

### บทที่ 3

#### ผลการศึกษาและการวิจารณ์ผล

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของ HPLC สำหรับ อิมิพรามิน, เดซิพรามิน, อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน

##### 1.1 การเลือกใช้ดีเทคเตอร์

###### 1.1.1 การศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ต

ผลการศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตแสดงดังรูปที่ 2-6

จากสเปกตรัม สารละลายอิมิพรามิน, เดซิพรามิน และสารมาตรฐานภายใน โคลมิพรามิน มีค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ใกล้เคียงกันคือ 251 นาโนเมตร ส่วนอมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน มีค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด คือ 238.8 นาโนเมตร หรือประมาณ 239 นาโนเมตร ดังนั้นในการวิเคราะห์ยาอิมิพรามินและเดซิพรามินจะใช้ความยาวคลื่นที่ 251 นาโนเมตร ส่วนการวิเคราะห์ยาอมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน จะใช้ความยาวคลื่นที่ 239 นาโนเมตร

###### 1.1.2 การศึกษาคุณสมบัติการเรืองแสง

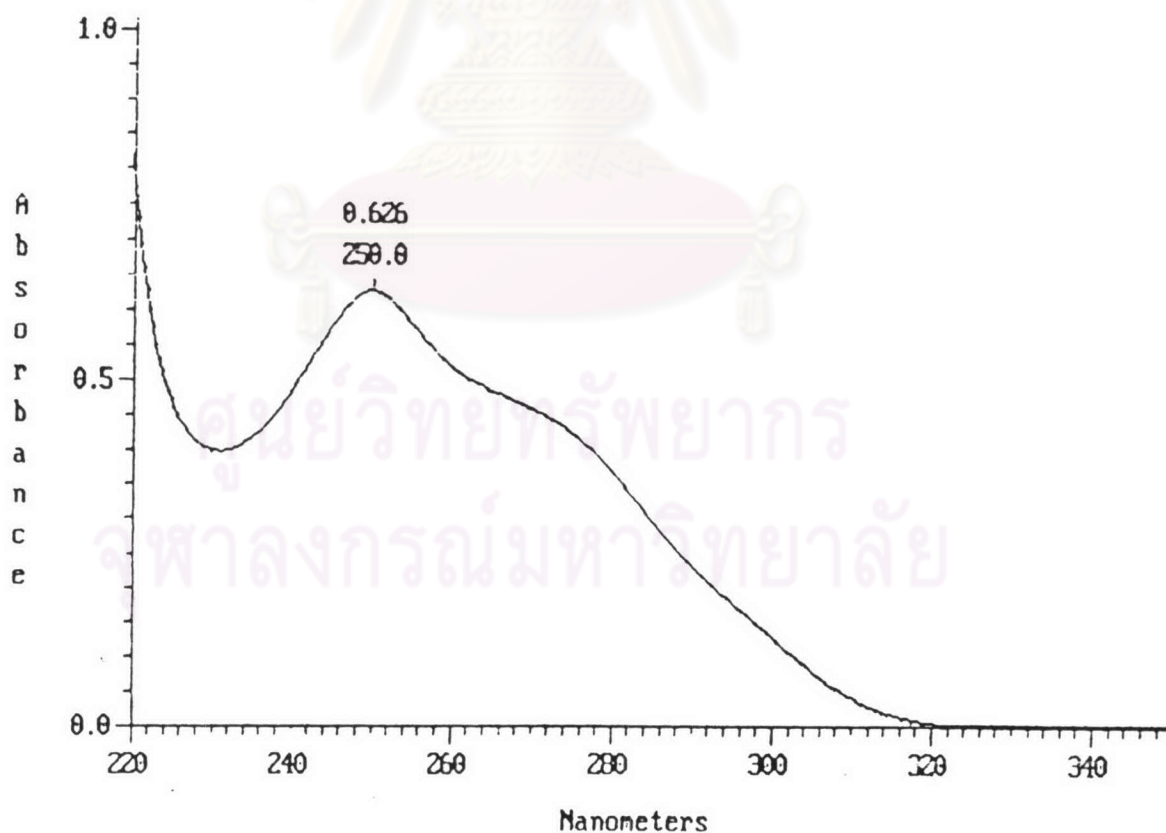
ผลการศึกษาคุณสมบัติการเรืองแสงของอิมิพรามิน, เดซิพรามิน, อมิทริปทีลีน, นอร์ทริปทีลีน และโคลมิพรามิน แสดงในตารางที่ 2

การวิเคราะห์ยาอิมิพรามินและเดซิพรามิน ใช้  $\lambda_{Ex}$  เท่ากับ 256 นาโนเมตรและ  $\lambda_{Em}$  เท่ากับ 370 นาโนเมตร ส่วนการวิเคราะห์อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน ใช้  $\lambda_{Ex}$  เท่ากับ 285 นาโนเมตร และ  $\lambda_{Em}$  เท่ากับ 310 นาโนเมตร

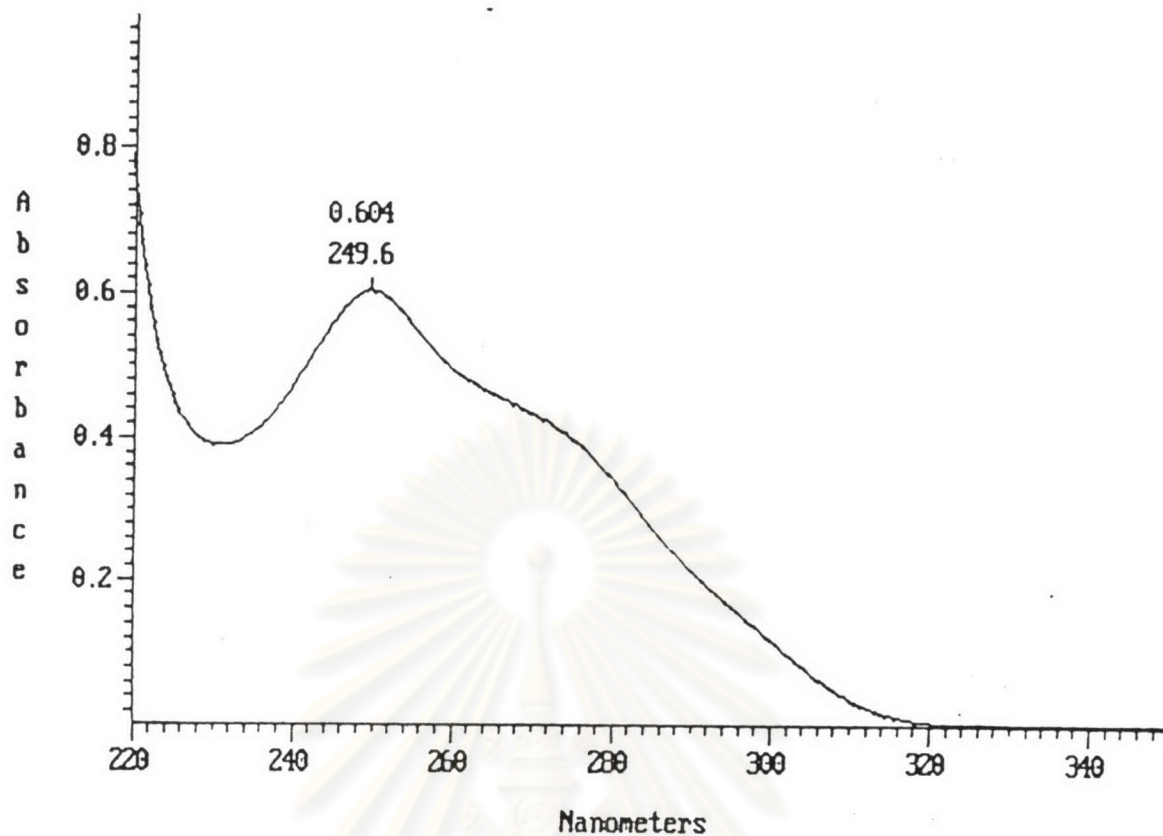
สำหรับโคลมิพรามินแม้จะมี  $\lambda_{Ex}$  และ  $\lambda_{Em}$  ใกล้เคียงอิมิพรามิน และเดซิพรามิน แต่ในสูตรโครงสร้างมีคลอโรกรุ๊ปอยู่ ซึ่งจะมีผลต่อ intensity ของโคลมิพรามินได้ ขณะเดียวกัน ถ้าวิเคราะห์อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน โดยใช้ดีเทคเตอร์ฟลูออโร โคลมิพรามินอาจไม่ใช่ IS ที่เหมาะสม

ตารางที่ 4 แสดง Excitation wavelength ( $\lambda_{Ex}$ ) และ Emission wavelength ( $\lambda_{Em}$ ) ของยา  
ต่างๆ ที่ความเข้มข้น 20 มคก/มล ในเมธานอล

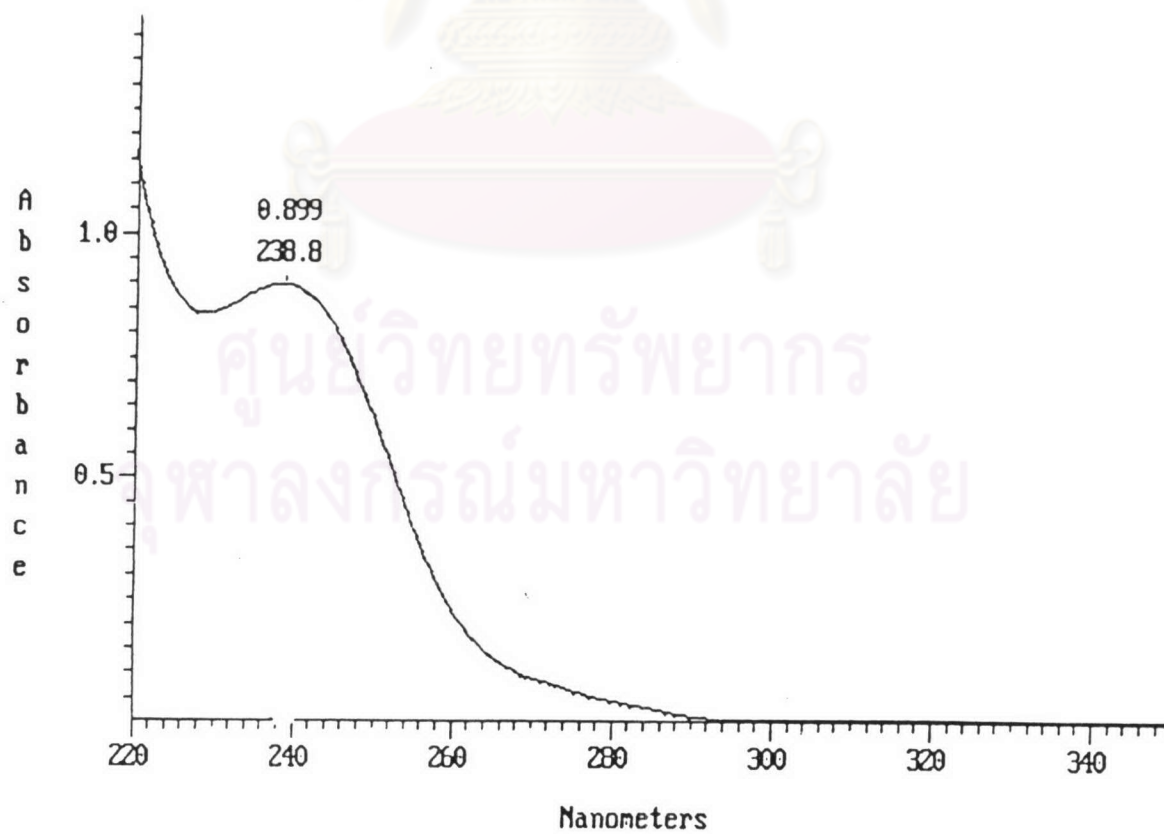
ตัวยา	$\lambda_{Ex}$	$\lambda_{Em}$	Intensity
1. อิมิมิพราซีน	276	370	10,550.0
	256	370	8971.0
2. เดซิพราซีน	256	370	5267.0
3. คลอิมิพราซีน	250	394	1009.0
4. อิมิทธิปทีลีน	282	310	1216.0
	285	310	1074.0
5. นอร์ทธิปทีลีน	288	579	897.3
	285	310	356.2



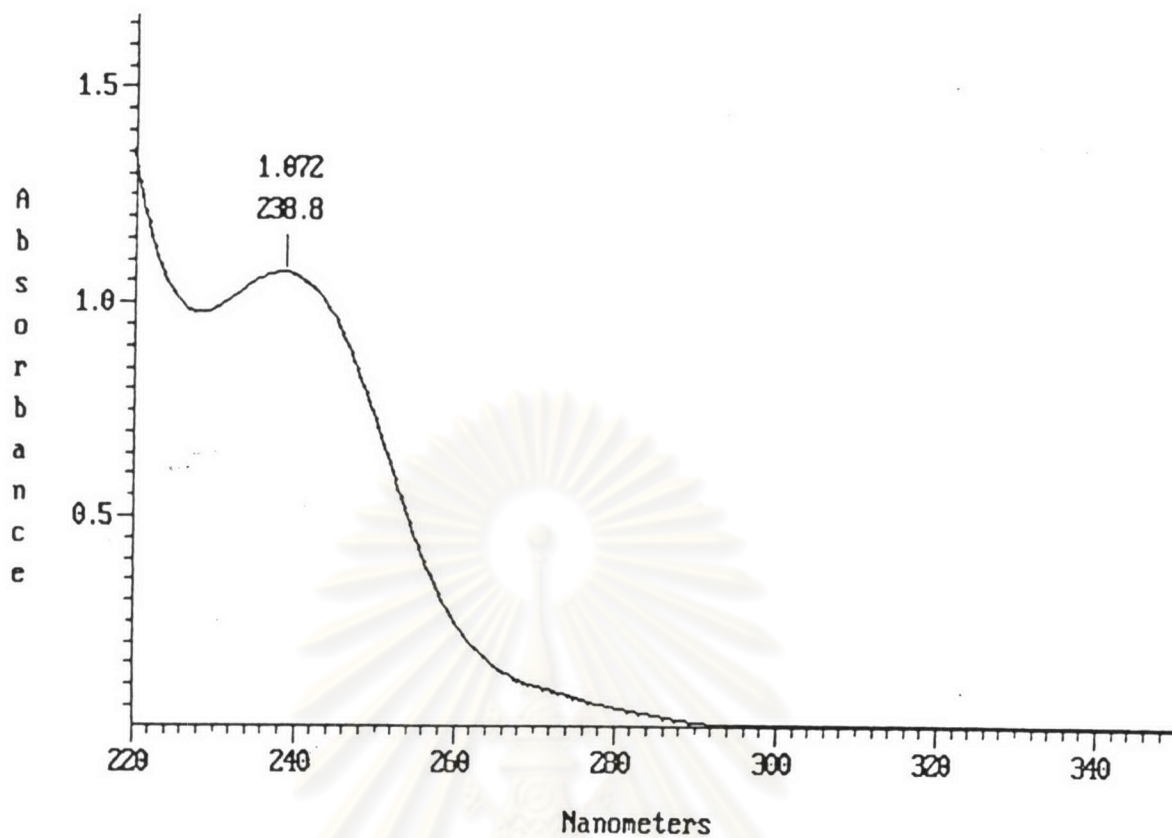
รูปที่ 2 สเปกตรัมอัลตราไวโอเล็ตของอิมิพราซีน ในเมธานอล ความเข้มข้น 20 มคก/มล



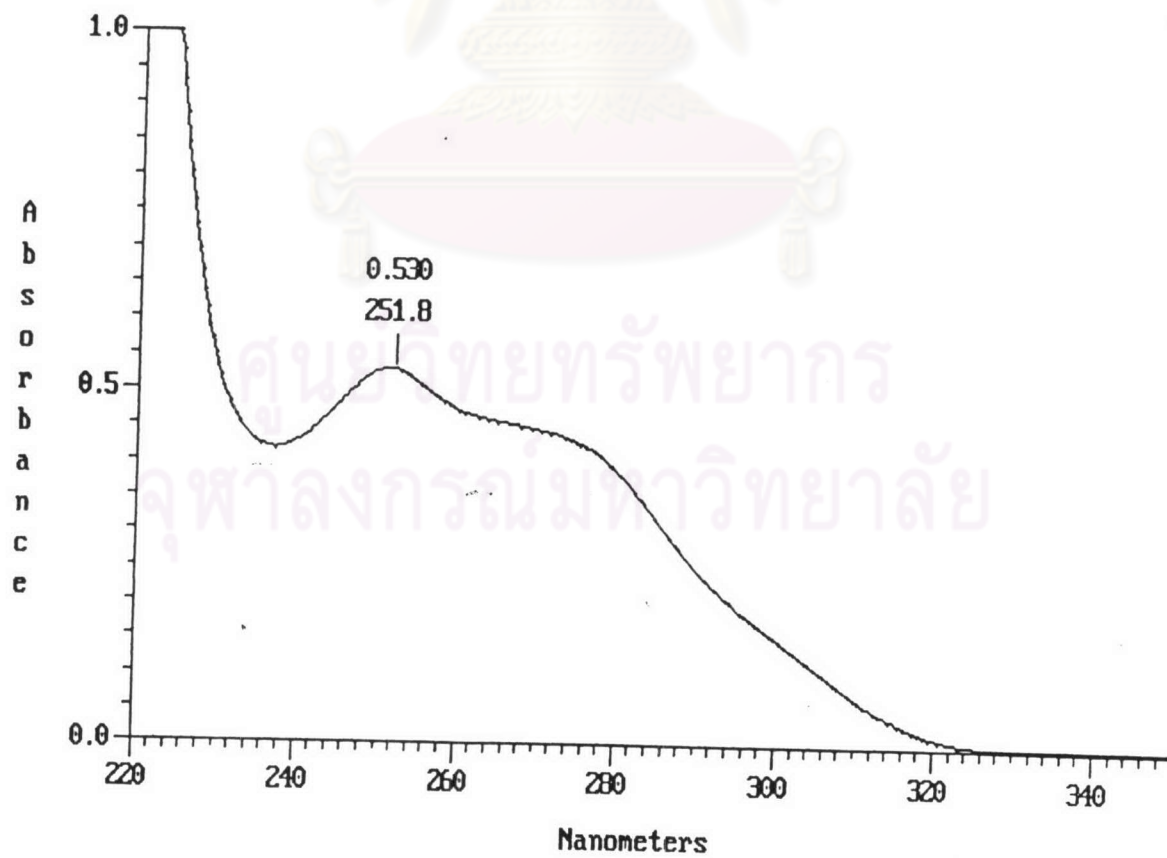
รูปที่ 3 สเปกตรัมอัลตราไวโอเล็ตของเดซิพรามินในเมทานอล ความเข้มข้น 20 มคก/มล



รูปที่ 4 สเปกตรัมอัลตราไวโอเล็ตของอมิทริปิทีลินในเมทานอล ความเข้มข้น 20 มคก/มล



รูปที่ 5 สเปกตรัมอัลตราไวโอเล็ตของออร์โทฟีนีลในเมทานอล ความเข้มข้น 20 มคก/มล



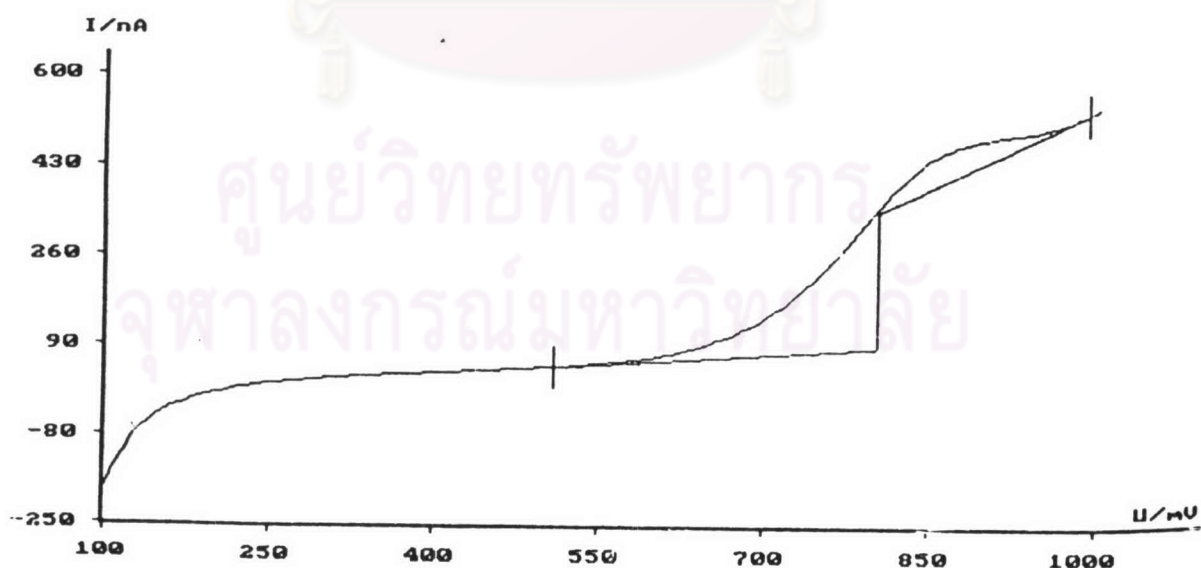
รูปที่ 6 สเปกตรัมอัลตราไวโอเล็ตของโคลิมิพรามินในเมทานอล ความเข้มข้น 20 มคก/มล

### 1.3.3 การศึกษาคุณสมบัติในทางเคมีไฟฟ้า

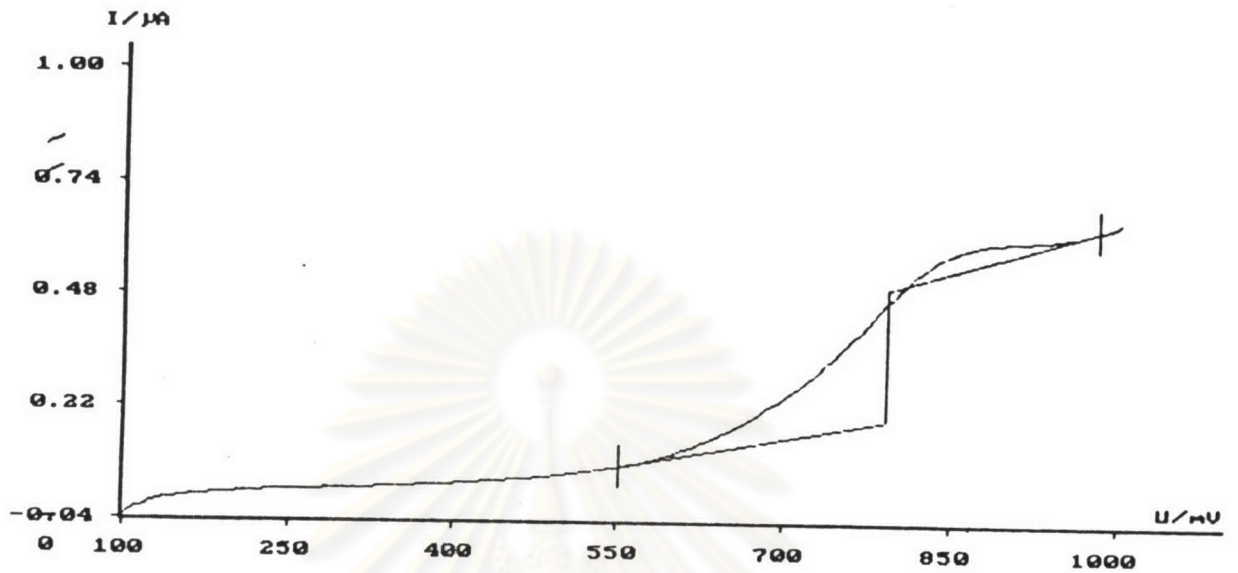
อิมิพรามิน, เดซิพรามิน และโคลมิพรามิน มีคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าโดยเมื่อให้ค่าศักย์ไฟฟ้าคงที่ +1.0 โวลต์ อิมิพรามิน, เดซิพรามิน และโคลมิพรามินสามารถเกิดปฏิกิริยาให้กระแสจำกัดแปรตามความเข้มข้นของยาได้ ดังรูปที่ 7-9 ค่าศักย์ครึ่งคลื่นของยาและค่าศักย์ที่ทำให้เกิดกระแสจำกัดแสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าศักย์ครึ่งคลื่นของยาและค่าศักย์ที่ทำให้เกิดกระแสจำกัด

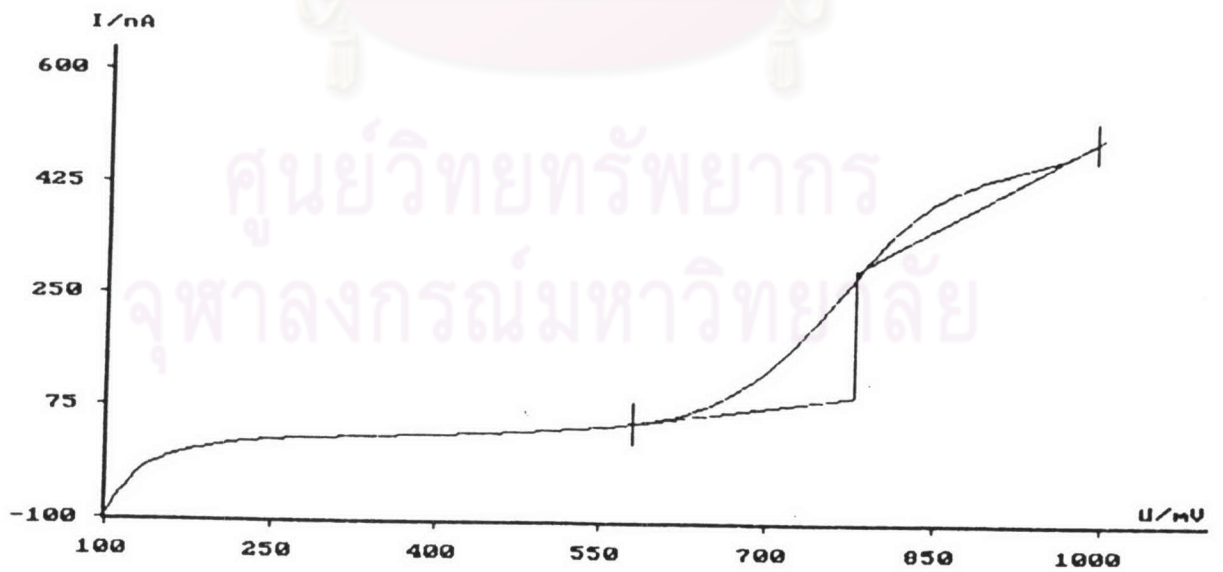
ยา	ค่าศักย์ครึ่งคลื่น (มิลลิโวลต์)	ค่าศักย์ที่ทำให้เกิดกระแสจำกัด (โวลต์)
อิมิพรามิน	+803	+1.0
เดซิพรามิน	+793	+1.0
โคลมิพรามิน	+780	+1.0



รูปที่ 7 โวลแทมโมแกรมของอิมิพรามินที่ความเข้มข้น 2.5 มก/มล ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต

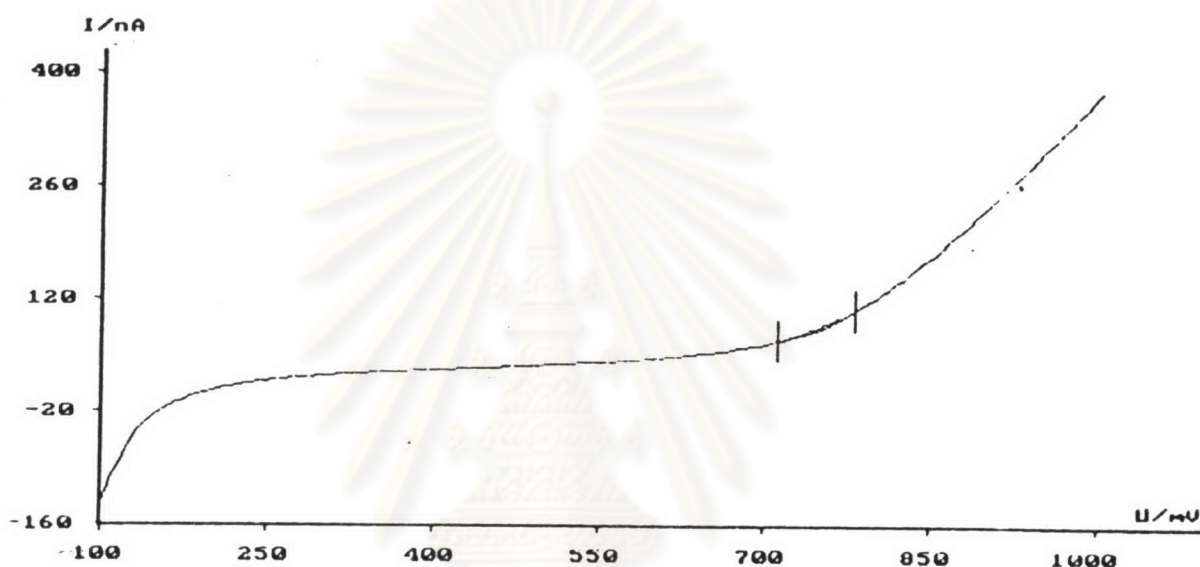


รูปที่ 8 โวลแทมโมแกรมของเดซิพรามินที่ความเข้มข้น 2.5 มคก/มล ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต

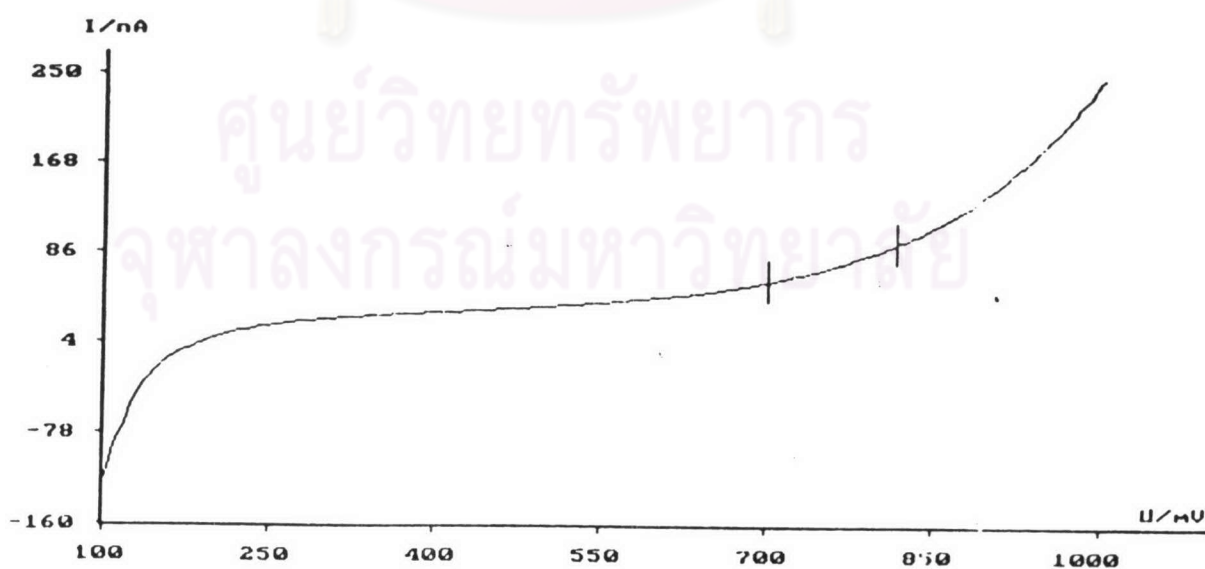


รูปที่ 9 โวลแทมโมแกรมของโคลมิพรามินที่ความเข้มข้น 2.5 มคก/มล ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต

ส่วนอมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน พบว่าค่าศักย์ที่จะทำให้เกิด ปฏิ  
 กิริยาให้กระแสจำกัดนั้นมีค่ามากกว่า +1.0 โวลต์ ซึ่งเกินขีดจำกัดของ ขั้วไฟฟ้ากลาสสิ คาร์บอน  
 ดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11 ถ้าจะทำการหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อ ต้องหาขั้วไฟฟ้าที่ใช้ได้มาก  
 กว่า +1.0 โวลต์ ซึ่งควรใช้ขั้วไฟฟ้าพลาทินัม มากกว่า หรือปรับเปลี่ยนตัวทำละลายตัวยาให้มี  
 สภาพขั้วที่ต่างไปเพื่อบังคับค่าศักย์ไฟฟ้าได้ แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดของขั้วไฟฟ้าที่มีอยู่ ทำให้ไม่  
 สามารถทำการศึกษานหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีนได้



รูปที่ 10 โวลแทมโมแกรมของอมิทริปทีลีนที่ความเข้มข้น 2.5 มคก/มล ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต



รูปที่ 11 โวลแทมโมแกรมของนอร์ทริปทีลีนที่ความเข้มข้น 2.5 มคก/มล ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต

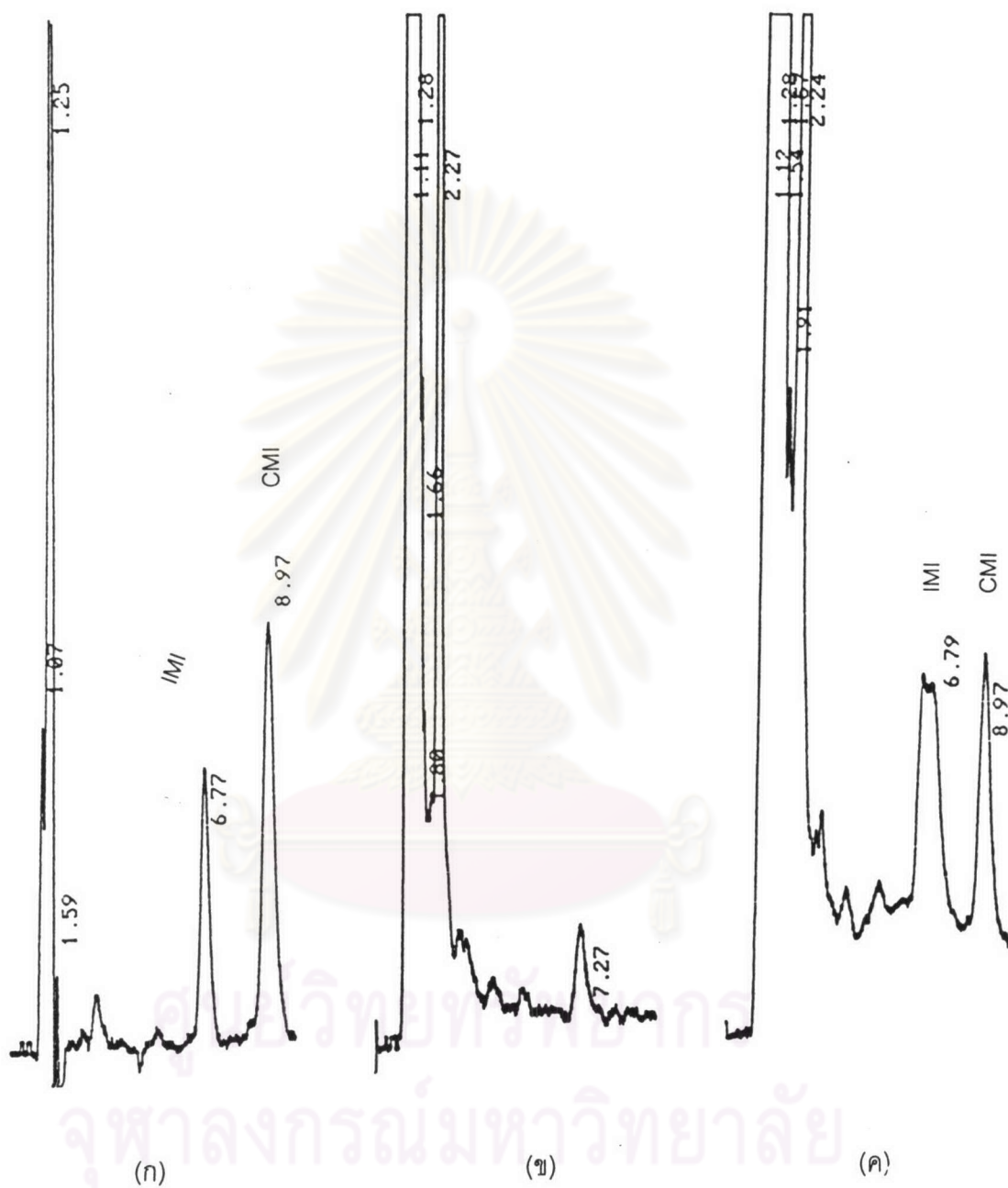
#### 1.4 การกำหนดส่วนประกอบของโมบายเฟส

จากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานอิมิพรามีน และโคลมิพรามีน ด้วยสภาวะเริ่มต้นคือ แอซีโตไนไตรล์ และบัฟเฟอร์อะซีเตด ความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ pH 5.5 .ในสัดส่วน 50:50 พบว่าพีคอิมิพรามีน และโคลมิพรามีนในโครมาโตแกรม มีเวลาที่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์เท่ากับ 6.77 และ 8.97 นาทีตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 12 แต่เมื่อใช้สภาวะนี้ไปวิเคราะห์ตัวอย่าง พลาสมาที่มีอิมิพรามีน และโคลมิพรามีน พบว่าพีคของอิมิพรามีนไม่สามารถแยกออกจากพีคของ endogenous ได้ดังแสดงในรูปที่ 12 เช่นกัน ทำให้ต้องปรับเปลี่ยนส่วนประกอบของ โมบายเฟสใหม่ จนได้สภาวะ HPLC ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์คือ

คอลัมน์	: LiChrospher <sup>(R)</sup> 60 RP-select B 5µm, 125x5.0 mm., i.d
โมบายเฟส	: แอซีโตไนไตรล์ : บัฟเฟอร์ฟอสเฟต 70มิลลิโมลาร์ pH 6.1
(อัตราส่วนโดยปริมาตร)	: (60:40)
อัตราการไหล	: 1.0 มล/นาที
ดีเทคเตอร์	: UV, 251 นาโนเมตร (สำหรับอิมิพรามีน และเดซิพรามีน)
	: UV, 239 นาโนเมตร (สำหรับอิมิพริปทีลีน และนอร์พริปทีลีน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





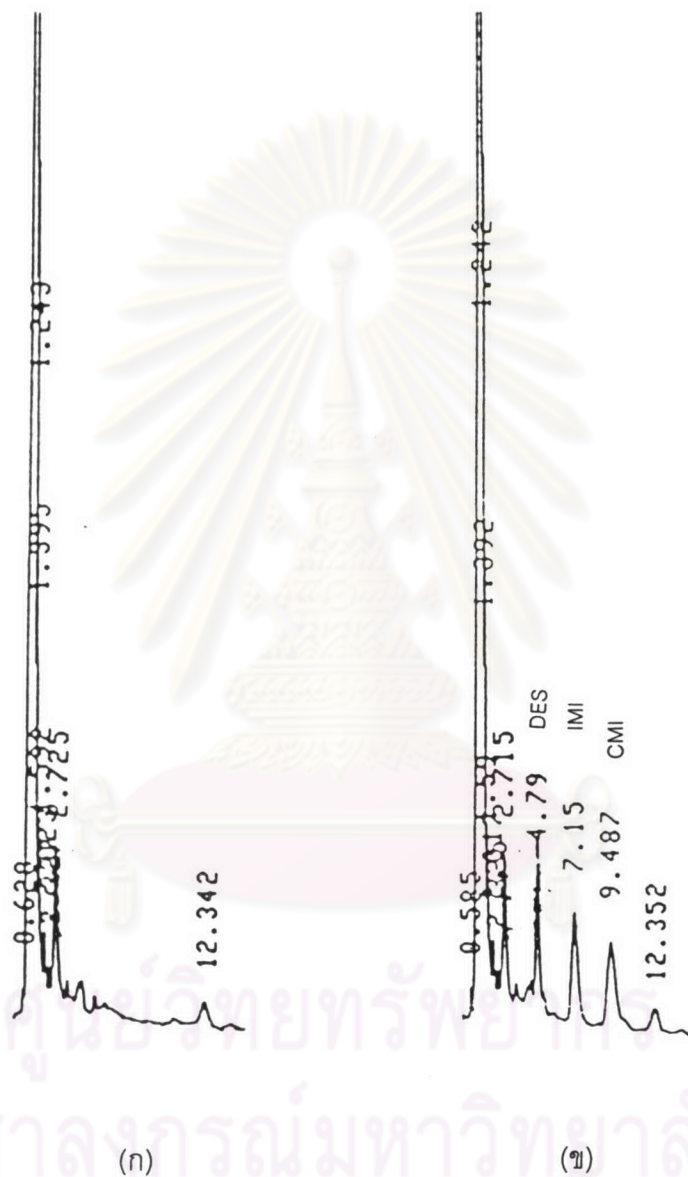
รูปที่ 12 โคโรมาโตแกรมของอิมิพรามีน และโคลมิพรามีน โมบายเฟสคือ แอซีโตไนไตรล์ และ บัฟเฟอร์อะซีเตต ความเข้มข้น 0.25 นอร์มอล pH 5.5 .ในสัดส่วน 50:50  
 (ก) สารละลายมาตรฐานอิมิพรามีนและโคลมิพรามีน ความเข้มข้น 1 มก/มล  
 (ข) แบลงค์พลาสมา  
 (ค) ตัวอย่างพลาสมามาตรฐานที่มีอิมิพรามีน และโคลมิพรามีน ความเข้มข้น 1 มก/มล

## ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาเลือกใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสม

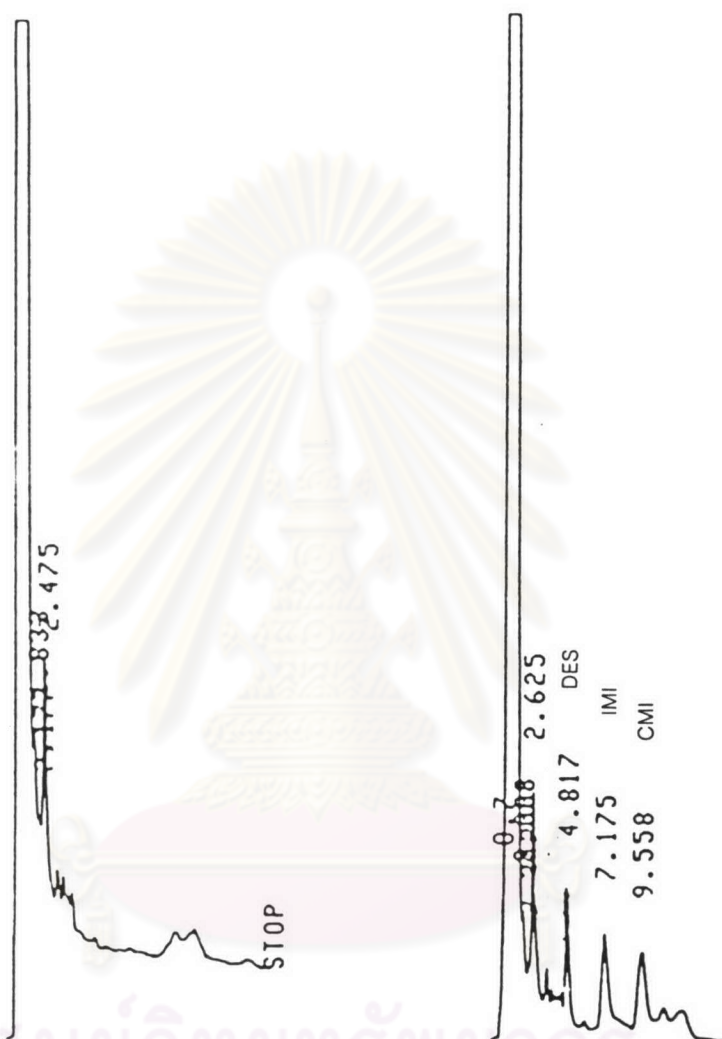
ตารางที่ 6 ผลการศึกษาการเลือกใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนสำหรับอิมิพรามิน, เดซิพรามิน และอมิทริปทีลีน, นอร์ทริปทีลีน

รายการ	สารแยกพลาสมาโปรตีน	
	แอสีโตไนไตรล์	เมธานอล
ลักษณะตะกอน	ก้อนเหนียวสีเหลืองอ่อนจับแน่นที่ก้นหลอด มีปริมาณน้อย และไม่ฟุ้งกระจายเมื่อเขย่า	ตะกอนละเอียดสีขาว รวมตัวกันแน่นพอควรที่ก้นหลอด ปริมาตรค่อนข้างมาก และฟุ้งเมื่อเขย่า
ลักษณะสารละลายเหนือตะกอน	สารละลายสีเหลืองอ่อนใส สะอาด เมื่อตั้งทิ้งไว้ (มากกว่า 5 ชม.) สารละลายยังคงใสอยู่	สารละลายสีเหลืองอ่อนใส สะอาด แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้ (2-3 ชม.) สารละลายจะขุ่นมัวไม่ใส
ลักษณะโครมาโตแกรม (รูปที่ 13-16)	- แบลงค์พลาสมาสะอาดดี - ตัวอย่างพลาสมาพบว่าพีคของยาแยกออกจากกันได้ดีและไม่ถูกรบกวนจากพีคของ endogenous	- แบลงค์พลาสมามีพีคของ endogenous ที่ชัดเจนและอยู่ใกล้กับพีคสารมาตรฐานภายใน - ตัวอย่างพลาสมาพีคของสารมาตรฐานภายในถูกรบกวนจากพีค endogenous
%การคืนกลับ	IMI 99.46%, DES 103.89% AMI 99.09%, NOR 95.89%	ไม่สามารถคำนวณได้

สารแยกพลาสมาโปรตีนที่เลือกใช้สำหรับอิมิพรามิน, เดซิพรามิน และอมิทริปทีลีน, นอร์ทริปทีลีน คือ แอสีโตไนไตรล์ เนื่องจากการใช้เมธานอล เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนจะให้สารละลายที่ไม่คงตัว เมื่อตั้งทิ้งไว้สารละลายใสจะขุ่นมัวไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ต่อด้วย HPLC ได้จึงไม่ได้หาค่า %การคืนกลับ ดังนั้นจึงเลือก แอสีโตไนไตรล์ เป็นสารแยกพลาสมาโปรตีนในการศึกษาต่อไป

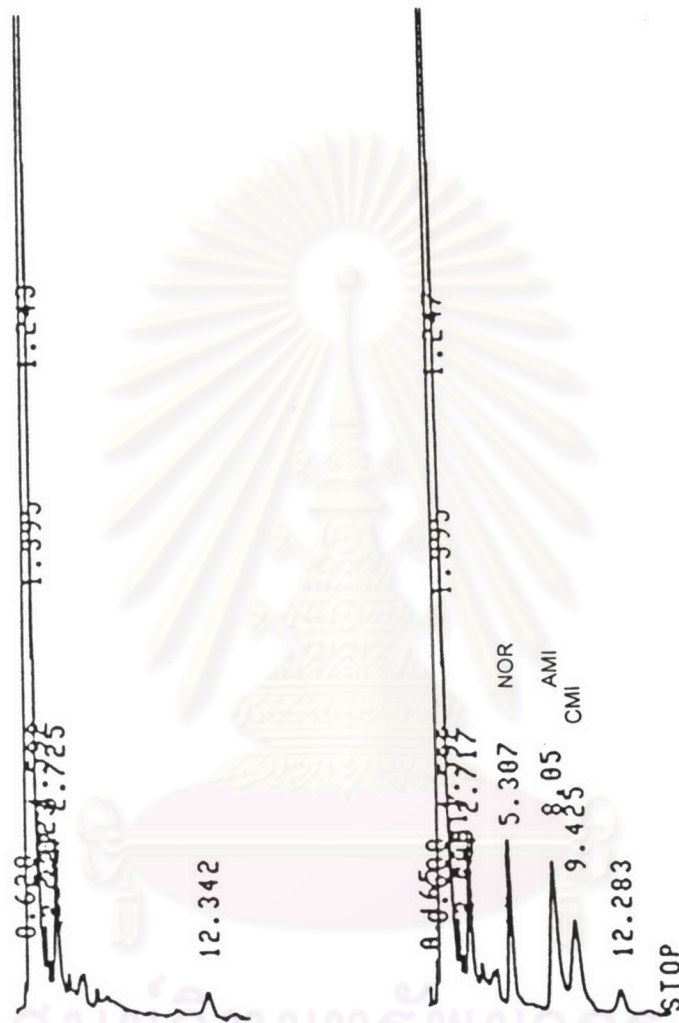


รูปที่ 13 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์หือมิพราซีน และเดซิพราซีนในพลาสติกเมื่อใช้สารแยก  
 พลาสติกโปรตีนคือ แอซีโตไนไตรล์  
 (ก) โครมาโทแกรมของแบลงค์พลาสติก  
 (ข) โครมาโทแกรมของตัวอย่างพลาสติกมาตรฐานที่มีหือมิพราซีนและเดซิพราซีน  
 ความเข้มข้น 1 มคก/มล



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- รูปที่ 14 โคโรมาโตแกรมของการวิเคราะห์หิอิมิพรามิน และเดซีพรามินในพลาสติกเมื่อใช้สารแยก  
พลาสติกโปรตีนคือ เมธานอล
- (ก) โคโรมาโทแกรมของแบลงค์พลาสติก
- (ข) โคโรมาโทแกรมของตัวอย่างพลาสติกมาตรฐานที่มีหิอิมิพรามินและเดซีพรามิน  
ความเข้มข้น 1 มคก/มล



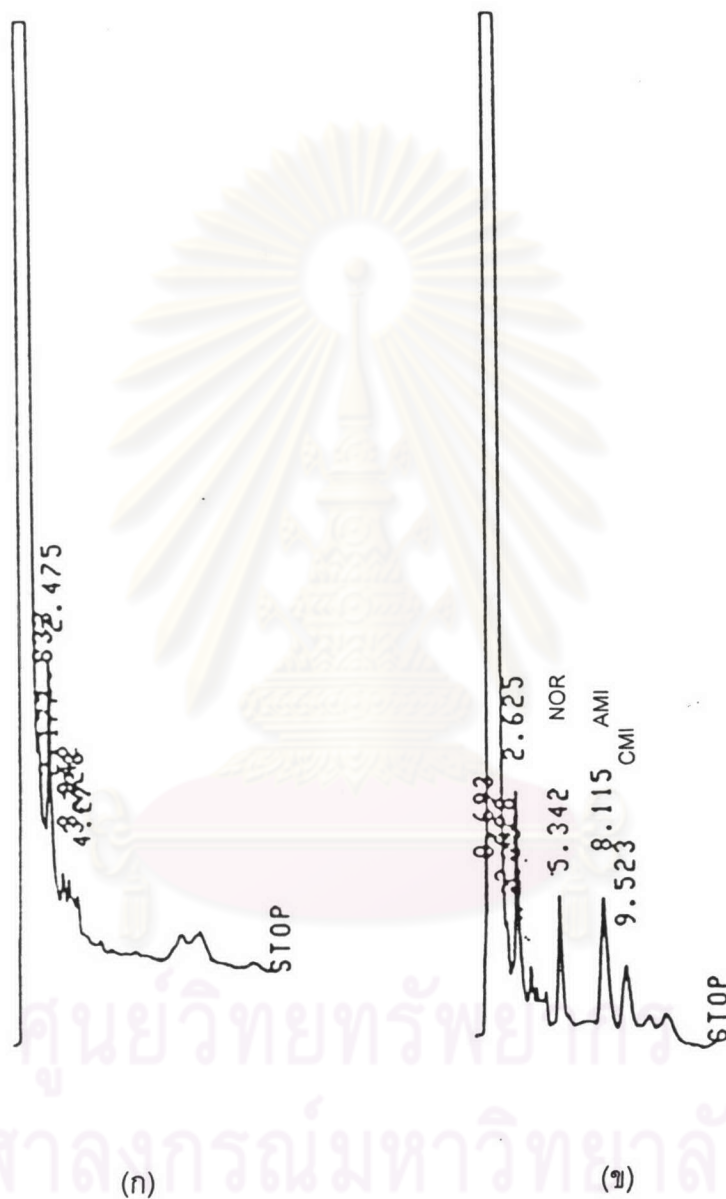
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 15 โครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ห่อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีนในพลาสติกเมื่อใช้สารแยกพลาสติกมาโปรตีนคือ แอซีโตไนไตรล์

(ก) โครมาโตแกรมของแบลนด์พลาสติก

(ข) โครมาโตแกรมของตัวอย่างพลาสติกมาตรฐานที่มีห่อมิทริปทีลีนและนอร์ทริปทีลีน

ความเข้มข้น 1 มก/มล



รูปที่ 16 โคโรมาโตแกรมของกาวิเคราะห์หือมิทธิปทีลีน และนอร์ทธิปทีลีนในพลาสติกเมือใช้

สารแยกพลาสติกมาโปรตีนคือ เมธานอล

(ก) โคโรมาโตแกรมของแบลงค์พลาสติก

(ข) โคโรมาโตแกรมของตัวอย่างพลาสติกมาตรฐานที่มีหือมิทธิปทีลีนและนอร์ทธิปทีลีน

ความเข้มข้น 1 มคก/มล

### ขั้นตอนที่ 3 การศึกษาพัฒนาเทคนิคการเพิ่มความไวในการวิเคราะห์อิมิพรามิน, เดซิพรามิน, อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน

#### 3.1 การทำให้สารตัวอย่างภายหลังการแยกพลาสมาโปรตีนมีความเข้มข้นมากขึ้น

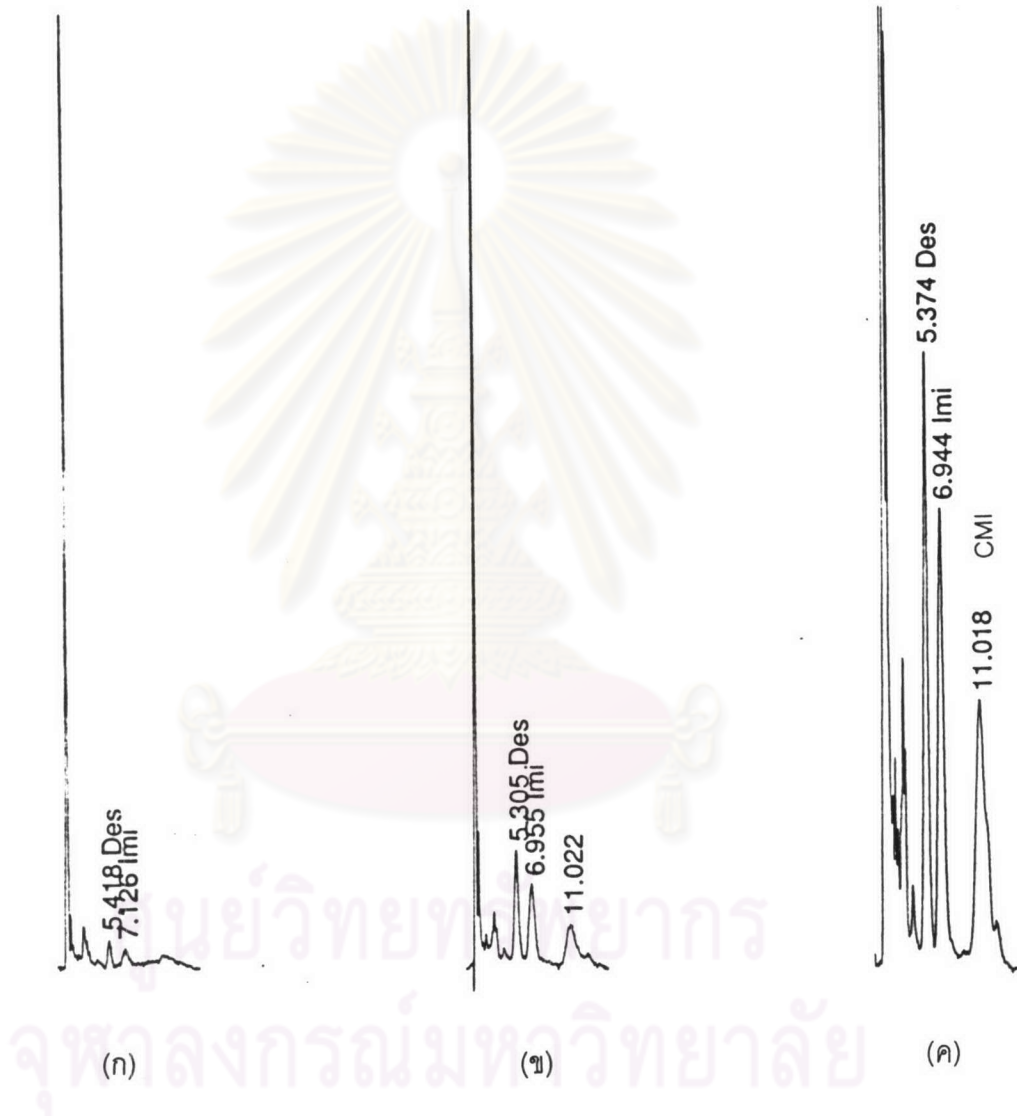
จากการเตรียมตัวอย่างพลาสมาด้วยการเพิ่มความไวด้วยวิธีต่างๆ ได้ผลการเพิ่มความไวในการวิเคราะห์อิมิพรามิน และเดซิพรามินดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบวิธีการเพิ่มความไวในการวิเคราะห์อิมิพรามิน และเดซิพรามิน เมื่อเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีต่างๆ

วิธีเตรียมตัวอย่าง	ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (นนก/มล)
สารแยกพลาสมาโปรตีน	300
การแยกส่วนของสารแยกพลาสมา	100
การระเหยแห้ง	40
การใช้สารละลายอินทรีย์ร่วมกับสารประกอบอนินทรีย์	40

จากผลการทดลองจะเห็นว่าทำให้สารตัวอย่างภายหลังการแยกพลาสมาโปรตีนมีความเข้มข้นขึ้น สามารถเพิ่มความไวในการวิเคราะห์อิมิพรามิน และเดซิพรามินได้ โดยการเตรียมตัวอย่างโดยการระเหยแห้ง (แผนภาพที่ 3) และการใช้สารประกอบอนินทรีย์ (แผนภาพที่ 4) ให้ความไวในการวิเคราะห์ที่เท่ากัน แต่การเตรียมตามแผนภาพที่ 3 ต้องเสียเวลาในการเตรียมตัวอย่างนานมาก ประมาณ 2 ชั่วโมง 15 นาทีต่อ 1 ตัวอย่าง ในขณะที่การเตรียมตามแผนภาพที่ 4 ใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างเพียงประมาณ 17 นาทีต่อ 1 ตัวอย่าง ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างพลาสมาตามแผนภาพที่ 4 ในการศึกษาต่อไป

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของอิมิพรามิน, เดซิพรามิน และอมิทริปทีลีน, นอร์ทริปทีลีน และโคลมิพรามิน โดยการเตรียมตัวอย่างพลาสมาที่มียาทุกตัว ที่ความเข้มข้น 2 มคก/มล เพื่อแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเพิ่มความไวของการวิเคราะห์ โดยการทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 17,18



รูปที่ 17 โครมาโทแกรมแสดงเปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีต่างๆ ตัวอย่างพลาสมา  
มาตรฐานที่มีอิมีพรามิน และเดซิพรามิน ที่ความเข้มข้น 2 มคก./มล. พลาสมา

- (ก) การใช้สารแยกพลาสมาโปรตีน
- (ข) การแยกส่วนของสารแยกพลาสมาโปรตีน
- (ค) การระเหยแห้ง





รูปที่ 18 โคโรมาโตแกรมแสดงเปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีต่างๆ ของตัวอย่างพลาสติกมาตรฐานที่มีอิมิทธิปทีลินและนอร์ทธิปทีลิน ที่ความเข้มข้น 2มคก/มล

- (ก) การใช้สารแยกพลาสติกมาโปรตีน
- (ข) การแยกส่วนของสารแยกพลาสติกมาโปรตีน
- (ค) การระเหยแห้ง

### 3.2 การเพิ่มความไวของการวิเคราะห์ด้วยการเลือกใช้ดีเทคเตอร์

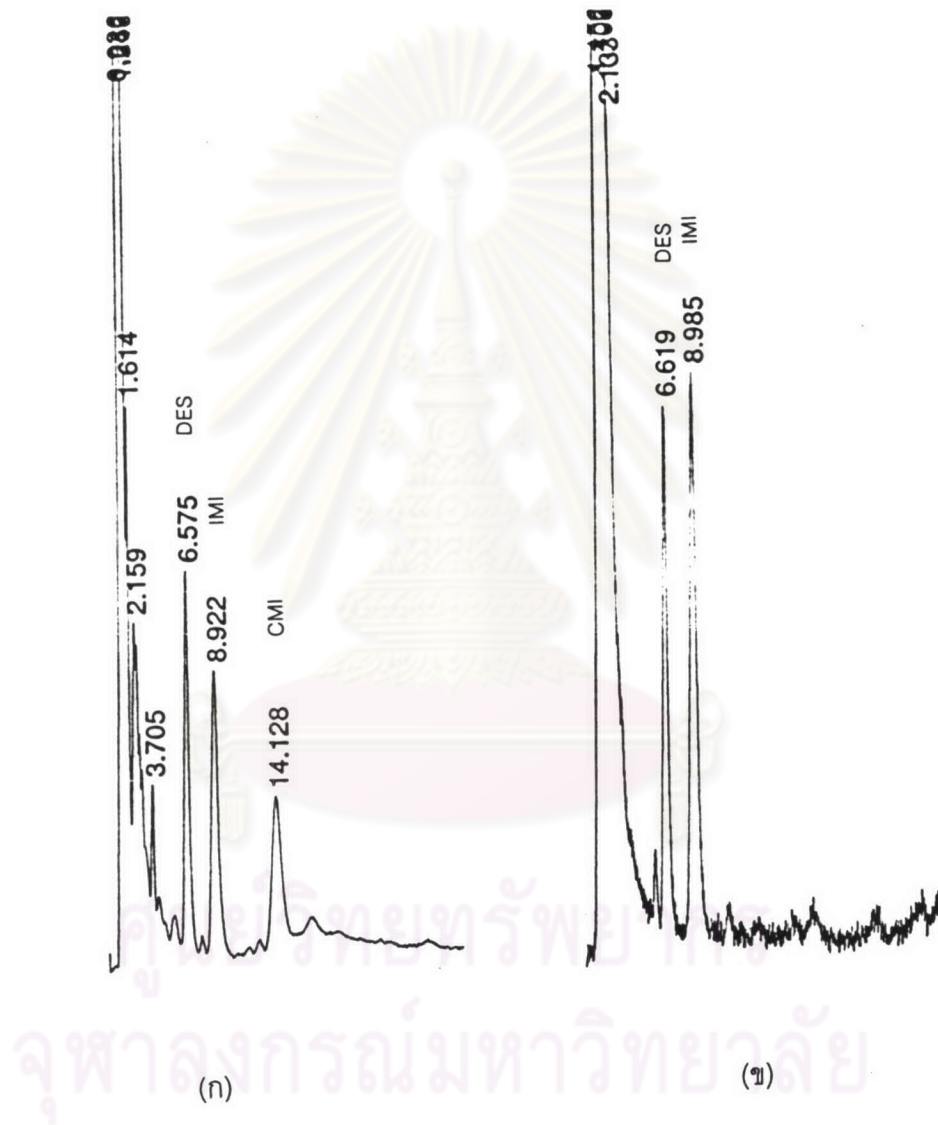
ผลการทดลองการเลือกใช้ดีเทคเตอร์เพื่อเพิ่มความไวของวิธีวิเคราะห์แสดงโครมาโตแกรมเปรียบเทียบระหว่างการใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต และดีเทคเตอร์ฟลูออโร ดังแสดงในรูปที่ 19 และโครมาโตแกรมเปรียบเทียบระหว่างการใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต และดีเทคเตอร์ อีซี ดังแสดงในรูปที่ 20

พบว่าการใช้ดีเทคเตอร์ฟลูออโรมีสัญญาณรบกวน(noise)สูงเมื่อเทียบกับ ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต แม้ว่าจะได้พีคที่มีขนาดสูงกว่า เมื่ออิมิพรามีน, เดซิพรามีน มีความเข้มข้นเท่ากัน คือ 1 มกค./มล. พลาสมา และไม่สามารถเห็นพีคของสารมาตรฐานภายในด้วย เมื่อวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 40 นนค./มล. ปรากฏว่าดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ตสามารถตรวจพบพีคยาได้ ในขณะที่ ดีเทคเตอร์ฟลูออโรไม่ปรากฏพีคยาให้เห็นเลย ดังแสดงในรูปที่ 21 ดังนั้นการใช้ดีเทคเตอร์ฟลูออโรจึงไม่สามารถช่วยเพิ่มความไวในการวิเคราะห์ยาอิมิพรามีน, เดซิพรามีน และอิมิทรูปทีลิน, นอร์ทรูปทีลินได้ เพราะปกติดีเทคเตอร์ฟลูออโรมีความไวและความจำเพาะเจาะจงมากกว่าการใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต ผลการทดลองนี้อาจเนื่องมาจากดีเทคเตอร์ฟลูออโร รุ่นที่ใช้ยังมีสัญญาณที่ไม่ดี ถ้าเปลี่ยนรุ่นของดีเทคเตอร์อาจทำให้ได้ผลที่ดีกว่านี้ก็ได้

ส่วนการใช้ดีเทคเตอร์ อีซี พบว่าได้โครมาโตแกรมของอิมิพรามีน และเดซิพรามีน ที่ดี และได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบได้เท่ากับ 4 นนค./มล. ซึ่งมากกว่า การใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต ถึง 10 เท่า ดังนั้นการใช้ดีเทคเตอร์ อีซี จึงสามารถเพิ่มความไวในการวิเคราะห์อิมิพรามีน และเดซิพรามีนได้ ส่วนการวิเคราะห์อิมิทรูปทีลินและนอร์ทรูปทีลินไม่สามารถใช้ ดีเทคเตอร์ อีซีได้ดังได้กล่าวไว้แล้วในขั้นตอนที่ 1 ข้อ 1.3

สรุป สภาวะ HPLC ในการวิเคราะห์อิมิพรามีนและเดซิพรามีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์ อีซี

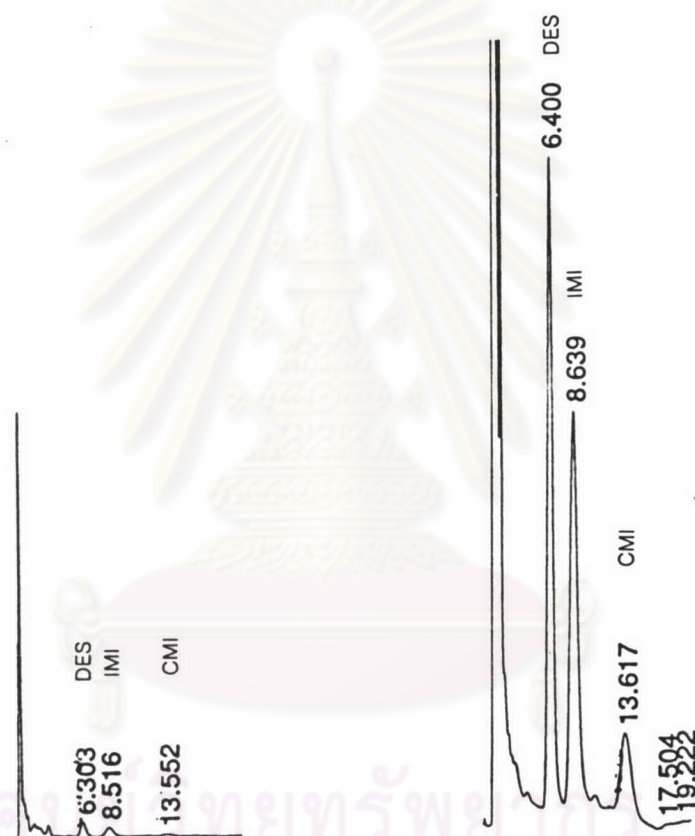
คอลัมน์	: LiChrospher <sup>(R)</sup> 60 RP-select B 5 $\mu$ m, 125x5.0 mm., i.d
โมบายเฟส	: แอซีโตไนไตรล์ : บัฟเฟอร์ฟอสเฟต 70มิลลิโมลาร์ pH 6.1
(อัตราส่วนโดยปริมาตร)	: (60:40)
อัตราการไหล	: 1.0 มล/นาที
ดีเทคเตอร์	: EC, applied voltage +1.0 volt, range 0.2 $\mu$ A, filter 0.5 Hz



รูปที่ 19 โคโรมาโตแกรมของอิมิพรามีน และเดซิพรามีน ที่ความเข้มข้น 1 มคก/มล เมื่อใช้ ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต และดีเทคเตอร์ฟลูออโร

(ก) โคโรมาโตแกรมของตัวอย่างพลาสติกมาตรฐานเมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต

(ข) โคโรมาโตแกรมของตัวอย่างพลาสติกมาตรฐานเมื่อใช้ดีเทคเตอร์ฟลูออโร

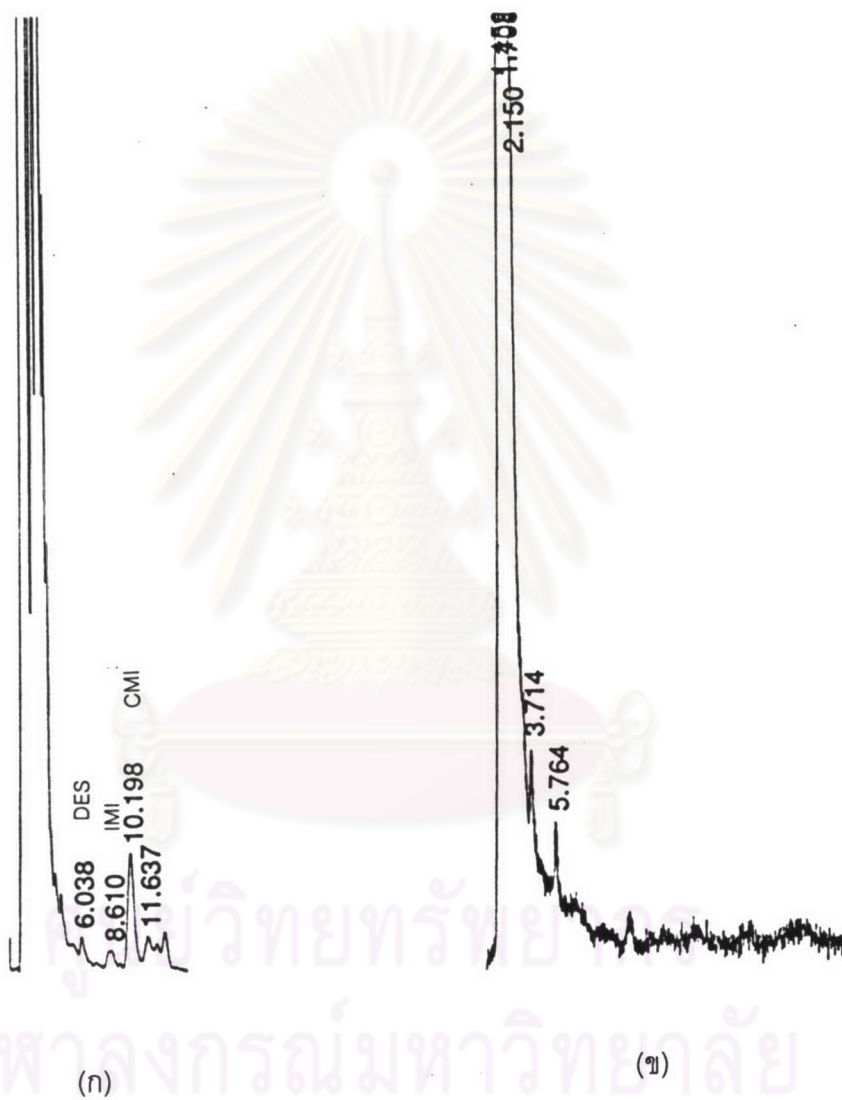


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 20 โคโรมาโตแกรมของอิมิพรามีน และเดซิพรามีน ที่ความเข้มข้น 1 มก/มล เมื่อใช้ ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต และดีเทคเตอร์ อีซี

(ก) โคโรมาโตแกรมของตัวอย่างพลาสติกมาตรฐานเมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต

(ข) โคโรมาโตแกรมของตัวอย่างพลาสติกมาตรฐานเมื่อใช้ดีเทคเตอร์ อีซี



- รูปที่ 21 โคโรมาโตแกรมของอิมิพรามิน และเดซิพรามิน ที่ความเข้มข้น 40 นนก/มล เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต และดีเทคเตอร์ฟลูออโร
- (ก) โคโรมาโตแกรมของตัวอย่างพลาสติกมาตรฐานเมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต
- (ข) โคโรมาโตแกรมของตัวอย่างพลาสติกมาตรฐานเมื่อใช้ดีเทคเตอร์ฟลูออโร

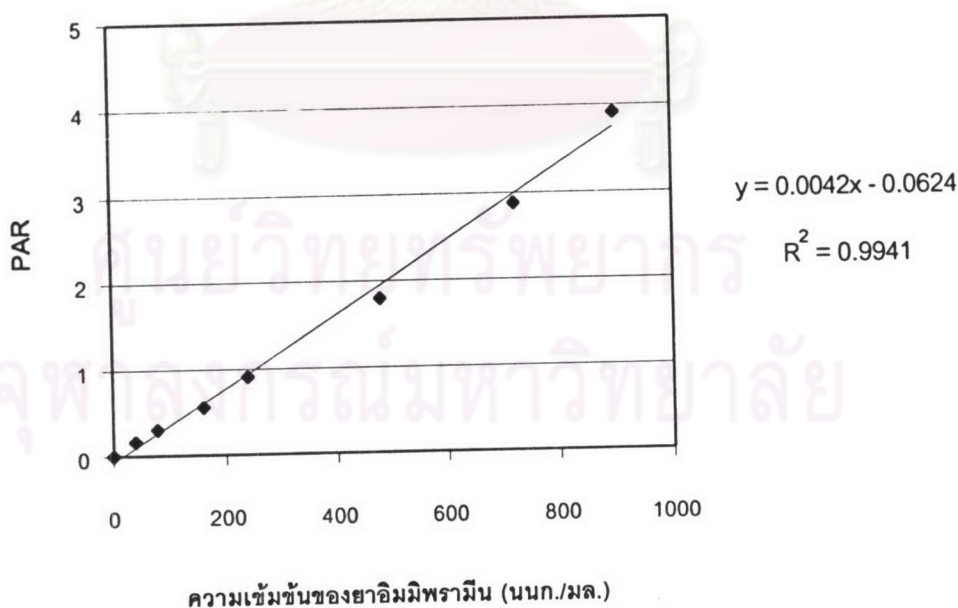
## ขั้นตอนที่ 4 การยืนยันการใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Validation) อิมิพรามิน, เดซิพรามิน, อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน

### 4.1 การยืนยันการใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์อิมิพรามิน และเดซิพรามิน

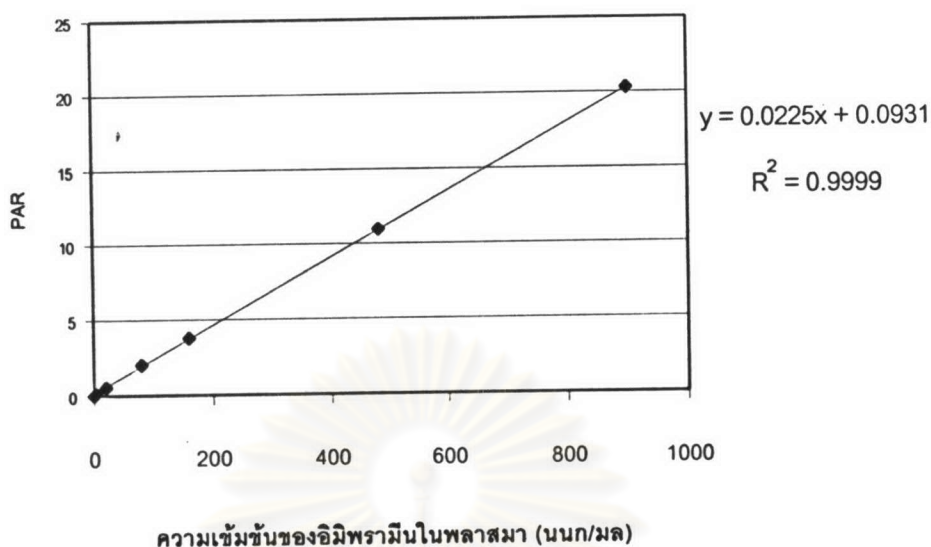
#### 4.1.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้พีคของตัวยากับสารมาตรฐานภายในและความเข้มข้นของยาในพลาสมา

อิมิพรามิน และเดซิพรามินแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้พีคของยากับ IS (PAR) และความเข้มข้นของยาในพลาสมา แสดงในรูปของสมการเส้นตรง  $PAR = \text{intercept} + \text{slop}(X)$  และเส้นกราฟที่ได้แสดงในรูป 22 ถึง 25 ของอิมิพรามินเมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต คือ  $PAR = 0.0042X - 0.0624$  และเมื่อใช้ดีเทคเตอร์ฟลูออโรเมตริกคือ  $PAR = 0.0225X + 0.0931$  ของเดซิพรามินเมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ตคือ  $PAR = 0.0042X - 0.0699$  และเมื่อใช้ดีเทคเตอร์ฟลูออโรเมตริกคือ  $PAR = 0.0296X - 0.0687$  โดยมีการยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง PAR และความเข้มข้นของยาดังตารางที่ 8 ถึง 11

##### 4.1.1.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของอิมิพรามิน



รูปที่ 22 กราฟเทียบมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง PAR และความเข้มข้นของอิมิพรามินในพลาสมา เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต



รูปที่ 23 กราฟเทียบมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง PAR และความเข้มข้นของอิมิพรามินในพลาสมา เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อีซี

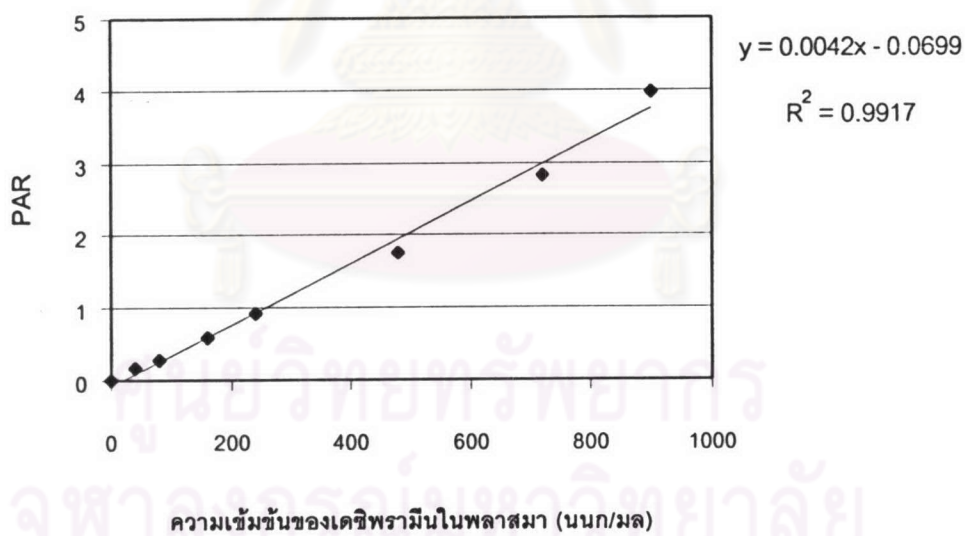
ตารางที่ 8 การยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง PAR และความเข้มข้นของอิมิพรามินในพลาสมา ในรูปของ %RSD ของความชัน และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต

สมการที่	ความชัน	$R^2$
1	0.0042	0.9941
2	0.0042	0.9995
3	0.0039	0.9973
ค่าเฉลี่ย	0.0041	0.9970
SD	0.0002	0.0027
%RSD	4.22	0.27

ตารางที่ 9 การยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง PAR และความเข้มข้นของอิมิพรามินใน พลาสมาในรูปของ %RSD ของความชัน และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) เมื่อใช้ ดีเทคเตอร์อีซี

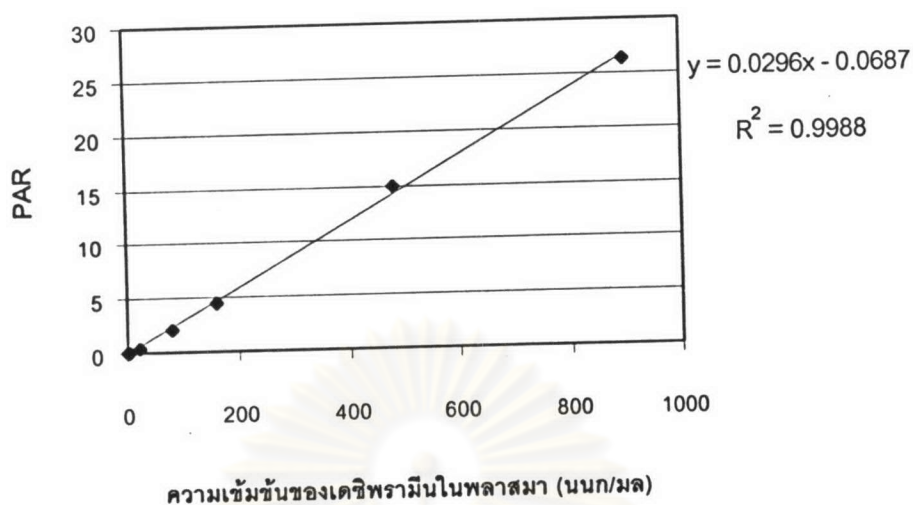
สมการที่	ความชัน	$R^2$
1	0.0225	0.9999
2	0.0252	0.9995
3	0.0233	0.9999
ค่าเฉลี่ย	0.0237	0.9998
SD	0.0014	0.0002
%RSD	5.86	0.02

#### 4.1.1.2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของเดซิพรามิน



รูปที่ 24 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง PAR และความเข้มข้นของยาอิมิพรามินใน พลาสมา เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต





รูปที่ 25 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง PAR และความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในพลาสมา เมื่อใช้ดีเทคเตอร์ อีซี

ตารางที่ 10 การยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง PAR และความเข้มข้นของคลอโรฟิลล์ในพลาสมา ในรูปของ %RSD ของความชัน และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต

สมการที่	ความชัน	$R^2$
1	0.0042	0.9917
2	0.0044	0.9989
3	0.0042	0.9978
ค่าเฉลี่ย	0.0043	0.9961
SD	0.0001	0.0039
%RSD	4.93	0.39

ตารางที่ 11 การยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง PAR และความเข้มข้นของเดซิฟรามีนในพลาสมา ในรูปของ %RSD ของความชัน และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อีซี

สมการที่	ความชัน	$R^2$
1	0.0296	0.9988
2	0.0296	0.9999
3	0.0326	0.9995
ค่าเฉลี่ย	0.0306	0.9994
SD	0.0017	0.0006
%RSD	5.66	0.06

%RSD ของความชันของสมการเส้นตรงที่ได้ ทั้งที่ใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต และอีซี มีค่าไม่เกิน 15% ดังนั้นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงนี้สามารถใช้เป็นกราฟเทียบมาตรฐานของอิมิพรามินและเดซิฟรามีนได้

#### 4.1.2 ความไวของวิธีวิเคราะห์

ความไวของวิธีวิเคราะห์แสดงในรูปการกำหนดขีดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ โดยค่าที่ได้ของอิมิพรามิน และเดซิฟรามีนเมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต คือ 40 นนก/มล โดยค่า %Bias เฉลี่ยเท่ากับ -2.36 และ -2.38 ตามลำดับ และมีค่า %RSD ของความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ของอิมิพรามิน และ เดซิฟรามีน เท่ากับ 8.15 และ 8.25 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 12

เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อีซี ค่าที่ได้ของอิมิพรามิน และเดซิฟรามีนคือ 4 นนก/มล โดยมีค่า %Bias เฉลี่ยเท่ากับ -2.36 และ -2.38 ตามลำดับ และค่า %RSD ของความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ของอิมิพรามิน และ เดซิฟรามีน เท่ากับ 7.53 และ 10.19 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 13

ดังนั้นความไวของวิธีวิเคราะห์อิมิพรามิน และเดซิฟรามีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อีซี ได้ขีดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณเท่ากับ 4 นนก/มล ซึ่งมากกว่าเมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ตถึง 10 เท่า เป็นการยืนยันการเพิ่มความไวของการวิเคราะห์เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อีซี

ตารางที่ 12 ความไวของวิธีวิเคราะห์อิมิพรามีน และเดซิพรามีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัตราไวโอเลต

ตัวอย่าง	อิมิพรามีน		เดซิพรามีน	
	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (นกก/มล)	%Bias	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (นกก/มล)	%Bias
1	43.79	+9.47	42.08	+5.20
2	40.44	+1.10	42.42	+6.05
3	44.00	+10.00	47.42	+18.55
4	44.97	+12.42	41.08	+2.70
5	36.97	-7.58	40.92	+2.30
6	38.06	-4.85	36.69	-8.27
ค่าเฉลี่ย	41.37	+3.43	41.77	+4.42
SD	3.37	-	3.45	-
%RSD	8.15	-	8.25	-

ตารางที่ 13 ความไวของวิธีวิเคราะห์อิมิพรามีน และเดซิพรามีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์วิธี

ตัวอย่าง	อิมิพรามีน		เดซิพรามีน	
	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (นกก/มล)	%Bias	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (นกก/มล)	%Bias
1	3.78	-5.50	4.08	+2.00
2	4.31	+7.75	4.08	+2.00
3	3.66	-8.50	3.42	-14.50
4	4.13	+3.25	3.38	-15.50
5	4.00	0.00	4.26	+6.50
6	3.54	-11.50	4.21	+5.25
ค่าเฉลี่ย	3.90	-2.36	3.90	-2.38
SD	0.29	-	0.40	-
%RSD	7.53	-	10.19	-

#### 4.1.3 การศึกษาประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่าง

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมามาตรฐานที่เดิมสารมาตรฐานอิมพิรามีน และ เดซิพรามีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต ได้ค่า %การคืนกลับเฉลี่ยเท่ากับ 83.00% และ 83.64% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 14,16 เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อีซี ได้ค่า%การคืนกลับเฉลี่ยเท่ากับ 80.17% และ 86.66% ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 15,17

ค่า %การคืนกลับ จากการศึกษาเป็นการยืนยันว่า วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนร่วมกับการเติมสารประกอบอินทรีย์ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และสามารถใช้วิเคราะห์อิมพิรามีน และเดซิพรามีนในพลาสมาได้

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่างของอิมพิรามีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต

ความเข้มข้น (นกก./มล.)	%การคืนกลับ						ค่าเฉลี่ย (SD)
	1	2	3	4	5	6	
80	90.10	90.66	79.34	77.89	75.20	72.15	80.89 (7.75)
160	74.18	76.98	83.40	84.85	81.32	83.33	80.68 (4.20)
480	90.56	85.99	88.63	87.09	90.06	82.21	87.42 (3.08)
						ค่าเฉลี่ยรวม (SD)	83.00 (3.83)

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่างของอิมพิรามีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อีซี

ความเข้มข้น (นกก./มล.)	%การคืนกลับ						ค่าเฉลี่ย (SD)
	1	2	3	4	5	6	
80	84.62	88.85	86.99	83.79	85.04	76.57	84.31 (4.21)
160	78.58	75.08	72.95	73.76	72.16	78.88	75.24 (2.88)
480	83.96	77.74	81.90	80.73	76.69	84.68	80.95 (3.23)
						ค่าเฉลี่ยรวม (SD)	80.17 (4.58)

ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่างของเดซิพรามิน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเลต

ความเข้มข้น (นกก./มล.)	%การคืนกลับ						ค่าเฉลี่ย (SD)
	1	2	3	4	5	6	
80	76.89	86.82	81.90	84.54	83.08	85.47	83.12 (3.51)
160	90.40	82.38	82.66	82.35	83.86	80.60	83.71 (3.44)
480	90.27	80.41	82.81	84.49	85.09	81.51	84.10 (3.50)
						ค่าเฉลี่ยรวม (SD)	83.64 (0.49)

ตารางที่ 17 ประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่างของเดซิพรามิน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อีซี

ความเข้มข้น (นกก./มล.)	%การคืนกลับ						ค่าเฉลี่ย (SD)
	1	2	3	4	5	6	
80	84.76	91.36	89.61	90.95	82.45	81.71	86.81 (4.36)
160	89.47	87.92	84.78	86.53	86.72	88.08	87.25 (1.61)
480	85.96	84.30	83.70	87.30	85.41	88.93	85.93 (1.94)
						ค่าเฉลี่ยรวม (SD)	86.66 (0.67)

#### 4.1.4 ความถูกต้องและความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy and precision)

##### 4.1.4.1. ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมามาตรฐาน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเลต ได้ค่า %Bias อยู่ระหว่าง -2.96 ถึง +5.43 และ -0.70 ถึง +9.44 ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 18, 20

เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อีซี ได้ค่า %Bias อยู่ระหว่าง -8.56 ถึง +0.81 และ -7.22 ถึง +5.78 ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 19, 21

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นดังแสดงในตารางที่ 18 ถึง 21

ค่า %Bias ของอิมิพรามีนและเดซิพรามีน ทั้งที่ใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต และ อีซี เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้ แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ยา อิมิพรามีน และ เดซิพรามีน มีความถูกต้องมากพอที่จะนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาต่อไปได้

ตารางที่ 18 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของอิมิพรามีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต

ความเข้มข้น (นนก/มล)	%Bias						ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	
80	+3.42	+5.86	+2.24	-1.08	+11.08	+10.54	+5.34
160	-3.11	-7.16	-2.51	-6.46	+2.31	-0.82	-2.96
240	+3.47	+1.18	-3.88	-9.92	-5.70	-6.02	-3.48
480	-8.43	-0.57	-2.96	+0.08	-4.69	-7.76	-4.06

ตารางที่ 19 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของอิมิพรามีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อีซี

ความเข้มข้น (นนก/มล)	%Bias						ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	
20	-8.85	-8.25	-10.05	-13.85	-3.45	-6.90	-8.56
80	-4.97	+2.52	-6.32	-4.97	-9.06	-10.22	-5.50
160	-7.59	-5.34	-1.50	+1.54	-11.88	+3.89	-3.48
480	-4.59	-3.66	-4.30	+7.47	+1.68	+4.51	+0.81

ตารางที่ 20 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของเดซิพรามีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเล็ต

ความเข้มข้น (นนก/มล)	%Bias						ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	
80	+6.94	+10.36	+8.36	+6.79	+13.12	+11.10	+9.44
160	-2.26	+7.49	+6.46	-5.34	+7.54	+0.43	+2.39
240	+3.49	+8.42	+4.45	+7.26	+10.15	-0.18	+5.49
480	-1.39	-1.33	-3.80	+4.03	+0.69	-2.42	-0.70

ตารางที่ 21 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของเดซิพรามีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อีซี

ความเข้มข้น (นกก/มล)	%Bias						ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	
20	-4.00	-2.85	-3.75	+11.00	-6.15	-0.15	-0.98
80	-7.55	-2.69	-5.94	-12.10	-5.49	-9.54	-7.22
160	+1.06	+2.97	+8.81	+10.76	-1.91	+12.98	+5.78
480	-7.80	-4.99	-7.30	+5.93	+0.13	+2.24	-1.96

4.1.4.2. ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน

การวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกมาตรฐานที่เติมอิมิพรามีน และเดซิพรามีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเลต ได้ค่า %RSD อยู่ระหว่าง 3.64 ถึง 5.14 และ 2.30 ถึง 5.43 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 22,24

สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกมาตรฐาน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อีซี ได้ค่า %RSD อยู่ระหว่าง 3.76 ถึง 6.12 และ 3.56 ถึง 6.24 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 23,25

4.2.4.3. ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน

การวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกมาตรฐานของอิมิพรามีน และเดซิพรามีนเมื่อใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 4 วัน ได้ค่า %RSD อยู่ระหว่าง 4.05 ถึง 5.79 และ 2.98 ถึง 5.16 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 26,28 แต่เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อีซี ได้ค่า %RSD อยู่ระหว่าง 3.70 ถึง 7.89 และ 1.69 ถึง 3.92 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 27,29

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ ทั้งการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน และเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน มีค่า %RSD ไม่เกิน 15 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์อิมิพรามีน และเดซิพรามีนในพลาสติก ทั้งการใช้ดีเทคเตอร์อัลตราไวโอเลต และ อีซี สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์อิมิพรามีน และเดซิพรามีนในพลาสติกวันเดียวกัน หรือวันอื่นๆ ได้ผลแบบเดียวกัน

ตารางที่ 22 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันของอิมิพรามิน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์ อัลตราไวโอเลต

ความเข้มข้น (นนก/มล)	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (นนก/มล)						ค่าเฉลี่ย (SD)	%RSD
	1	2	3	4	5	6		
80	88.86	88.43	82.74	84.69	81.79	79.14	84.28 (3.83)	4.54
160	155.02	148.55	155.98	149.67	163.69	158.69	155.27 (5.65)	3.64
240	248.33	242.83	230.69	216.19	226.33	225.55	231.65 (11.90)	5.14
480	439.55	477.26	465.81	480.40	457.48	442.74	460.54 (11.14)	3.72

ตารางที่ 23 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันของอิมิพรามิน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อีซี

ความเข้มข้น (นนก/มล)	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (นนก/มล)						ค่าเฉลี่ย (SD)	%RSD
	1	2	3	4	5	6		
20	18.23	18.35	17.99	17.23	19.31	18.62	18.29 (0.69)	3.76
80	76.02	82.02	74.94	76.02	72.75	71.82	75.59 (3.59)	4.75
160	147.86	151.45	157.60	162.47	141.00	166.23	154.43 (9.45)	6.12
480	457.96	462.43	459.38	515.84	488.07	501.67	480.89 (14.63)	5.12



ตารางที่ 24 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันของเดซิพราซีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์ อัลตราไวโอเลต

ความเข้มข้น (นกก/มล)	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (นกก/มล)						ค่าเฉลี่ย (SD)	%RSD
	1	2	3	4	5	6		
80	85.55	88.29	90.50	88.88	86.69	85.43	87.56 (2.01)	2.30
160	156.38	171.98	170.33	151.45	172.07	160.69	163.82 (8.89)	5.43
240	248.38	260.21	250.67	257.43	264.36	238.05	253.18 (9.49)	3.75
480	473.33	173.60	461.78	499.33	483.31	468.36	476.62 (13.18)	2.77

ตารางที่ 25 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันของเดซิพราซีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์วิธีสี

ความเข้มข้น (นกก/มล)	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (นกก/มล)						ค่าเฉลี่ย (SD)	%RSD
	1	2	3	4	5	6		
20	19.20	19.43	19.25	22.20	18.77	19.97	19.80 (1.24)	6.24
80	73.96	77.85	75.25	70.32	75.61	72.37	74.23 (2.64)	3.56
160	161.70	164.75	174.09	177.21	156.94	180.76	169.24 (9.47)	5.59
480	442.55	456.05	444.94	508.46	480.63	490.76	470.56 (13.82)	5.70

ตารางที่ 26 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันของอิมิพรามีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์ อัลตราไวโอเลต (n=24)

ความเข้มข้น (นกก/มล)	ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (นกก/มล) (SD)					%RSD
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
80	86.33 (5.11)	84.28 (3.83)	84.47 (2.53)	75.64 (4.74)	82.68 (4.78)	5.79
160	170.09 (5.76)	155.27 (5.65)	172.56 (7.32)	156.07 (3.43)	163.50 (9.10)	5.57
240	252.77 (8.76)	231.65 (11.90)	244.43 (6.13)	252.64 (8.56)	245.37 (9.94)	4.05
480	476.42 (14.14)	460.54 (14.17)	488.35 (9.30)	511.08 (14.05)	484.10 (14.29)	4.40

ตารางที่ 27 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันของอิมิพรามีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์วิธีซี (n=24)

ความเข้มข้น (นกก/มล)	ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (นกก/มล) (SD)					%RSD
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
20	21.04 (1.16)	18.29 (0.69)	20.38 (1.44)	19.83 (1.83)	19.88 (1.17)	5.90
80	87.39 (4.31)	75.59 (3.59)	77.11 (6.57)	87.59 (2.09)	81.92 (6.46)	7.89
160	168.96 (6.92)	154.43 (9.45)	160.98 (10.76)	160.31 (13.62)	161.17 (5.97)	3.70
480	477.41 (12.81)	480.89 (14.63)	520.47 (13.57)	462.16 (11.83)	485.23 (14.86)	5.12

ตารางที่ 28 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันของเดซิพรามีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์ อัลตราไวโอเลต (n=24)

ความเข้มข้น (นนก/มล)	ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (นนก/มล) (SD)					%RSD
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
80	89.68 (2.51)	87.56 (2.01)	86.96 (2.68)	82.39 (5.36)	86.65 (3.07)	3.54
160	153.94 (4.77)	163.82 (8.89)	174.66 (3.43)	163.58 (6.32)	164.00 (8.47)	5.16
240	247.34 (6.64)	253.18 (9.49)	252.74 (8.37)	267.23 (5.02)	255.12 (8.50)	3.33
480	507.99 (14.82)	476.62 (13.18)	499.55 (5.54)	508.14 (13.14)	498.08 (14.86)	2.98

ตารางที่ 29 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันของเดซิพรามีน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์รีซีซี (n=24)

ความเข้มข้น (นนก/มล)	ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (นนก/มล) (SD)					%RSD
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
20	19.23 (1.06)	19.80 (1.24)	20.01 (2.09)	19.77 (1.97)	19.70 (0.33)	1.69
80	78.35 (4.83)	74.23 (2.64)	81.39 (3.93)	76.37 (3.82)	77.58 (3.04)	3.92
160	156.80 (7.27)	169.24 (9.47)	166.00 (10.38)	167.32 (12.42)	164.84 (5.52)	3.35
480	508.30 (13.81)	470.56 (13.82)	468.64 (12.57)	480.04 (13.03)	481.88 (18.30)	3.80

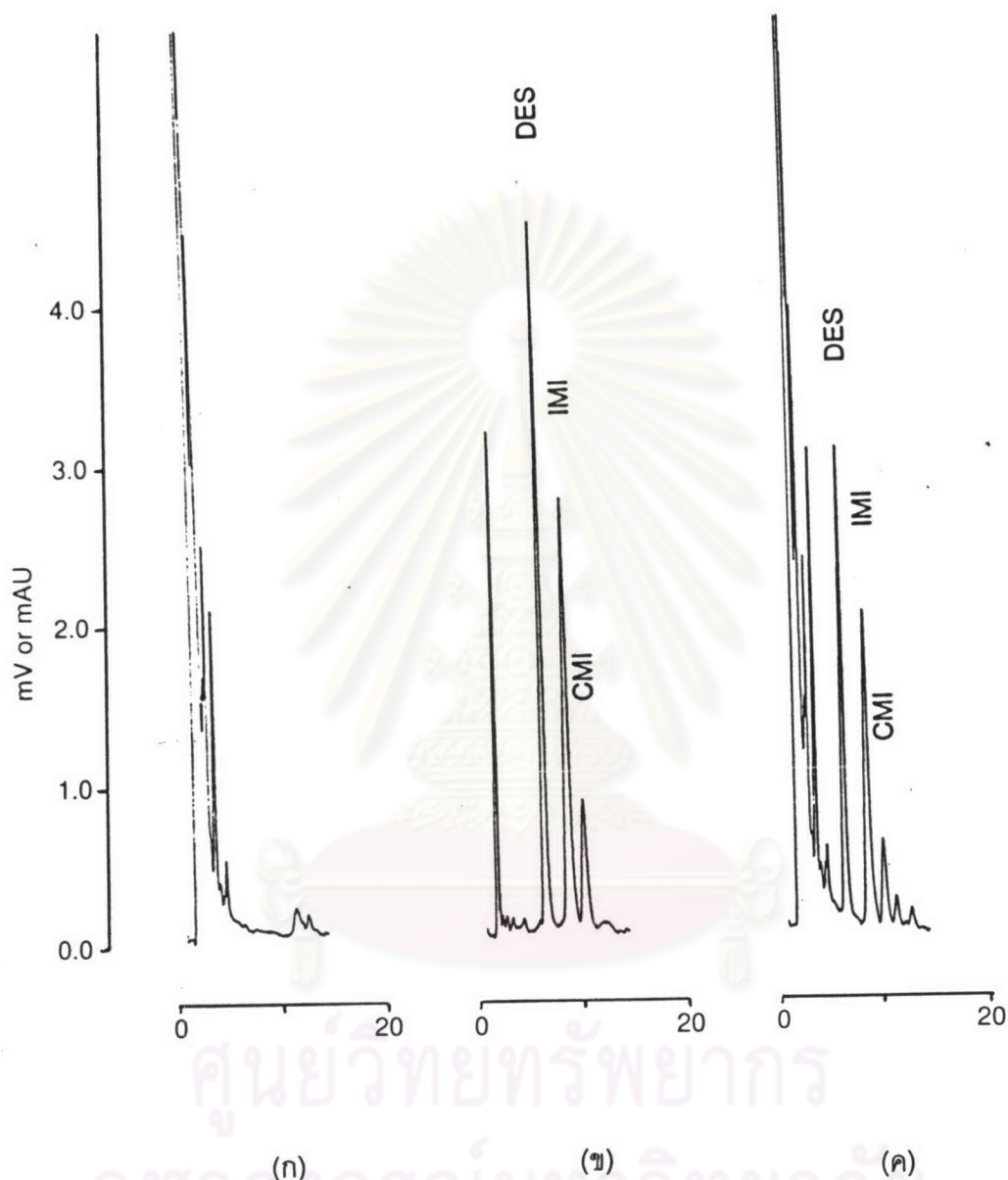
#### 4.1.5. ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

จากการวิเคราะห์อิมิพรามิน, เดซิพรามิน และ โคลมิพรามิน ในสารละลาย และตัวอย่าง พลาสมามาตรฐาน ที่เติมยาที่ความเข้มข้น 900 นนก/มล เปรียบเทียบกัน เมื่อใช้ดีเทคเตอร์ อัลตราไวโอเลตพบว่าได้ค่าเวลานั่งงเหี่ยวในคอลัมน์เท่ากับ 8.59, 6.12 และ 10.27 นาที ดังแสดงในรูปที่ 26 และเมื่อเปรียบเทียบกับแบลงค์พลาสมา ไม่พบมีการรบกวนจาก endogenous substance และสารใดๆ

เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อีซี ค่าเวลานั่งงเหี่ยวในคอลัมน์ของอิมิพรามิน, เดซิพรามิน และ โคลมิพรามิน ในตัวอย่างพลาสมามาตรฐานเท่ากับ 8.25, 6.21 และ 12.92 ตามลำดับและเมื่อเปรียบเทียบกับแบลงค์พลาสมา กับตัวอย่างพลาสมามาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 27 และเทียบกับตัวอย่างพลาสมาจากอาสาสมัคร ไม่พบมีการรบกวนจาก endogenous substance และสารใดๆ ดังแสดงในรูปที่ 27



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

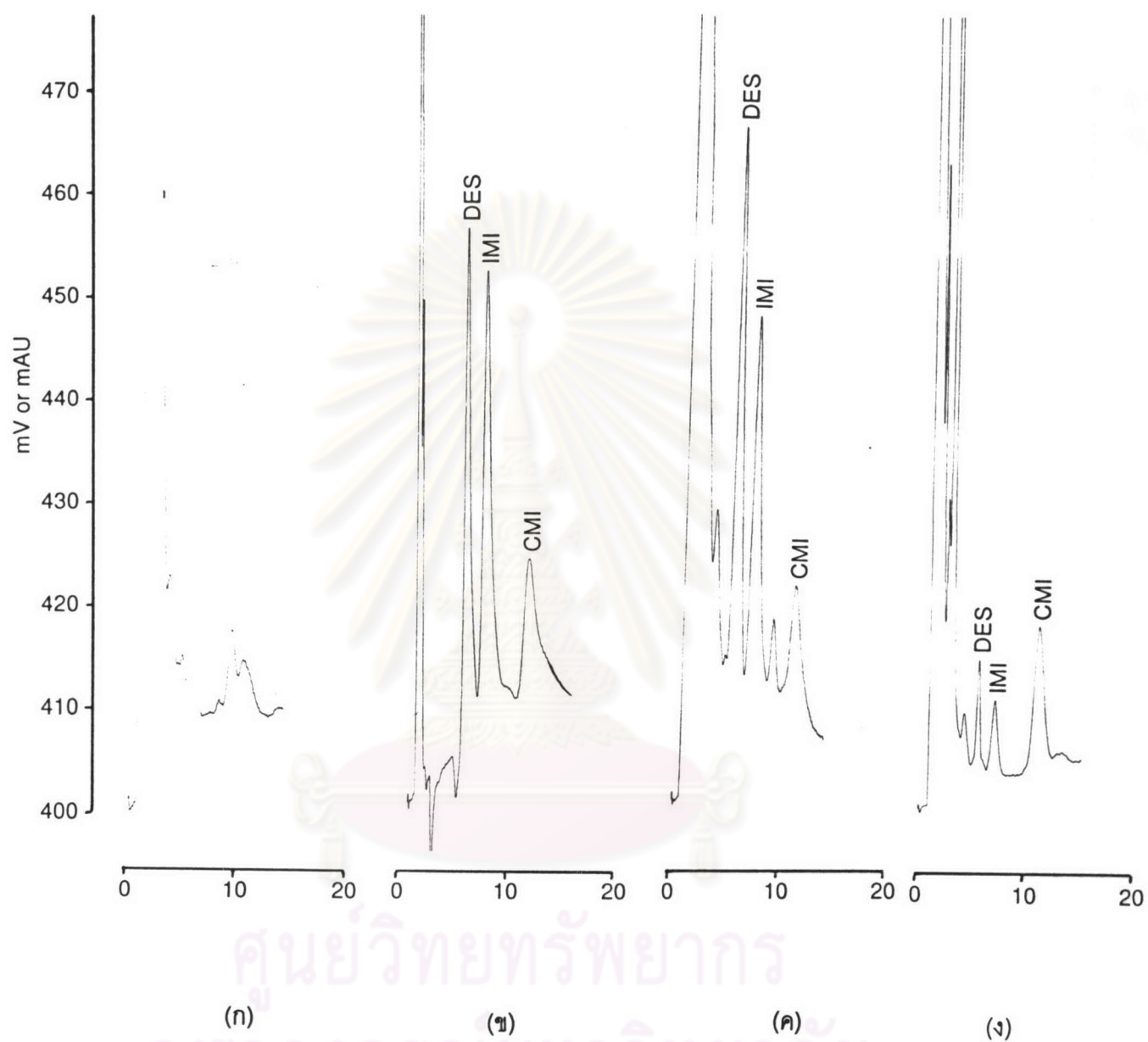


รูปที่ 26 โครมาโตแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ เมื่อใช้ดีเทคเตอร์  
อัลตราไวโอเล็ต

(ก) แบลงค์พลาสมา

(ข) อิมิพรามีนและเดซิพรามีนในสารละลาย ที่ความเข้มข้น 900 นนก/มล

(ค) อิมิพรามีนและเดซิพรามีนในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 900 นนก/มล



รูปที่ 27 โครมาโตแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ เมื่อใช้ดีเทคเตอร์อีซี

- (ก) แบลงค์พลาสมา
- (ข) อิมิพรามินและเดซิพรามินในสารละลาย ที่ความเข้มข้น 80 นนก/มล
- (ค) อิมิพรามินและเดซิพรามินในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 80 นนก/มล
- (ง) อิมิพรามิน และเดซิพรามินในตัวอย่างพลาสมาของอาสาสมัคร

#### 4.1.6 การศึกษาความคงตัว (Stability)

##### 4.1.6.1 ความคงตัวของตัวอย่างพลาสมาที่อุณหภูมิห้อง

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมามาตรฐานที่มีอิมิพรามิน และเดซิพรามิน ที่ความเข้มข้น 80 และ 480 นนก./มล ทั้ง 3 ตัวอย่าง พบว่าเมื่อครบ 12 ชั่วโมง ตัวอย่างพลาสมา มาตรฐานของทั้งสองความเข้มข้น มีค่า %difference ไม่เกิน  $\pm 5\%$  ดังแสดงในตารางที่ 30,31

ดังนั้นสามารถวางตัวอย่างพลาสมาที่มีอิมิพรามิน และเดซิพรามิน ไว้ในห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 12 ชั่วโมง

##### 4.1.6.2 ความคงตัวของตัวอย่างพลาสมาเมื่อผ่านรอบการแช่แข็งและละลาย

ค่า %difference ของยาอิมิพรามิน และเดซิพรามิน ที่ความเข้มข้น 80 และ 480 นนก./มล. ทั้ง 3 ตัวอย่าง เมื่อผ่าน freeze-thaw cycle ครบ 3 รอบ พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง -2.47 ถึง +4.83 และ -1.76 ถึง +4.23 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 32,33

ดังนั้นตัวอย่างพลาสมาที่มีอิมิพรามิน และเดซิพรามิน ในพลาสมา สามารถนำเข้าออกจากตู้แช่แข็งได้ถึง 3 รอบ

##### 4.1.6.3 ความคงตัวของตัวอย่างพลาสมาที่สภาวะการเก็บรักษา (-48°C)

ค่า %difference ของอิมิพรามิน และเดซิพรามิน เมื่อครบ 30 วัน อยู่ในช่วง -5.47 ถึง +2.55 และ -5.01 ถึง +2.56 ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน  $\pm 10\%$  ดังแสดงในตารางที่ 34,35

ดังนั้นยาอิมิพรามิน และเดซิพรามินในพลาสมา สามารถเก็บไว้ได้ถึง 30 วัน ที่อุณหภูมิ -48°C

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 30 ความคงตัวของอิมิพรามินในพลาสติก ที่อุณหภูมิห้อง

เวลา (ชั่วโมง)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 80 นนก/มล			ความเข้มข้น 480 นนก/มล		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	-1.58	-1.42	-0.89	+1.76	+2.83	+1.13
6	-2.21	-2.53	-4.26	-2.58	-1.95	-3.41
9	-2.54	-2.40	-3.62	-1.83	+3.96	-2.80
12	-2.35	+1.24	-0.63	-4.72	-1.68	-3.76

ตารางที่ 31 ความคงตัวของเดซิพรามินในพลาสติก ที่อุณหภูมิห้อง

เวลา (ชั่วโมง)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 80 นนก/มล			ความเข้มข้น 480 นนก/มล		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	-3.14	-1.25	-4.84	-0.44	+2.72	+1.20
6	-3.88	-2.65	-3.11	+1.73	+3.05	+1.46
9	-2.72	-3.69	-2.12	-2.99	-1.14	+0.69
12	-4.62	-2.82	-0.98	-2.57	-1.01	-5.08

ตารางที่ 32 ความคงตัวของอิมิพรามินในพลาสติก ที่ freeze-thaw cycle

รอบ	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 80 นนก/มล			ความเข้มข้น 480 นนก/มล		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	+4.67	+1.58	+4.83	-0.44	-0.60	-2.47



ตารางที่ 33 ความคงตัวของเดซิฟราซีนในพลาสติก ที่ freeze-thaw cycle

รอบ	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 80 นนก/มล			ความเข้มข้น 480 นนก/มล		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	+2.23	+4.23	+2.05	+0.92	-1.76	-0.89

ตารางที่ 34 ความคงตัวของอิมิพราซีนในพลาสติก ที่สภาวะการเก็บรักษา -48°C

วันที่ (วัน)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 80 นนก/มล			ความเข้มข้น 480 นนก/มล		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	+2.55	-0.45	-5.47	+1.01	+0.27	-1.89
30	-0.17	+2.30	-0.16	-0.91	-0.77	+0.07

ตารางที่ 35 ความคงตัวของเดซิฟราซีนในพลาสติก ที่สภาวะการเก็บรักษา -48°C

วันที่ (วัน)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 80 นนก/มล			ความเข้มข้น 480 นนก/มล		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	-2.20	-2.20	-0.04	+0.40	-1.17	-0.06
30	-0.72	-5.01	-4.14	+0.07	+2.56	-0.69

#### 4.1.6.4 ความคงตัวของตัวอย่างเมื่ออยู่ใน autosampler

การวิเคราะห์ตัวอย่างที่อยู่ใน autosampler ที่อุณหภูมิ 4°C ภายใน 24 ชั่วโมง ไม่พบค่าความเข้มข้นใดมีความแปรปรวนมากกว่า 4% ดังแสดงในตารางที่ 36,37

ดังนั้นตัวอย่างพลาสติกที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างแล้ว เมื่ออยู่ใน autosampler ที่อุณหภูมิ 4°C สามารถคงตัวได้ถึง 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 36 ความคงตัวของตัวอย่างอิมิพรามินเมื่ออยู่ใน autosampler ที่ 4°C

เวลา (ชั่วโมง)	%difference (n=3)								
	ความเข้มข้น 80 นนก/มล			ความเข้มข้น 160 นนก/มล			ความเข้มข้น 480 นนก/มล		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	-0.89	+3.42	-1.40	+2.23	0.00	+1.69	-0.18	-2.45	-0.93
12	+1.16	+1.47	-0.39	-0.44	-0.68	+1.35	-0.78	-0.14	+0.50
18	+0.54	0.00	-2.41	+0.04	+0.45	+1.17	+0.10	-1.30	-1.06
24	+1.48	+0.44	-0.34	+0.54	+2.02	+1.02	-0.93	-0.82	+0.69

ตารางที่ 37 ความคงตัวของตัวอย่างเดซิพรามินเมื่ออยู่ใน autosampler ที่ 4°C

เวลา (ชั่วโมง)	%difference (n=3)								
	ความเข้มข้น 80 นนก/มล			ความเข้มข้น 160 นนก/มล			ความเข้มข้น 480 นนก/มล		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	-0.21	+2.94	-1.77	+2.94	+1.10	-0.59	+0.18	-2.65	-0.67
12	+1.73	+2.20	+0.88	-2.79	-0.33	-1.28	+2.25	+3.40	+1.63
18	-2.96	+1.18	+1.77	+0.52	+0.11	-0.37	+1.71	+1.93	+2.66
24	-0.43	+0.59	+0.59	-0.18	+1.14	+0.10	+0.66	-0.96	+0.22

#### 4.1.6.5. ความคงตัวของสารละลายมาตรฐานและสารมาตรฐานภายใน

##### 4.1.6.5.1. ความคงตัวของสารละลายมาตรฐานอิมิพรามิน

ค่า %difference เมื่อครบ 28 วัน หรือ 4 สัปดาห์ ของอิมิพรามินอยู่ระหว่าง -3.48 ถึง +4.89 ดังนั้น สารละลายมาตรฐานของอิมิพรามินมีความคงตัวได้ถึง 28 วัน เมื่อเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4°C ดังแสดงในตารางที่ 38

##### 4.1.6.5.2. ความคงตัวของสารละลายมาตรฐานเดซิพรามิน

ค่า %difference เมื่อครบ 28 วัน ของเดซิพรามิน อยู่ระหว่าง -4.79 ถึง +3.78 ดังนั้น สารละลายมาตรฐานของเดซิพรามินมีความคงตัวได้ถึง 28 วัน เมื่อเก็บไว้ในตู้เย็น ดังแสดงในตารางที่ 38

##### 4.1.6.5.3. ความคงตัวของสารละลายมาตรฐานโคลมิพรามิน

ค่า %difference เมื่อครบ 28 วัน ของโคลมิพรามินอยู่ระหว่าง -3.16 ถึง +4.75 ดังนั้น สารละลายมาตรฐานของโคลมิพรามินมีความคงตัวได้ถึง 28 วัน เมื่อเก็บไว้ในตู้เย็น ดังแสดงในตารางที่ 38

แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้จะเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่ทุก 2 สัปดาห์

ตารางที่ 38 ความคงตัวของสารละลายมาตรฐานอิมิพรามิน,เดซิพรามิน และ โคลมิพรามิน

วัน	%difference (n=3)								
	อิมิพรามิน			เดซิพรามิน			โคลมิพรามิน		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	-1.91	-2.37	-3.48	-3.28	-3.17	-1.78	-2.91	-0.63	-3.16
14	+1.16	+1.47	+0.93	-4.79	+1.86	-3.45	+3.89	+1.06	+3.38
21	+2.35	+3.74	+4.89	+3.66	+3.14	+3.78	+3.76	+3.89	+4.75
28	-3.08	-0.75	-0.81	-1.83	-0.40	-0.38	+2.48	+0.44	+3.50

สรุปผลการยืนยันการใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สำหรับอิมิพรามิน และเดซิพรามิน ทั้งการใช้ดีเทคเตอร์ อัลตราไวโอเลต และอีซี

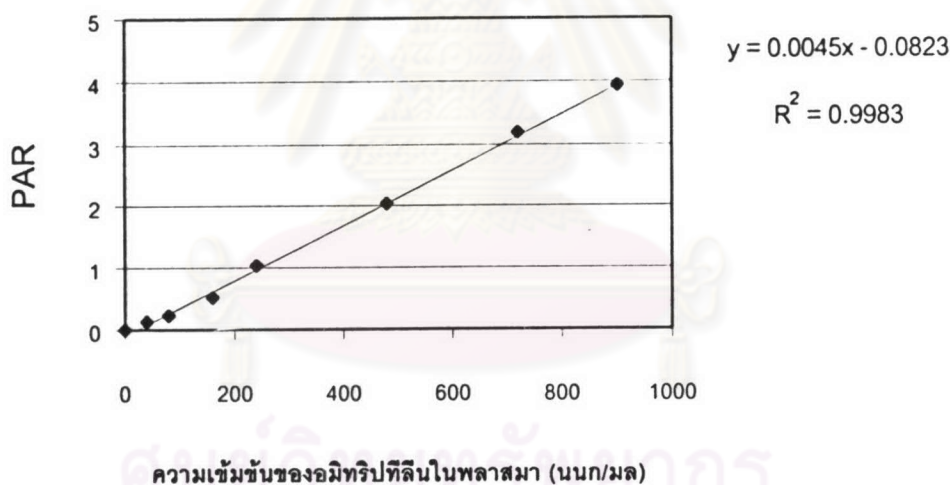
หัวข้อ	ดีเทคเตอร์	ผล
ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง	UV	40-900 นนก/มล
	EC	4-900 นนก/มล
ความไวของวิธีวิเคราะห์	UV	40 นนก/มล
	EC	4 นนก/มล
ประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่าง	UV	>80%
	EC	>80%
ความถูกต้องและความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์	UV	%Bias ไม่เกิน $\pm 10\%$
	EC	%RSD ไม่เกิน 6.5%
ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์	UV	มีความจำเพาะเจาะจง
	EC	
ความคงตัวของ	UV	
1) ตัวอย่างพลาสติกที่อุณหภูมิห้อง		9 ชั่วโมง
2) ตัวอย่างพลาสติกที่ผ่าน freeze-thaw cycle		3 รอบ
3) ตัวอย่างพลาสติกที่สภาวะการเก็บรักษา		30 วัน
4) ตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมแล้วใน autosampler		24 ชั่วโมง
5) สารละลายมาตรฐาน		14 วัน

## 4.2 การยืนยันความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของอิมิพริทีลินและนอร์ทริพทีลิน

### 4.2.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้พีคของตัวยากับสารมาตรฐานภายในและความเข้มข้นของยาในพลาสมา

อิมิพริทีลิน และนอร์ทริพทีลินแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้พีคของยากับ IS (PAR) และความเข้มข้นของยาในพลาสมา แสดงในรูปของสมการเส้นตรง  $PAR = \text{intercept} + \text{slop}(X)$  และเส้นกราฟที่ได้แสดงในรูป 28 และ 29 ของอิมิพริทีลินคือ  $PAR = 0.0042X - 0.0624$  ของนอร์ทริพทีลินคือ  $PAR = 0.0042X - 0.0699$  โดยมีการยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง PAR และความเข้มข้นของยาดังตารางที่ 39 และ 40

#### 4.2.1.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของอิมิพริทีลิน

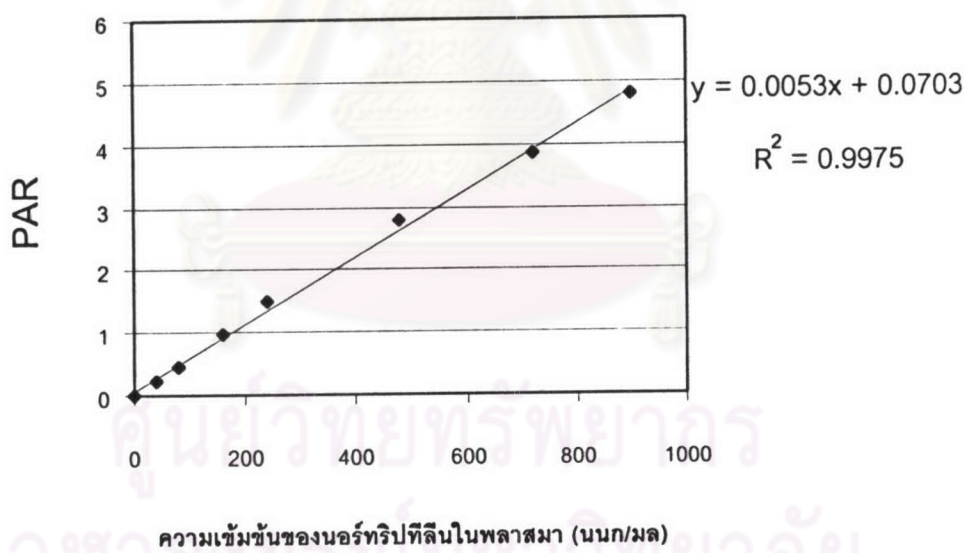


รูปที่ 28 กราฟเทียบมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง PAR และความเข้มข้นของอิมิพริทีลินในพลาสมา

ตารางที่ 39 การยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง PAR และความเข้มข้นของนอร์ทริปทีลีน  
ในรูปของ %RSD ของความชัน และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ )

สมการที่	ความชัน	$R^2$
1	0.0045	0.9983
2	0.0051	0.9965
3	0.0049	0.9983
ค่าเฉลี่ย	0.0048	0.9977
SD	0.0003	0.0010
%RSD	6.32	0.10

#### 4.3.1.2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของนอร์ทริปทีลีน



รูปที่ 29 กราฟเทียบมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง PAR และความเข้มข้นของนอร์ทริปทีลีนในพลาสมา

ตารางที่ 40 การยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง PAR และความเข้มข้นของนอร์ทริปทีลีน  
ในรูปของ %RSD ของความชัน และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ )

สมการที่	ความชัน	$R^2$
1	0.0053	0.9975
2	0.0058	0.9994
3	0.0055	0.9953
ค่าเฉลี่ย	0.0055	0.9974
SD	0.0002	0.0020
%RSD	4.55	0.21

#### 4.2.2 ความไวของวิธีวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนานี้สามารถใช้วิเคราะห์อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน ในพลาสมาได้ต่ำสุด 40 นนก/มล โดยมีค่า %Biasเฉลี่ย ของอมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน เท่ากับ -0.91 และ +0.59 ตามลำดับ และมีค่า %RSD ของความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ เท่ากับ 5.55 และ 6.54 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 41

#### 4.2.3 การศึกษาประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่าง

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมามาตรฐานที่เติมสารละลายมาตรฐานของอมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน ได้ค่า %การคืนกลับเฉลี่ยของอมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน เท่ากับ 80.89% และ 81.43 % ตามลำดับ โดยรายละเอียดแสดงในตารางที่ 42,43

จะเห็นว่าได้ค่า %การคืนกลับ มากกว่า 80% ดังนั้นสามารถบอกได้ว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยการแยกพลาสมาโปรตีนด้วยการใช้สารแยกพลาสมาโปรตีนร่วมกับการเติมสารประกอบอินทรีย์ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 41 ความไวของวิธีวิเคราะห์หอมิทรูปที่สิ้น และนอร์ทรูปที่สิ้น ที่ความเข้มข้น 40 นนก./มล

ตัวอย่าง	อมิทรูปที่สิ้น		นอร์ทรูปที่สิ้น	
	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ (นนก/มล)	%Bias	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ (นนก/มล)	%Bias
1	41.57	+3.92	41.50	+3.75
2	37.30	-6.75	43.79	+9.48
3	41.14	+2.85	41.59	+3.98
4	37.35	-6.62	39.84	-0.40
5	38.38	-4.05	36.43	-8.92
6	42.08	+5.20	38.26	-4.35
ค่าเฉลี่ย	39.64	-0.91	40.24	+0.59
SD	2.20	-	2.63	-
%RSD	5.55	-	6.54	-

ตารางที่ 42 ประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่างของอมิทรูปที่สิ้น

ความเข้มข้น (นนก/มล)	การคืนกลับ (%)						ค่าเฉลี่ย (SD)
	1	2	3	4	5	6	
80	74.58	88.19	80.21	89.00	70.43	78.88	80.22 (7.35)
160	82.11	81.38	78.66	77.03	86.97	84.89	81.84 (3.72)
480	77.13	86.20	82.72	83.31	78.22	76.05	80.60 (4.04)
					ค่าเฉลี่ยรวม (SD)		80.89 (0.85)



ตารางที่ 43 ประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่างของนอร์ทริปทีลีน

ความเข้มข้น (นกก./มล.)	การคืนกลับ (%)						ค่าเฉลี่ย (SD)
	1	2	3	4	5	6	
80	82.94	78.74	81.26	74.42	81.49	82.33	80.20 (3.17)
160	75.51	78.10	74.70	79.03	78.40	81.57	77.88 (2.49)
480	77.96	84.21	89.52	83.41	93.86	88.29	86.21 (5.54)
					ค่าเฉลี่ยรวม (SD)		81.43 (4.30)

#### 4.2.4 ความถูกต้องและความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy and precision)

##### 4.3.4.1. ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ แสดงในรูป %Bias สำหรับนอร์ทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน ได้ค่า %Bias อยู่ระหว่าง -3.61 ถึง +9.15 และ -6.89 ถึง +5.88 ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 44,45

ตารางที่ 44 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของนอร์ทริปทีลีนในพลาสมา

ความเข้มข้น (นกก./มล.)	%Bias						ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	
80	-3.61	+0.10	-2.10	-0.59	-0.05	+5.50	-0.12
160	-1.84	-4.74	+0.59	-1.26	+9.15	+1.72	+0.60
240	-0.26	-1.75	+0.72	-1.25	+4.61	-5.91	-0.52
480	+0.61	+1.69	+1.64	-0.68	-1.12	-2.54	-0.07

ตารางที่ 45 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของนอร์ทริปทีลีนในพลาสติก

ความเข้มข้น (นกก./มล.)	%Bias						ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	
80	-6.89	+3.70	+1.21	-1.75	+4.40	-1.91	0.21
160	-2.44	-1.86	+0.94	-3.30	-0.22	-0.26	-1.19
240	+5.88	-0.89	+1.44	+2.18	-3.24	-3.26	+0.35
480	-0.73	+1.02	+4.55	-0.41	-0.95	+4.36	+1.31

#### 4.2.4.2. ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกมาตรฐานที่เติมนอร์ทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน ความเข้มข้น 80,160,240 และ 480 นกก./มล ความเข้มข้นละ 6 ตัวอย่าง ได้ค่า %RSD อยู่ระหว่าง 1.68 ถึง 4.71 และ 1.62 ถึง 4.21 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 46,47

#### 4.2.4.3. ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน

การวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสติกมาตรฐานที่เติมนอร์ทริปทีลีนและนอร์ทริปทีลีน เป็นเวลา 4 วัน ได้ค่า %RSD อยู่ระหว่าง 0.73 ถึง 3.02 และ 0.91 ถึง 2.05 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 48,49

จากผลการทดลองเพื่อหาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ ทั้งการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน และเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน พบว่าได้ค่า %RSD ไม่เกิน 15 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ยาอมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีนในพลาสติก สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์วันเดียวกัน หรือวันอื่นๆ ก็จะทำให้ผลแบบเดียวกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 46 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันของอิมิทริปทีลีน

ความเข้มข้น (นกก/มล)	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (นกก/มล)						ค่าเฉลี่ย (SD)	%RSD
	1	2	3	4	5	6		
80	77.11	80.08	78.32	79.53	79.96	84.40	79.90 (2.49)	3.10
160	157.05	152.42	160.94	157.99	174.64	162.75	160.96 (7.58)	4.74
240	239.37	235.81	241.72	237.01	251.07	227.54	238.75 (7.72)	3.24
480	482.94	488.10	487.87	476.71	474.64	467.83	479.68 (8.04)	1.68

ตารางที่ 47 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันของนอร์ทริปทีลีน

ความเข้มข้น (นกก/มล)	ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (นกก/มล)						ค่าเฉลี่ย (SD)	%RSD
	1	2	3	4	5	6		
80	74.49	82.96	80.97	78.60	83.52	78.47	79.83 (3.36)	4.21
160	156.09	157.02	161.51	154.72	159.65	159.58	158.10 (2.56)	1.62
240	254.12	237.87	243.46	245.23	232.22	232.17	240.84 (8.49)	3.53
480	476.50	484.90	501.85	478.05	475.44	500.92	486.28 (12.16)	2.50

ตารางที่ 48 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันของอิมิทริปทีลีน

ความเข้มข้น (นกก/มล)	ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (นกก/มล) (SD)					%RSD
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
80	84.47 (1.44)	78.81 (2.42)	81.27 (0.69)	79.90 (2.48)	81.11 (2.45)	3.02
160	165.89 (5.98)	154.59 (13.90)	162.08 (3.54)	160.96 (7.58)	160.88 (4.69)	2.92
240	239.08 (8.49)	236.15 (17.18)	240.32 (4.22)	238.75 (7.72)	238.58 (1.75)	0.73
480	493.30 (13.11)	470.88 (16.21)	483.38 (1.52)	479.68 (8.04)	481.81 (9.28)	1.93

ตารางที่ 49 ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันของนอร์ทริปทีลีน

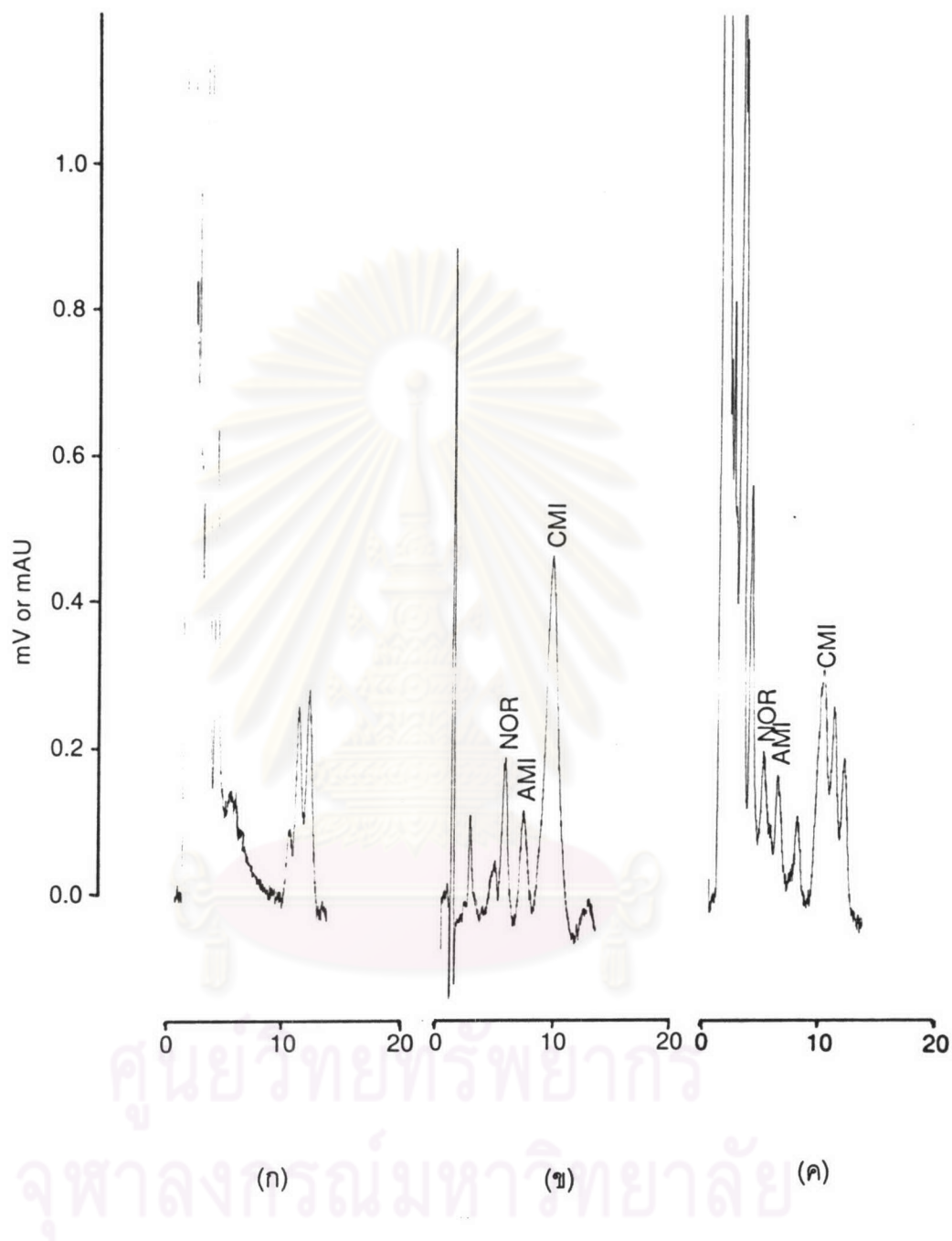
ความเข้มข้น (นกก/มล)	ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ (นกก/มล) (SD)					%RSD
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	ค่าเฉลี่ย	
80	77.35 (1.43)	81.08 (3.02)	80.47 (1.53)	79.83 (3.36)	79.68 (1.64)	2.05
160	163.37 (4.16)	160.51 (9.40)	160.96 (4.09)	158.10 (2.56)	160.74 (2.16)	1.34
240	246.68 (7.52)	241.10 (13.58)	241.51 (6.52)	240.84 (8.50)	242.53 (2.78)	1.14
480	494.36 (20.50)	493.12 (30.12)	485.87 (11.24)	486.28 (12.16)	489.91 (4.46)	0.91

#### 4.2.5 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

จากการวิเคราะห์หิมทริปทีลีน, นอร์ทริปทีลีน และโคลมิพราซีนในสารละลาย และในตัวอย่างพลาสติกมาตรฐาน ที่เติมยาที่ความเข้มข้น 900 นนก./มล. เปรียบเทียบกันพบว่าได้ค่าเวลาหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์เท่ากับ 7.86, 5.99 และ 10.50 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 30 และเมื่อเปรียบเทียบกับแบนด์พีพลาสติก กับตัวอย่างพลาสติกมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 30 และเทียบกับตัวอย่างพลาสติกจากอาสาสมัคร ดังรูปที่ 31 ก็พบว่าไม่มีการรบกวนจาก endogenous substance และสารใดๆ

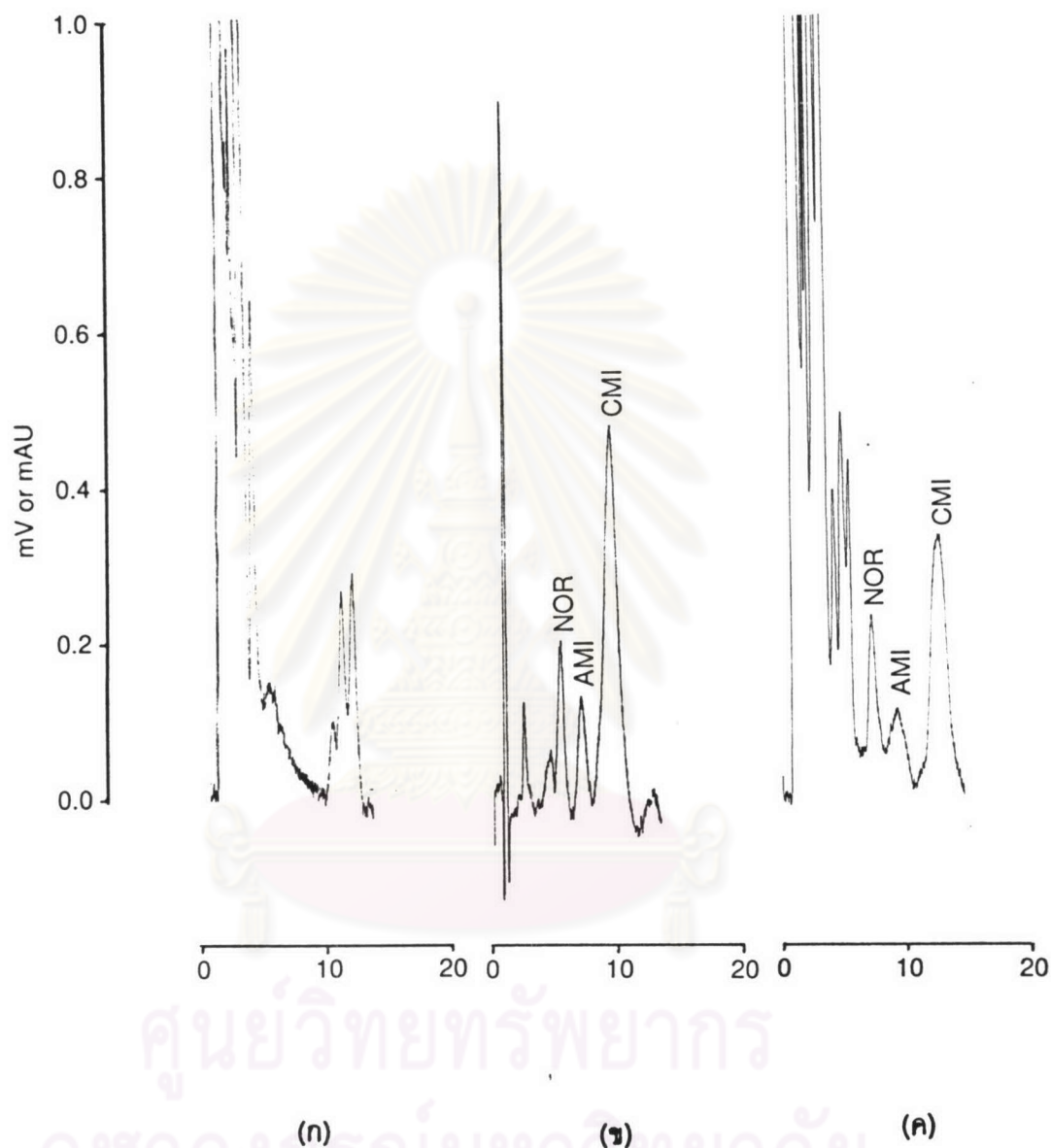


ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 30 โครมาโตแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

- (ก) แบลงค์พลาสมา
- (ข) อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีนในสารละลาย ที่ความเข้มข้น 80 นนก/มล
- (ค) อมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีนในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 80 นนก/มล



รูปที่ 31 โครมาโตแกรมแสดงความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์อิมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีน

- (ก) แบลงค์พลาสมา
- (ข) อิมิทริปทีลีน และนอร์ทริปทีลีนในสารละลาย ที่ความเข้มข้น 80 นนก/มล
- (ค) ตัวอย่างพลาสมาของอาสาสมัคร

#### 4.2.6 การศึกษาความคงตัว

##### 4.2.6.1 ความคงตัวของตัวอย่างพลาสติกที่อุณหภูมิห้อง

อมิทธิปริทีลีน และนอร์ทธิปริทีลีนในพลาสติกสามารถคงตัวอยู่ได้ ณ อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) นาน 12 ชั่วโมง โดยมีค่า %difference ของอมิทธิปริทีลีนอยู่ระหว่าง  $-4.83$  ถึง  $+4.22$  ของนอร์ทธิปริทีลีน  $-8.29$  ถึง  $+5.33$  ดังแสดงในตารางที่ 50,51

##### 4.2.6.2 ความคงตัวของตัวอย่างพลาสติกเมื่อผ่านรอบการแช่แข็งและละลาย

ทั้งอมิทธิปริทีลีน และนอร์ทธิปริทีลีนในพลาสติก เมื่อผ่าน freeze-thaw cycle ครบ 3 รอบ มีค่า %difference อยู่ระหว่าง  $-2.85$  ถึง  $+4.05$  และ  $-1.16$  ถึง  $+2.98$  ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 52,53

ซึ่งยืนยันว่า อมิทธิปริทีลีน และนอร์ทธิปริทีลีนในพลาสติก สามารถคงตัวอยู่ได้ แม้จะมีการนำเข้าออกจากตู้แช่แข็งถึง 3 ครั้ง

##### 4.2.6.3 ความคงตัวของตัวอย่างพลาสติกที่สภาวะการเก็บรักษา ( $-48^{\circ}\text{C}$ )

อมิทธิปริทีลีน และนอร์ทธิปริทีลีนในพลาสติก เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ  $-48^{\circ}\text{C}$  ครบ 30 วัน มีค่า %difference อยู่ในช่วง  $-2.42$  ถึง  $+0.46$  และ  $-4.31$  ถึง  $+1.57$  ตามลำดับ ซึ่งไม่เกิน  $\pm 10\%$  ดังแสดงในตารางที่ 54,55

ดังนั้น อมิทธิปริทีลีน และนอร์ทธิปริทีลีน ในพลาสติก สามารถเก็บไว้ได้ถึง 30 วัน ที่อุณหภูมิ  $-48^{\circ}\text{C}$  และยังคงมีความคงตัวดีอยู่

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 50 ความคงตัวของอมิทธิปริทีลินในพลาสติกที่อุณหภูมิห้อง

เวลา (ชั่วโมง)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 80 นนก/มล			ความเข้มข้น 480 นนก/มล		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	+2.67	-0.32	-4.83	-1.95	+0.21	-1.47
6	+4.22	+3.21	+4.08	-2.46	-0.57	-3.71
9	+3.49	+0.35	-2.09	+0.32	-2.35	-1.96
12	+1.55	+2.41	-3.92	-2.81	-1.89	-8.30

ตารางที่ 51 ความคงตัวของนอร์ทริปทีลินในพลาสติกที่อุณหภูมิห้อง

เวลา (ชั่วโมง)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 80 นนก/มล			ความเข้มข้น 480 นนก/มล		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	+5.35	-1.28	-3.58	-1.97	-5.30	-1.63
6	-2.53	-0.40	-4.52	-4.47	-6.24	+2.69
9	-0.92	-0.28	-0.45	-1.67	-1.22	-1.36
12	-8.29	-4.77	-6.61	+0.13	+2.73	-1.08

ตารางที่ 52 ความคงตัวของอมิทธิปริทีลินในพลาสติกที่ freeze-thaw cycle

รอบ	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 80 นนก/มล			ความเข้มข้น 480 นนก/มล		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	+0.73	-2.85	+4.05	-0.50	+2.88	+0.73

ตารางที่ 53 ความคงตัวของนอร์ทริปทีลินในพลาสติกที่ freeze-thaw cycle

รอบ	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 80 นนก/มล			ความเข้มข้น 480 นนก/มล		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	+0.75	-1.16	+1.96	+2.25	+2.98	+0.01

ตารางที่ 54 ความคงตัวของอมิทริปทีลินในพลาสติกที่สภาวะการเก็บรักษา -48°C

วันที่ (วัน)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 80 นนก/มล			ความเข้มข้น 480 นนก/มล		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	-1.25	-2.29	-1.20	-1.56	-1.17	+0.18
30	+0.36	-2.17	+0.46	-2.42	-0.30	+0.44

ตารางที่ 55 ความคงตัวของนอร์ทริปทีลินในพลาสติกที่สภาวะการเก็บรักษา -48°C

วันที่ (วัน)	%difference (n=3)					
	ความเข้มข้น 80 นนก/มล			ความเข้มข้น 480 นนก/มล		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	-0.47	-0.26	+1.35	+1.35	+1.57	-2.12
30	-4.31	-1.51	-0.37	-2.27	-1.75	-3.51

#### 4.1.6.2. ความคงตัวของตัวอย่างเมื่ออยู่ใน autosampler

ตัวอย่างที่พร้อมฉีดเข้า HPLC เมื่อวางไว้ใน autosampler ที่อุณหภูมิ 4°C ถึง 24 ชั่วโมง ค่า %difference ของความเข้มข้นอยู่ระหว่าง -4.66 ถึง +5.12 และ -6.22 ถึง +7.45 ตามลำดับ ดังตารางที่ 56,57 ซึ่งยืนยันความคงตัวได้ถึง 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 56 ความคงตัวของตัวอย่างอมิทธิปทีลินเมื่ออยู่ใน autosampler ที่ 4°C

เวลา (ชั่วโมง)	%difference (n=3)								
	ความเข้มข้น 80 นนก/มล			ความเข้มข้น 160 นนก/มล			ความเข้มข้น 480 นนก/มล		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	+1.67	+1.87	-0.39	-0.71	-4.66	-4.45	+0.01	+0.49	+0.69
12	+5.12	+4.98	-1.96	-1.09	-2.65	-0.31	+0.18	+0.72	+1.66
18	-1.82	+0.51	-1.48	-0.64	-0.40	-2.80	-1.14	+3.42	+3.22
24	+3.72	-0.65	+0.70	-1.88	-3.66	-1.71	-0.54	+1.36	+1.55

ตารางที่ 57 ความคงตัวของตัวอย่างนอร์ทริปทีลินเมื่ออยู่ใน autosampler ที่ 4°C

เวลา (ชั่วโมง)	%difference (n=3)								
	ความเข้มข้น 80 นนก/มล			ความเข้มข้น 160 นนก/มล			ความเข้มข้น 480 นนก/มล		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	-4.49	-0.59	+0.15	+7.45	+0.57	-4.21	-0.52	+1.88	-1.54
12	-4.10	-1.40	-0.41	-0.88	+3.42	-2.21	-6.01	-1.14	+2.31
18	-6.22	+0.22	+0.61	-0.82	+3.91	-1.59	+0.04	-0.36	-1.59
24	-3.10	+2.48	+2.11	+3.79	+3.86	-0.26	-0.11	-1.68	-0.60

#### 4.2.6.5. ความคงตัวของสารละลายมาตรฐานอิมิทริปทีลิน และนอร์ทริปทีลิน

ทั้งอิมิทริปทีลิน และนอร์ทริปทีลิน ในสารละลายมาตรฐาน สามารถมีความคงตัวได้ถึง 28 วัน โดยค่า %difference อยู่ในช่วง  $-2.37$  ถึง  $+4.26$  และ  $-1.36$  ถึง  $+3.80$  ดังแสดงในตารางที่ 58 แต่เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องมากที่สุดในการศึกษาจะเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่ทุก 2 สัปดาห์

ตารางที่ 58 ความคงตัวของสารละลายมาตรฐานอิมิพรามีน,เดซิพรามีน และ โคลมิพรามีน

วัน	%difference (n=3)					
	อิมิทริปทีลิน			นอร์ทริปทีลิน		
	1	2	3	1	2	3
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	-0.62	-2.37	-1.76	-1.36	-1.11	-0.71
14	+2.68	+2.52	+2.52	+3.80	+3.60	+0.76
21	+4.09	+4.37	+4.26	+3.45	+4.24	+3.77
28	+3.54	+0.12	+4.09	+2.41	+1.23	+1.36

สรุปผลการยืนยันการใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สำหรับอิมิทริปทีลิน และนอร์ทริปทีลินในพลาสมา

หัวข้อ	ดีเทคเตอร์	ผล
ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง	UV	40-900 นนก/มล
ความไวของวิธีวิเคราะห์	UV	40 นนก/มล
ประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่าง	UV	>80%
ความถูกต้องและความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์	UV	%Bias ไม่เกิน $\pm 2\%$ %RSD ไม่เกิน 5%
ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์	UV	มีความจำเพาะเจาะจง
ความคงตัวของ	UV	
1) ตัวอย่างพลาสมาที่อุณหภูมิห้อง		9 ชั่วโมง
2) ตัวอย่างพลาสมาที่ผ่าน freeze-thaw		

cycle	3 รอบ
3) ตัวอย่างพลาสติกที่สภาวะการเก็บ รักษา	30 วัน
4) ตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมแล้วใน autosampler	24 ชั่วโมง
5) สารละลายมาตรฐาน	14 วัน



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

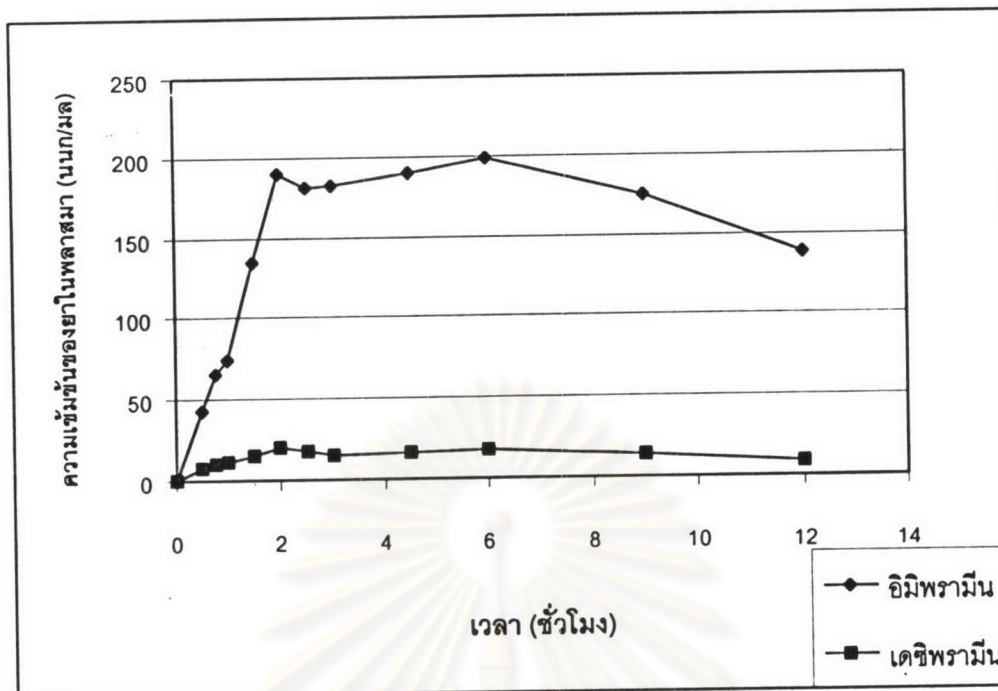
## ขั้นตอนที่ 5 การนำวิธีวิเคราะห์ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาจริง จากอาสาสมัคร

อาสาสมัครทั้งสี่คนเป็นชายไทย มีอายุเฉลี่ย 21.5 ปี การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ ยาอิมิพรามิน และอิมิทรูปทีลีน ในอาสาสมัครที่รับประทานยา แสดงในรูปที่ 33,34 โดยอิมิพรามิน มีระดับสูงสุดในร่างกาย (Cpmax) เฉลี่ยเท่ากับ 198.10 นนก/มล ที่เวลา 6 ชั่วโมง และเดซิพรามิน ซึ่งเป็นเมตาบอไลต์ มีค่า Cpmax เฉลี่ยเท่ากับ 20.44 นนก/มล ที่เวลา 2 ชั่วโมง ส่วนอิมิทรูปทีลีนมีค่า Cpmax เฉลี่ยเท่ากับ 117.15 นนก/มล ที่เวลา 1.5 ชั่วโมง และนอร์ทรูปทีลีนซึ่งเป็นเมตาบอไลต์มีค่า Cpmax เฉลี่ยเท่ากับ 65.66 นนก/มล ที่เวลา 1.5 ชั่วโมง โดยจะเห็นว่ายาทั้งสองตัวถูกดูดซึมได้ดีที่ทางเดินอาหาร ทำให้สามารถเห็น ทั้งตัวยามาเมตาบอไลต์ได้ตั้งแต่ในเวลาครึ่งชั่วโมงหลังรับประทานยา จากผลการศึกษาที่ได้ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ในการวิเคราะห์อิมิพรามินกับเมตาบอไลต์ และอิมิทรูปทีลีนกับเมตาบอไลต์ในพลาสมาได้จริง

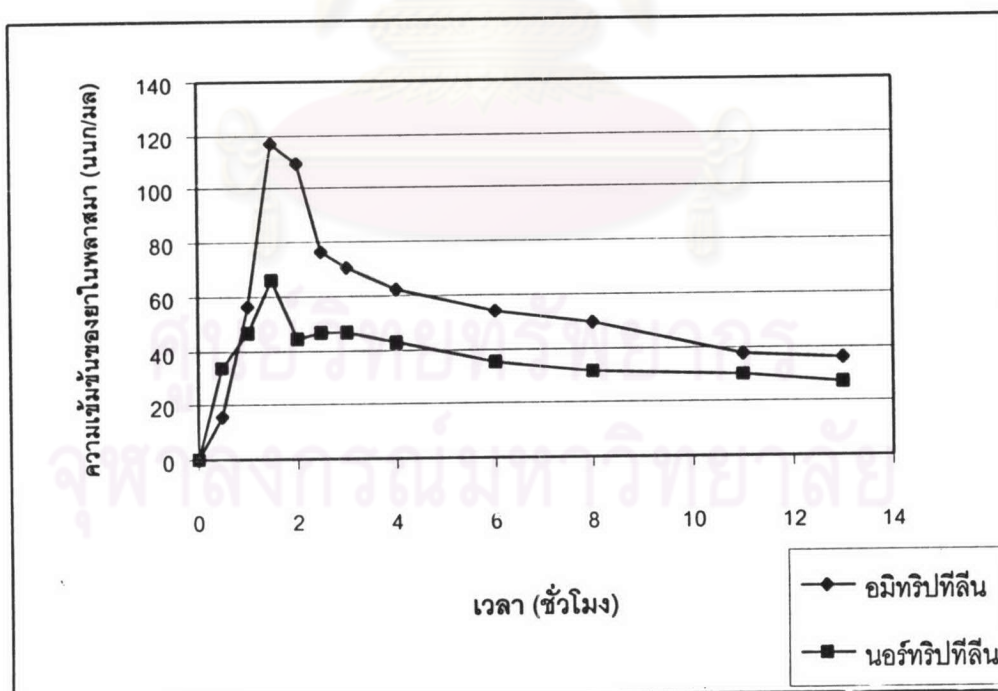
จากค่า Cpmax ที่วิเคราะห์ได้ของอาสาสมัครแต่ละคนจะเป็นไปตามเอกสารอ้างอิงต่างๆ ที่กล่าวว่าผู้ที่รับประทานยาในกลุ่มนี้จะมีความแตกต่างระหว่างบุคคลสูง ส่งผลให้ค่าระดับยาในพลาสมามีความแตกต่างกันในช่วงกว้าง (Evangelista and Paseual (eds.), 1996; Evangelista และคณะ (eds.), 2000) Gram และคณะ (1975) ได้ศึกษาค่า Cpmax ของอิมิพรามิน และเดซิพรามิน พบว่ามีค่าประมาณ 30 และ 15 นนก/มล เมื่อใช้ยาขนาดอิมิพรามินขนาด 50 มก และ Madakasira และคณะ (1985) ได้รายงานระดับยาในพลาสมาเมื่ออาสาสมัครรับประทานยาอิมิทรูปทีลีน ขนาด 50 มก ว่ามีค่ามากกว่า 100 นนก/มล เมื่อรับประทานยาไปแล้ว 18 ชั่วโมง

ตารางที่ 59 ค่าเฉลี่ยพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของอิมิพรามิน และอิมิทรูปทีลีนในคนไทย

	Tmax (hr)	Cpmax (ng/ml)	AUC (ng/ml.hr)
รับประทานยาอิมิพรามิน 50 มก			
อิมิพรามิน	6.0	198.10	2139.83
เดซิพรามิน	2.0	20.44	241.03
รับประทานยาอิมิทรูปทีลีน 50 มก			
อิมิทรูปทีลีน	1.5	117.15	961.86
นอร์ทรูปทีลีน	1.5	65.66	598.88



รูปที่ 32 ระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของอิมิพรามีน และเดซิพรามีน (เมตาบอไลต์) ในพลาสมาของอาสาสมัคร 2 คน หลังรับประทานยา Sermonil<sup>(R)</sup>



รูปที่ 33 ระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของอิมิพริปทีลีน และนอร์อิพริปทีลีน (เมตาบอไลต์) ในพลาสมาของอาสาสมัคร 2 คน หลังรับประทานยา Tryptanol<sup>(R)</sup>