

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

1. ระเบียบวิธีวิจัยมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนการทำวิจัย มีดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยการหาสภาวะสภาวะของวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม ในเวลาที่เหมาะสม โดยการปรับอัตราส่วนของภูมิภาคเคลื่อนที่ อัตราการไหล และความยาวคลื่นที่ใช้วัด และทำการประเมินความเหมาะสมของระบบ (system suitability) ในหัวข้อ resolution, tailing factor, theoretical plate, relative standard deviation (%RSD)

ขั้นตอนที่ 2 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

ทำการประเมินความถูกต้องของวิธีในหัวข้อ ความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ความเป็นเส้นตรง (linearity) ช่วงของการวัด (range) ความถูกต้อง (accuracy) ความแม่นยำ (precision) ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection) และ ขีดจำกัดการหาปริมาณ (limit of quantitation)

ขั้นตอนที่ 3 การวิเคราะห์ตัวอย่างยา

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างยาที่มีผลิตในโรงพยาบาลหัวหิน โดยการคำนวณหาปริมาณจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากวิธีที่พัฒนาขึ้น

ขั้นตอนที่ 4 การสรุปและรายงานผล

ขั้นตอนที่ 5 การถ่ายทอดเทคโนโลยีให้กับหน่วยภูมิปัญญา คณะเภสัชศาสตร์

2. อุปกรณ์ในการวิจัย

2.1 เครื่องมือ

เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) ชนิดระบบฉีดอัตโนมัติ รุ่น Agilent 1100 series พร้อมเครื่องตรวจวัดอัลตราไวโอเล็ตชนิดไดโอดอาร์เรย์ และ เครื่องประมวลผลโปรแกรม Chemstation software Version A.08.01 (Agilent, USA) Symmetry reversed-phase C18 column ขนาด 5 ไมครอน ขนาด 4.6 x 150 มิลลิเมตร (Water, USA)

2.2 สารเคมี

สารมาตรฐานคลอรัลไฮเดรต (BP grade) และ ตัวอย่างยาตัวอย่างยาเตรียมคลอรัลไฮเดรตชนิดน้ำเชื่อม ได้รับความอนุเคราะห์จากฝ่ายเภสัชกรรม โรงพยาบาลหัวหิน MeOH และ Acetonitrile HPLC grade (บริษัท E Merck) สารเคมีทุกชนิดที่ใช้เป็น analytical grade

3. ขั้นตอนวิธีการดำเนินการ

1. การเตรียมข้อมูลเบื้องต้น

จากการทบทวนวรรณกรรมของ Rao และคณะ [Rao RN, Parimala P, Khalid S, Alvi SN. Detection of the adulteration of traditional alcoholic beverages by the separation and determination of alprazolam, chloralhydrate and diazepam using reversed-phase high-performance liquid chromatography. Anal Sci. 2004 Feb;20(2):383-6] ที่ทำการวิเคราะห์ คลอรัลไฮเดรต ที่ปลอมปนในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์แผนโบราณโดยใช้ระบบโครมาโทกราฟีดังต่อไปนี้

Column : a reversed-phase C18 column
Mobile Phase : water-methanol-acetic acid (35:65:0.1 v/v/v)
Detection : a photo-diode array detector at 210 nm.
Flow rate : 1.0 ml/min
Temperature : 27°C

สามารถวิเคราะห์ คลอรัลไฮเดรต (CHL), alprazolam (ALP) และ diazepam (DIA) ดังโครมาโทแกรมต่อไปนี้

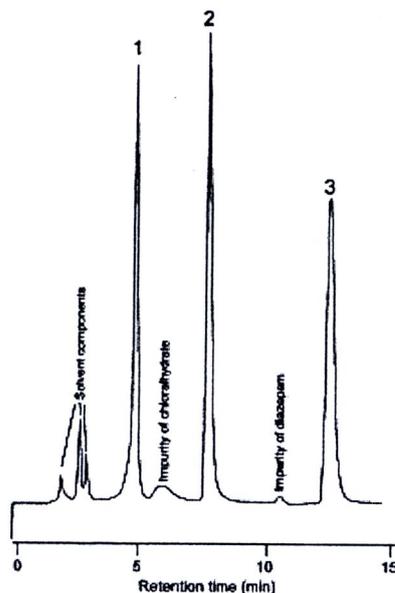
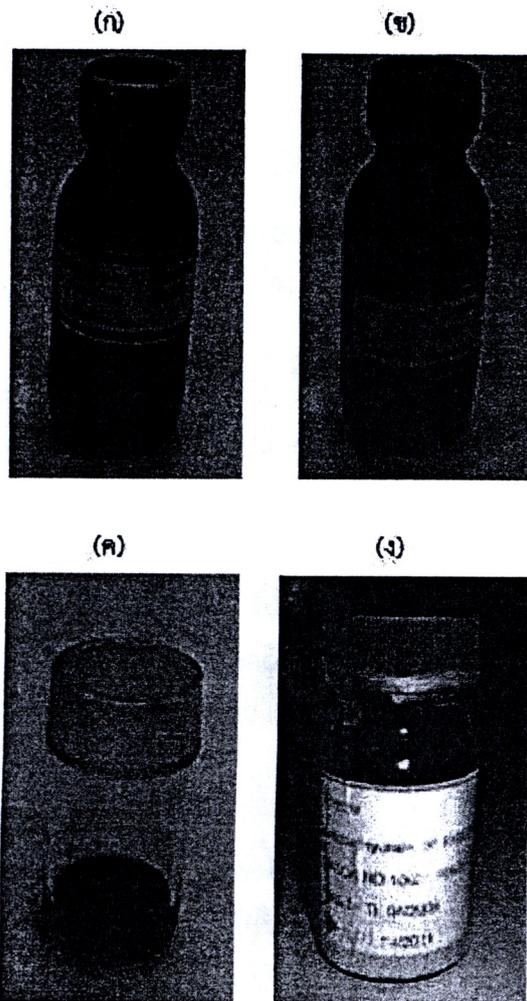


Fig. 3 Typical HPLC chromatogram of a synthetic mixture containing 1, CHL (42 µg); 2, ALP (2.6 µg); and 3, DIA (2.3 µg).

2. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

(1) ตัวอย่างยาเตรียมคลอรัลไฮเดรตชนิดน้ำเชื่อม

ตัวอย่างยาเตรียมคลอรัลไฮเดรตชนิดน้ำเชื่อมได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลหัวหินดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 (ก) ยาเตรียมคลอรัลไฮเดรตชนิดน้ำเชื่อมในภาชนะบรรจุก่อนเปิดใช้ (ข) ยาเตรียมคลอรัลไฮเดรตชนิดน้ำเชื่อมในภาชนะบรรจุหลังเปิดใช้ (ค) ยาเตรียมคลอรัลไฮเดรตชนิดน้ำเชื่อม (ง) วัตถุบคคลอรัลไฮเดรต

สูตรตำรับยาเตรียมคลอรัลไฮเดรตชนิดน้ำเชื่อมสำหรับผู้ป่วยเฉพาะรายกลุ่มงานเภสัชกรรม

โรงพยาบาลหัวหิน เป็นดังนี้

Choral hydrate	10.00 g
Citric acid	0.75 g
Paraben conc.	1.00 mL
Glycerol (glycerin)	10.00 mL
Purified water	20.00 mL
Color, Flavor	q.s.
น้ำหวานเฮลซ์บลูบอย	q.s. to 100.00 mL

(paraben conc. ประกอบด้วย MP 10 % : PP 2 % ใน glycerin)

(2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานคลอรัลไฮเดรต (Chloral hydrate, CH) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรอง แล้วนำไปฉีดด้วย HPLC และเตรียมสารละลายมาตรฐานขององค์ประกอบอื่นๆ ในยาน้ำเชื่อมคลอรัลไฮเดรต คือ Citric acid (CA) 100 ppm, Methyl paraben (MP) 100 ppm, Propyl paraben (PP) 100 ppm, Glycerin (GC) 100 ppm, Sorbital (SB) 100 ppm, Saccharin Sodium (SS) 100 ppm เช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐานคลอรัลไฮเดรต กรอง แล้วนำไปฉีดด้วย HPLC

(3) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

เตรียมสารละลายตัวอย่างยาน้ำเชื่อมคลอรัลไฮเดรต (SYR) โดยการเจือจางตัวอย่างยา 50 ไมโครลิตร ในน้ำ 5 มิลลิลิตร แล้วเปิดสารละลาย 20 ไมโครลิตร ปรับให้เป็น 2000 ไมโครลิตร ด้วย วัฏภาคเคลื่อนที่ กรอง แล้วนำไปฉีดด้วย HPLC เตรียมสารละลายตัวอย่างน้ำหวาน Hale Blue Boy (HB) โดยการเจือจางตัวอย่างยา 50 ไมโครลิตร ในน้ำ 5 มิลลิลิตร แล้วเปิดสารละลาย 20 ไมโครลิตร ปรับให้เป็น 2000 ไมโครลิตร ด้วย วัฏภาคเคลื่อนที่ กรอง แล้วนำไปฉีดด้วย HPLC

(4) การเลือกสภาวะการวิเคราะห์

ทำการวิเคราะห์โดยเริ่มจากสภาวะของ Rao และคณะฯ คือ water-methanol-acetic acid (35:65:0.1 v/v/v) อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ 210 และ 254 nm ทำการวิเคราะห์โดยการฉีดสารละลายมาตรฐาน chloral hydrate ครั้งละ 10 ไมโครลิตร คอลัมน์ที่ใช้ คือ Symmetry reversed-phase C18 column ขนาด 5 ไมครอน ขนาด 4.6 x 150 มิลลิเมตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 และ 254 nm และมีการปรับวัฏภาคเคลื่อนที่ อื่นๆ ดังนี้

Mobile phase : 50mM Am acetate : MeOH (40:60)
: 50mM Am acetate : MeOH (50:50)
FR : 1 mL/min
Detection : 254 nm