้ค่าที่มีความแปรปรวนน้อยกว่า

ขั้นตอนที่ 2 วิเคราะห์หาปริมาณยาในพลาสมาด้วยการแยกพลาสมาโปรตีนตามแนวกระสวนการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของยากลุ่มกรดที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูง โดยยาทุกตัวที่ทำการศึกษาจะดำเนินการวิเคราะห์ในลักษณะเดียวกันดังนี้ คือ ผสมพลาสมา 500 ไมโครลิตรกับสารละลายมาตรฐานของยา 10 ไมโครลิตรในหลอดทดลองฝาเกลียว วอร์เทก (vortex) นาน 10 วินาที เติมสารแยกพลาสมาโปรตีน* วอร์เทก (vortex) นาน 15 วินาที หมุนเหวี่ยงตัวอย่างพลาสมาที่เติมสารแยกพลาสมาโปรตีนแล้วด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แยกสารละลายเหนือตะกอนพลาสมาโปรตีนนำฉีดเข้า HPLC สำหรับสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เป็นสารละลายกรดจะปรับ pH ของสารละลายให้เป็นกลางก่อนฉีดเข้า HPLC สำหรับสารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ด้วยหลักการแยกพลาสมาโปรตีนจะใช้น้ำแทนพลาสมาในปริมาตร

500 ไมโครลิตรเท่ากัน

สารแยกพลาสมาโปรตีนที่เลือกใช้จะเลือกใช้ตามลำดับดังนี้

1. เมธานอล
2. อะซีโตไนไตรล์
3. สารละลายซิงค์ซัลเฟตความเข้มข้น 10 % ในน้ำร่วมกับเมธานอลหรืออะซีโตไนไตรล์
4. สารละลายกรดเปอร์คลอริค หรือสารละลายกรดไทรคลอโรอะซีติค

ขั้นตอนที่ 3 ประเมินผลการแยกพลาสมาโปรตีน ผลการแยกพลาสมาโปรตีนในขั้นตอนที่ 2 จากการวิเคราะห์ยาทุกตัวจะผ่านการประเมินในหัวข้อต่อไปนี้

ก. **ลักษณะของตัวอย่างพลาสมาโปรตีนหลังการแยกพลาสมาโปรตีน** เนื่องจากสารแยกพลาสมาโปรตีนที่ใช้มีสมบัติในการแยกพลาสมาโปรตีนในรูปตะกอนดังนั้นในการศึกษานี้จะสังเกตถึงลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีนที่แยกได้ และส่วนของสารละลายเหนือตะกอน

1. ลักษณะของตะกอนพลาสมาโปรตีน เป็นตะกอนพลาสมาโปรตีนที่หนัก สามารถแยกออกจากส่วนอื่นได้ง่ายด้วยการหมุนเหวี่ยง

2. ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน

2.1 ลักษณะทางกายภาพ ควรเป็นสารละลายใส ไม่มีตะกอนปรากฏอยู่ เพื่อความแน่ใจว่าเมื่อฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโตกราฟีแล้ว จะไม่ทำให้คอลัมน์ที่ใช้เกิดการอุดตัน

2.2 ระดับความเป็นกรด ด่าง ของสารละลายเหนือตะกอน ควรมี pH อยู่ในช่วง 3 - 8 หรือสามารถทำให้มี pH อยู่ในช่วง 3 - 8 ได้ง่าย เพื่อความแน่ใจว่าเมื่อฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโตกราฟีแล้ว จะไม่ทำให้เกิดความเสียหายแก่คอลัมน์ที่ใช้

ข. **ลักษณะของโครมาโตแกรม** ลักษณะปรากฏของโครมาโตแกรมที่ได้ไม่ควรมีการรบกวนของ endogeneous substances ที่มีอยู่ในพลาสมา พีคยาที่ได้มีรูปร่างดี มีความสมมาตร มีฐานพีคแคบ สามารถแยกออกจากพีคของสารอื่นที่ปรากฏได้ดี มีเวลาที่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ (retention time) เหมาะสม คือไม่นานเกินไปเพื่อลดเวลาในการวิเคราะห์

ค. **ร้อยละของการคืนกลับของยา (physical recovery)** ร้อยละของการคืนกลับของยาเมื่อตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยสารตกตะกอนพลาสมาโปรตีนที่เลือกแสดงถึงประสิทธิภาพในการวิเคราะห์โดยการแยกพลาสมาโปรตีน

ค่าร้อยละของการคืนกลับ คำนวณจากสมการ

$$\text{ร้อยละของการคืนกลับของยา} = \frac{\text{PA1 หรือ PH1}}{\text{PA2 หรือ PH2}} \times 100$$

เมื่อ PA1 หรือ PH1 เป็นค่าพื้นที่พีคยา หรือความสูงพีคยาในตัวอย่างพลาสมาที่ถูกตกตะกอนพลาสมาโปรตีนแล้วตามลำดับ

และ PA2 หรือ PH2 เป็นค่าพื้นที่พีคยา หรือความสูงพีคยาในสารละลายมาตรฐานตามลำดับ

สำหรับเกณฑ์ในการประเมินร้อยละของการคืนกลับของยานั้นควรมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 75 ถึง 100 (Silva ,1985 ; Buick ,A.R. , Doig, M.V. , Jeal , S.C. , Land G.S. และ McDowall ,R.D. ,1990) โดยมีสัมประสิทธิ์ความแปร ปรวนไม่เกิน ± ร้อยละ 10

ยาใดที่ผ่านการประเมินทุกหัวข้อดังกล่าวข้างต้นแล้วถือว่าสามารถใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยสารแยกพลาสมาโปรตีนที่เลือกใช้ในการวิเคราะห์ยานั้นได้ วิธีวิเคราะห์นั้นจะถูก validate ดังขั้นตอนที่ 4

ขั้นตอนที่ 4 การ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณยาในพลาสมาโดยการใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีน วิธีวิเคราะห์ยาที่ผ่านการประเมินผลตามขั้น

ตอนที่ 3 จะถูก validate เพื่อยืนยันความเหมาะสมในการที่จะนำวิธีวิเคราะห์นั้นไปใช้ต่อ ซึ่งหลักเกณฑ์ในการประเมินผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณยาในตัวอย่างชีวภาพนั้นมีรายละเอียดแตกต่างจากเกณฑ์การประเมินผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณยาในเภสัชภัณฑ์ โดยหลักเกณฑ์ในการประเมินผลการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณยาในตัวอย่างชีวภาพดังกล่าวนี้จะมีการประชุมตกลงกันอยู่ตลอดเพื่อให้เหมาะสมกับสภาพการวิเคราะห์

ในการศึกษาครั้งนี้จะยึดหลักเกณฑ์การประเมินผลการ validate จากข้อตกลงขององค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Shah และคณะ , 1992) โดยจะทำการ validate วิธีวิเคราะห์ปริมาณในหัวข้อต่อไปนี้

ก. **การศึกษาประสิทธิภาพการวิเคราะห์** ประสิทธิภาพการวิเคราะห์แสดงในรูปของค่าร้อยละของการคืนกลับโดยมีรายละเอียดเช่นเดียวกับข้อ ค. ในขั้นตอนที่ 3

ข. **การศึกษาความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่พีค หรือความสูงพีคกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา (Linearity)**

เป็นการทดลองเพื่อหาค่าช่วงความเข้มข้นของยาในพลาสมาที่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงพื้นที่พีค หรือความสูงพีค

วิธีการทดลอง วิเคราะห์หาปริมาณยาในตัวอย่างพลาสมาที่เติมสารละลายมาตรฐานของยาความเข้มข้นต่าง ๆ และวิเคราะห์ตามวิธีการที่ผ่านการประเมินจากขั้นตอนที่ 3 นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นทีพีคหรือความสูงพีคกับความเข้มข้นของยาในพลาสมา หากความสัมพันธ์นั้นแสดงออกในเชิงเส้นตรงจะใช้ regression analysis ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์นั้นต่อไป หากความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของยาในพลาสมากับพื้นที่พีค หรือความสูงพีคไม่เป็นไปในแนวเส้นตรงจะทำการศึกษาเพื่อปรับเปลี่ยนความสัมพันธ์ในลักษณะอื่นต่อไป

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค. **การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)** ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์จะพิจารณาจากเวลาที่ยาถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ในคอลัมน์เมื่อยาอยู่ในพลาสมาเทียบกับเมื่อยาอยู่ในสารละลายมาตรฐานเมื่อผ่านกระบวนการวิเคราะห์เช่นเดียวกัน ตลอดจนเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของพลาสมาเปล่า และตัวอย่างพลาสมาเพื่อพิจารณาถึงการรบกวนของสารอื่น หรือ endogeneous substance ต่าง ๆ ที่อาจมีผลต่อวิธีการวิเคราะห์ได้

ง. **การหาขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถตรวจพบพีคยาได้ (Lower Limit of Detection ; LLD)** การหาขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถตรวจพบพีคยาได้นั้น อาศัยหลักการของความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารในพลาสมาซึ่งยังสามารถให้สัญญาณในการตรวจวัดได้ โดยต้องให้สัญญาณของสารที่สนใจอย่างน้อย 2 เท่าของสัญญาณรบกวนปกติ (signal to noise ratio ; $S/N \geq 2$) (Silva ,1985 ; Buick ,A.R. , Doig, M.V. , Jeal , S.C. , Land G.S. และ McDowall ,R.D. ,1990) ซึ่งจะคำนวณโดยใช้อัตราส่วนของความสูงพีคยากับความสูงของสัญญาณรบกวนปกติ

วิธีการทดลอง เตรียมตัวอย่างพลาสมาให้ยามีช่วงความเข้มข้นต่ำ 2 -3 ความเข้มข้น เลือกความเข้มข้นที่เมื่อวิเคราะห์ปริมาณตามวิธีที่ผ่านการประเมินในขั้นตอนที่ 3 แล้วให้อัตราส่วนของความสูงพีคยากับความสูงของสัญญาณรบกวนปกติไม่น้อยกว่า 2ต่อ1 เมื่อใช้เอทเทนนูเอชันของเครื่องประมวลผล (Integrator)ที่ต่ำสุด

ทำการทดลองโดยใช้ตัวอย่างพลาสมาความเข้มข้นเดียวกันนี้รวม 10 ตัวอย่าง คำนวณร้อยละของสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนของอัตราส่วน S /N ต้องไม่เกิน ± ร้อยละ 10

จ. **การหาขีดความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ (Lower Limit of Quantitation : LLQ)** ความเข้มข้นต่ำสุดของยาในพลาสมาที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ คือ ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการหาความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวัน และความเที่ยงตรงระหว่างวันที่ให้ค่าร้อยละ

ของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของพื้นที่พีคยา และ/หรือความสูงพีคยาไม่เกินร้อยละ 10 LLQ อาจเป็นค่าเดียวกับ LLD หรือไม่ก็ได้โดยพิจารณาจากความแปรปรวนของการศึกษาความเที่ยงตรงเป็นหลัก

ฉ. **การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)** ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สามารถหาได้โดยวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาที่ไม่รู้ความเข้มข้นของยาควบคู่ไปกับการสร้างกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ คำนวณค่าความเข้มข้นของยาในพลาสมาของตัวอย่างพลาสมานั้นจากกราฟมาตรฐาน และนำมาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่แท้จริง

คำนวณในรูปร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์ (analytical recovery)ดังนี้

: ร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์

$$= \frac{\text{ความเข้มข้นของยาในพลาสมาที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ความเข้มข้นที่แท้จริงของยาในพลาสมา}} \times 100$$

วิธีทดลอง

1. รับตัวอย่างพลาสมาที่มียาจำนวน 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่างแยกออกจากกัน

2. ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมานั้นด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมินจากขั้นตอนที่ 3 โดยควบคู่ไปกับการสร้างกราฟมาตรฐาน

3. คำนวณปริมาณยาจากตัวอย่างพลาสมาที่วิเคราะห์ได้จากกราฟมาตรฐาน และคำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับของวิธีวิเคราะห์

ช. **การศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)**

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์แบ่งเป็น ความเที่ยงตรงภายในหนึ่งวัน (Within - run precision) และความเที่ยงตรงระหว่างวัน (Between - run precision) โดยทั่วไปควรมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของความเที่ยงตรงของ

วิธีวิเคราะห์ไม่เกินร้อยละ 10 (Silva , 1985) สำหรับในกรณีที่ยามีความเข้มข้นน้อยมากควรมีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ที่สูงกว่านี้ได้ (Buick ,A.R. , Doig, M.V. , Jeal , S.C. , Land G.S. และ McDowall ,R.D. ,1990) ในการทดลองครั้งนี้ยาส่วนใหญ่มีความเข้มข้นต่ำมากจึงจะถือค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนในการวิเคราะห์ไม่เกินร้อยละ 15

1. **การหาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ภายในหนึ่งวัน**

วิธีการทดลอง เตรียมชุดตัวอย่างพลาสมาที่มีความเข้มข้นต่างๆ ให้ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นของยาในพลาสมาที่ศึกษา โดยแต่ละความเข้มข้นเตรียมตัวอย่างพลาสมาจำนวน 3 ชุด (n = 3) วิเคราะห์ตามวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมินจากขั้นตอนที่ 3 ให้เสร็จสิ้นในวันเดียวกัน คำนวณค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของพื้นที่พีคยา และ/หรือความสูงพีคยาในความเข้มข้นเดียวกัน

2. **การหาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ระหว่างวัน**

วิธีการทดลอง เตรียมตัวอย่างพลาสมาที่มีชุดความเข้มข้นต่างๆ ให้ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นของยาในพลาสมาที่ศึกษาวันละ 1 ชุด ทำการวิเคราะห์ปริมาณตามวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการประเมินในขั้นตอนที่ 3 เป็นเวลา 5 วัน (n = 5) คำนวณค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของพื้นที่พีคยาและ/หรือความสูงพีคยาในความเข้มข้นเดียวกัน

ขั้นตอนที่ 5 ประมวลผลการแยกพลาสมาโปรตีน และการวิเคราะห์ปริมาณยากลุ่มด่างในพลาสมา เพื่อศึกษาถึงผลของระดับการจับกับพลาสมาโปรตีน ระดับความเป็นด่างของยาที่ศึกษาที่มีต่อการวิเคราะห์ยากลุ่มด่างโดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน และพิจารณาถึงข้อจำกัดที่มีผลต่อการนำกระสวนการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของยากลุ่มกรดไปใช้กับการวิเคราะห์ยากลุ่มด่าง