

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การวิเคราะห์หาปริมาณสเตียรอยด์ (ชนิดเตกซาเมทาโซน) ในยาลูกกลอน

โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง



นางสาวจุฑาทิพย์ วิสิฐพัฒนาท

นางสาวพัชรา บุญมี

๒/๗.

๑๖๒๓๓

๒๕๕๐

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

107900

- 8 ส.ย. 2553

b. 12213160
i.

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Determination of Steroid (Dexamethasone) in Medicine-pills

by High Performance Liquid Chromatography

Miss Jutathip Wisitpatthanatorn

Miss Patchara Boonmee

**A Special Project Submitted in partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of
Bachelor of Science**

Department of Chemistry

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|----------------------|--|
| โครงการพิเศษเรื่อง | การวิเคราะห์ปริมาณสเตียรอยด์ (ชนิดเคกซาเมทาโซน) ในยา |
| | ลูกกลอนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง |
| นักศึกษา | นางสาวจุฑาทิพย์ วิสิฐพัฒนาร |
| | นางสาวพัชรา บุญมี |
| ภาควิชา | เคมี |
| สาขาวิชา | เคมีอุตสาหกรรม - เครื่องมือวิเคราะห์ |
| ปีการศึกษา | 2550 |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | รศ. คณิดา ตั้งคณานุรักษ์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | ผศ. นงนุช ศิวะภิญโญยศ |

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

| คณะกรรมการตรวจสอบ | | ลายมือชื่อ |
|-------------------|-----------------------------|----------------|
| ประธานกรรมการ | ดร. วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ | |
| กรรมการ | อ. พรทิพย์ ศัพทอนันต์ | |
| กรรมการ | รศ. คณิดา ตั้งคณานุรักษ์ | |

.....
(ผศ.ดร. ชลอ จารุสุทธิรักษ์)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

**ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|----------------------|--|
| โครงการพิเศษ | การวิเคราะห์ปริมาณสเตียรอยด์ (ชนิดเดกซาเมทาโซน) ในยาลูกกลอน โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง |
| นักศึกษา | นางสาวจุฑาทิพย์ วิสิฐพัฒนาทร นางสาวพัชรา บุญมี |
| ภาควิชา | เคมี คณะวิทยาศาสตร์ |
| สาขาวิชา | เคมีอุตสาหกรรม-เครื่องมือวิเคราะห์ |
| ปีการศึกษา | 2550 |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | รศ.คณิตา ตังคณานุรักษ์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | ผศ.นงนุช ศิวะภิญโญยศ |

บทคัดย่อ

สเตียรอยด์ (steroid) เป็นกลุ่มฮอร์โมนที่ถูกสร้างจากต่อมหมวกไต ซึ่งเป็นสารที่พบในยา
ลูกกลอน เพื่อให้ยามีสรรพคุณในการรักษามากขึ้น งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการตรวจวัดหาปริมาณ
สเตียรอยด์ ชนิดเดกซาเมทาโซน (dexamethasone) ในตัวอย่างยาลูกกลอนโดยใช้เทคนิคโครมาโท
กราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ใช้คอลัมน์ C-18 (ขนาด 150 mm × 4.6 mm i.d.) เป็นเฟสอยู่กับที่
สารละลายผสมระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ อะซิโทรไนไตรล์ และเมทานอล โดยมีอัตราส่วนเป็น
ดังนี้ 1.73 : 1.16 : 1 ตามลำดับ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร
ต่อนาที และตรวจวัดด้วยเครื่องยูวี-ดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จากการวิเคราะห์ยา
ลูกกลอนพบว่า ยาลูกกลอนที่มีปริมาณเดกซาเมทาโซนมากที่สุดในตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์
คือ ยาคลายเส้นวัดโพธิ์ (12.41 ppm) รองลงมา คือ ยาเหงือกปลาหมอ (7.13 ppm) และยาสมุนไพรร
พญามือเหล็ก (3.76 ppm) ตามลำดับ และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบ
ของเหลวสมรรถนะสูงจัดว่าเป็นวิธีตรวจวัดปริมาณเดกซาเมทาโซน ได้ง่าย รวดเร็ว และให้ผลที่
น่าเชื่อถือได้ในการตรวจวัดปริมาณเดกซาเมทาโซนในยาลูกกลอน โดยพบว่ามีค่าความสัมพันธ์เชิง
เส้น (linearity) เท่ากับ 0.9997 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 9818.14 ค่าร้อยละของการ
เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) เท่ากับ 0.5069 % ร้อยละการคืนกลับ (%recovery) เท่ากับ
104.23 % ขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) มีค่าเท่ากับ 0.0543 และปริมาณต่ำสุดที่
สามารถวิเคราะห์ได้ (LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.1811

| | |
|-----------------------------------|---|
| Special Project Title | Determination of Steroid (Dexamethasone) in Medicine-pills by High Performance Liquid Chromatography |
| Name | Miss Jutathip Wisitpatthanatorn Miss Patchara Boonmee |
| Department | Chemistry |
| Programme | Industrial Chemistry-Analytical Instrumentation |
| Academic Year | 2007 |
| Special Project Advisor | Assoc. Prof. Kanita Tangkananuruk |
| Special Project co-advisor | Assoc. Prof. Nongnuch Siwapinyoyot |

Abstract

Steroid was hormone which was produced in adrenal glands and was present in medicine-pills for increase properties of a medicine. Therefore, group of research had a purpose to determine dexamethasone in medicine-pills by High Performance Liquid Chromatography. Chromatographic separation were performed on a C-18 (150 mm × 4.6 mm i.d.) column using buffer solution : acetonitrile : methanol mixed in the ratio of 1.73 : 1.16 :1 respectively as mobile phase, flow rate at 0.5 mL/min and the detector was UV detector at 254 nm. From this study, to experience medicine-pills had the most of dexamethasone was Klai Sen Wat Pho (12.41 ppm) and the second was Ngeu-ak Pla Mho(7.13 ppm) and Pha Ya Meu Lek (3.76 ppm) respectively and this study showed that High Performance Liquid Chromatography was simple rapid and reliable analytical method to determine dexamethasone in medicine-pills. The linearity of result was 0.9997, the precision was (SD) 9818.14, the percentage of standard precision was (%RSD) 0.5069 %, the spiked recovery for dexamethasone was 104.23 % , LOD was 0.0543 and LOQ was 0.1811.

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำโครงการพิเศษนี้สามารถลุล่วงไปด้วยดี สืบเนื่องมาจากความร่วมมือ การได้รับการดูแล เอาใจใส่ ช่วยเหลือ แนะนำ และความกรุณาของทุก ๆ ท่าน ทั้งอาจารย์ที่ปรึกษา คณะกรรมการ และผู้ที่เกี่ยวข้องแก่ผู้จัดทำ ที่กรุณาติดตาม ตรวจสอบดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดี และแก้ไขโครงการพิเศษฉบับนี้จนสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.คณิตา ตั้งคณานุรักษ์ และ ผศ.นงนุช ศิวะภิญโญยศ เป็นอย่างสูงที่ให้คำปรึกษา ช่วยแก้ไขปัญหา คอยเอาใจใส่ดูแล ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงการพิเศษนี้มาตลอด

ขอขอบพระคุณ ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ และ อ.พรทิพย์ ศัพท์อนันต์ อาจารย์คณะกรรมการตรวจสอบโครงการพิเศษที่ให้ความกรุณาแก้ไขโครงการพิเศษให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีทุกท่านที่คอยช่วยเหลือให้การทำให้โครงการพิเศษนี้ดำเนินไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณกัญญา มงคลโกชน์ ที่ช่วยดูแลเรื่องการใช้เครื่องโครมาโทกราฟแบบของเหลวสมรรถนะสูง ให้การทำงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี รวมทั้งแม่บ้านที่คอยให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ญาติ พี่น้อง และเพื่อน ๆ รวมถึงรุ่นพี่ รุ่นน้องทุก ๆ คนที่ให้กำลังใจ และช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านจนโครงการพิเศษนี้สำเร็จในที่สุด นอกจากนี้ บุคคลที่มีส่วนช่วยที่มีได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

นางสาวจุฑาทิพย์ วิสิฐพัฒนาร
นางสาวพัชรา บุญมี

สารบัญ

| | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ข |
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญตาราง | ฉ |
| สารบัญรูป | ช |
| บทที่ 1 บทนำ | |
| 1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ | 2 |
| 1.3 ขอบเขตงานวิจัย | 2 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| บทที่ 2 หลักการและทฤษฎี | |
| 2.1 สเตียร์รอยด์ | 3 |
| 2.2.1 ชนิดของยากลุ่มสเตียร์รอยด์ | 3 |
| 2.2.2 ชนิดของสเตียร์รอยด์ที่ทำการวิเคราะห์ | 4 |
| 2.2.3 ประโยชน์และโทษของสเตียร์รอยด์ชนิดเดกซาเมทาโซน | 4 |
| 2.2 หลักการของ HPLC | 6 |
| 2.2.1 ลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ | 6 |
| 2.2.2 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC | 7 |
| 2.2.3 ข้อปฏิบัติในการใช้เครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์ | 10 |
| 2.3 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 12 |
| บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย | |
| 3.1 สารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ | 13 |
| 3.2 การเตรียมสารละลาย | 14 |
| 3.3 เตรียมกราฟมาตรฐานเดกซาเมทาโซน | 15 |
| 3.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ | 16 |
| 3.5 ตรวจวัดปริมาณเดกซาเมทาโซนในสารละลายตัวอย่างยาลูกกลอน | 17 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|---|------|
| บทที่ 4 ผลการทดลอง และอภิปรายผล | |
| 4.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายเดกซามิทาโซน | 18 |
| 4.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ | 19 |
| 4.3 การตรวจวัดปริมาณเดกซามิทาโซนในยาลูกกลอน | 23 |
| บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ | 24 |
| เอกสารอ้างอิง | 26 |
| ภาคผนวก | |
| ภาคผนวก ก แสดงผลการวิเคราะห์ | 29 |
| ภาคผนวก ข แสดงผลการทดลอง | 35 |



สารบัญตาราง

| | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 4.1 แสดงความเข้มข้น (ppm) และพื้นที่ใต้กราฟ ของสารละลายมาตรฐานเดกซามेटาโซน | 20 |
| ตารางที่ 4.2 แสดงค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์ | 21 |
| ตารางที่ 4.3 แสดงผลการวัดปริมาณเดกซามेटาโซนใน original sample และ spiked sample และค่าร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery) | 21 |
| ตารางที่ 4.4 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณเดกซามेटาโซนในยาลูกกลอน | 23 |
| ตารางที่ ก.1 แสดงความเข้มข้น (ppm) และพื้นที่ใต้กราฟ ของสารละลายมาตรฐานเดกซามेटาโซน | 29 |
| ตารางที่ ก.2 แสดงผลการวัดปริมาณเดกซามेटาโซน และพื้นที่ใต้กราฟ ของสารละลายมาตรฐานเดกซามेटาโซน | 30 |
| ตารางที่ ก.3 แสดงค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์ | 31 |
| ตารางที่ ก.4 แสดงผลการวัดปริมาณเดกซามेटาโซนใน original sample และ spiked sample และค่าร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery) | 32 |
| ตารางที่ ก.5 แสดงผลการวัดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเดกซามेटาโซน เพื่อหาค่า LOD และ LOQ | 33 |
| ตารางที่ ก.6 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณเดกซามेटาโซนในยาลูกกลอน | 34 |

สารบัญรูป

| | หน้า |
|--|------|
| รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของเดกซามิทาโซน | 4 |
| รูปที่ 2.2 เครื่องโครมาโทแกรมแบบของเหลวสมรรถนะสูง | 7 |
| รูปที่ 2.3 ส่วนประกอบของเครื่องโครมาโทแกรมแบบของเหลวสมรรถนะสูง | 7 |
| รูปที่ 2.4 ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ | 8 |
| รูปที่ 2.5 คอลัมน์ของเครื่องโครมาโทกราฟแบบของเหลวสมรรถนะสูง | 9 |
| รูปที่ 2.6 เครื่องตรวจวัด | 10 |
| รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเดกซามิทาโซนเข้มข้น 100 ppm ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที | 18 |
| รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานสารละลายเดกซามิทาโซน | 19 |
| รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ กับความเข้มข้นของเดกซามิทาโซน | 22 |
| รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานเดกซามิทาโซนที่ได้จากเครื่องโครมาโทกราฟ แบบของเหลวสมรรถนะสูง | 36 |
| รูปที่ ข.2 โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างยาสมุนไพรนางพญามือเหล็ก | 37 |
| รูปที่ ข.3 โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างยาหืออกปลาหมอ | 38 |
| รูปที่ ข.4 โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างยาคลายเส้นวัดโพธิ์ | 39 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ

ในชีวิตประจำวันปัจจัยสี่ ถือเป็นสิ่งสำคัญในการดำรงชีวิต และขาดเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการรักษาโรค ซึ่งยาที่ใช้ในปัจจุบันนี้มีมากมายหลายชนิด และยาลูกกลอนก็จัดเป็นยาแผนโบราณชนิดหนึ่งที่น่ามารถรักษาโรคซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีการผลิตยาลูกกลอนกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากยาลูกกลอนเป็นยาที่เตรียมได้จากสมุนไพรพื้นบ้านที่มีอยู่มากในประเทศไทย และมีสรรพคุณในการรักษาโรคต่าง ๆ ได้หลายชนิด แต่กระบวนการผลิตอาจยังไม่ได้มาตรฐาน เนื่องจากส่วนมากเป็นการผลิตตามภูมิปัญญาชาวบ้าน ในบางแหล่งผลิตจึงยังไม่มี การวิเคราะห์หาปริมาณสารปนเปื้อนหรือตัวยาที่รักษาอย่างแน่นอน ซึ่งส่วนประกอบหนึ่งที่พบในยาลูกกลอนก็คือ สเตียรอยด์

สเตียรอยด์ เป็นชื่อเรียกของกลุ่มฮอร์โมนที่ถูกสร้างจากต่อมหมวกไต ซึ่งที่ต่อมนี้จะสร้างฮอร์โมนแอนโดรเจน (ฮอร์โมนชาย) ด้วยสเตียรอยด์ ถูกสร้างขึ้นจากสารตั้งต้นที่เรียกว่า คอเลสเตอรอล (Cholesterol) สเตียรอยด์หลักที่ถูกสร้างขึ้น มี 2 ชนิด คือ คอร์ติซอล (Cortisol) และ แอลโดสเตอโรน (Aldosterone) คอร์ติซอลถูกสร้างวันละประมาณ 20-30 มิลลิกรัม ซึ่งประโยชน์ของสเตียรอยด์มีมากมายเช่น ทดแทนภาวะขาดฮอร์โมนจากต่อมหมวกไต โรคข้ออักเสบที่รุนแรง ควบคุมไม่ได้ด้วยยามาตรฐาน สามารถรักษาด้วยสเตียรอยด์โดยการรับประทานหรือ ฉีดเข้าข้อ โดยตรง รักษาโรคหัวใจอักเสบรูมาติกโรคภูมิแพ้ ที่รุนแรง โรคไต บางชนิด โรคตา โรคผิวหนัง โรคตับบางชนิด เป็นต้น นอกจากนี้หากได้รับปริมาณสเตียรอยด์ที่มากเกินไปเกินที่กำหนดหรือใช้ยาที่มีส่วนผสมของสเตียรอยด์เป็นเวลานาน ๆ จะเกิดลักษณะ ที่เรียกว่า Cushing's Syndrome คือ มีอาการบวม ท้องลาย ผิว ฝวเข้มขึ้น ความดันโลหิตสูง อ่อนแรง เหนื่อย ขนขึ้นตามตัว และอาจทำให้เกิดติดเชื้อง่ายขึ้น เพราะยากระตุ้นภูมิคุ้มกันที่คอยต่อต้านเชื้อโรค กดการเจริญเติบโตในเด็ก กล้ามเนื้ออ่อนแรง ผิวหนังบาง สิว เกิดความดันโลหิตสูง ระดับโพแทสเซียมในเลือดต่ำ เกิดภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำ ภาวะกระดูกพรุน เป็นต้น

ยาแผนโบราณหรือที่เรียกกันว่า “ ยาลูกกลอน ” ที่นิยมใช้ส่วนใหญ่จะเป็นประเภทยาแก้ปวดเมื่อย และยารักษาอาการปวดข้อ ซึ่งในยาประเภทนี้มักมีการเติมสารเดกซามิทาโซน (Dexamethasone) ลงในยาแผนโบราณที่เป็นยาที่ได้จากสมุนไพร เพื่อให้ยามีสรรพคุณในการรักษา มากขึ้น ซึ่งจัดได้ว่าเป็นการหลอกลวงผู้บริโภค คือในช่วงแรกคนไข้จะหายจากอาการปวดเมื่อยอย่างรวดเร็ว ผลคือทำให้คนไข้เชื่อว่ายาสมุนไพรนี้ใช้ได้ผลดี จึงมีการกินอย่างสม่ำเสมอ เพราะคิดว่าปลอดภัย เนื่องจากเป็นยาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ แต่เมื่อใช้เป็นเวลานานก็จะมีอาการไม่พึงประสงค์ แสดงออกมามากอย่างที่กล่าวไว้ในข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าการตรวจสอบการปลอมปนของสเตียรอยด์ในยาแผนโบราณ จึงเป็นการปกป้องสิทธิของผู้บริโภคอย่างหนึ่ง เพื่อให้การใช้ยาแผนโบราณเป็นไปอย่างปลอดภัย จึงจัดทำโครงการพิเศษขึ้นเพื่อศึกษาการตรวจวัดวิเคราะห์หาปริมาณสเตียรอยด์ในตัวอย่างยาลูกกลอนที่ใช้รักษาอาการปวดเมื่อย โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสเตียรอยด์ชนิด เดกซามेटาโซน ในยาลูกกลอนโดยใช้เทคนิค HPLC
2. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเดกซามेटาโซน ในยาลูกกลอนที่มาจากแหล่งผลิตต่าง ๆ กัน

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ตรวจวัดหาปริมาณสเตียรอยด์ชนิดเดกซามेटาโซน ในตัวอย่างยาลูกกลอนที่มาจากแหล่งผลิตต่าง ๆ กัน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง และประเมินผลโดยใช้หลักทางสถิติ

ขั้นตอนการวิจัย

1. สืบค้นแหล่งข้อมูลที่เกี่ยวข้อง
2. ศึกษาหาวิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม
3. เตรียมสารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ
4. เตรียมสารละลายเคมี และสารละลายมาตรฐาน
5. เตรียมกราฟมาตรฐานของเดกซามेटาโซน
6. ตรวจวัดปริมาณเดกซามेटาโซนในสารละลายตัวอย่างยาลูกกลอน
7. ประเมินผลโดยใช้หลักทางสถิติ และสรุปผล
8. เขียนรายงาน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงปริมาณเดกซามेटาโซนในตัวอย่างยาที่นำมาศึกษา และใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการบ่งบอกคุณภาพของยา และช่วยชี้แนะในการเลือกบริโภคได้ในระดับหนึ่ง
2. ทำให้ผู้วิจัยได้เข้าถึงหลักการ และวิธีการใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟีเพิ่มขึ้น
3. สามารถนำวิธีนี้ไปพัฒนาและประยุกต์ใช้กับการวิจัยสเตียรอยด์ชนิดอื่นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 สเตียรอยด์

สเตียรอยด์ เป็นชื่อเรียกของกลุ่มฮอร์โมนที่ถูกสร้างจากต่อมหมวกไต ซึ่งที่ต่อมนี้จะสร้างฮอร์โมนแอนโดรเจน (ฮอร์โมนชาย) ด้วยสเตียรอยด์ ถูกสร้างขึ้นจากสารตั้งต้นที่เรียกว่า คอเลสเตอรอล (Cholesterol) สเตียรอยด์หลักที่ถูกสร้างขึ้น มีด้วยกัน 2 ชนิด คือ คอร์ติซอล (Cortisol) และแอลโดสเตอโรน (Aldosterone) คอร์ติซอลถูกสร้างวันละประมาณ 20 -30 มิลลิกรัม ถูกหลั่งออกมาเป็นจังหวะไม่สม่ำเสมอ โดยสูงสุดตอนตื่นนอน และต่ำสุดตอนนอน เรียกว่า Diurnal Pattern นอกจากนี้ ภาวะที่ร่างกายมีความเครียด กดดันทั้งทางกายและจิตใจ เช่น มีบาดแผล ได้รับการผ่าตัด ออกกำลังกาย ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ เป็นไข้ วิตกกังวล ซึมเศร้า เป็นต้น ร่างกายจะหลั่งคอร์ติซอลมากขึ้นเพื่อควบคุมความกดดันเหล่านี้ ดังนั้นสเตียรอยด์จึงมีประโยชน์ต่อร่างกายมาก เชื่อว่าถ้าไม่มีสเตียรอยด์เลย อาจก่อให้เกิดอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ทีเดียว

ผลของ สเตียรอยด์ต่อร่างกายดังนี้

- มีผลต่อเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน
- ผลต่อความสมดุลของเกลือแร่ อิเล็กโทรไลต์ และน้ำ
- ฤทธิ์บรรเทาการอักเสบ
- ฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน
- ผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด
- ผลต่อเลือด
- ผลต่อการเจริญเติบโต การแบ่งเซลล์ กล้ามเนื้อ กระดูก

2.1.1 ชนิดของยากกลุ่มสเตียรอยด์

จากต้นแบบคอร์ติซอล มนุษย์เราได้พัฒนาความแรงของคอร์ติซอลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ และมีฤทธิ์เฉพาะเจาะจงกับโรคบางอย่างที่ต้องการมากขึ้น ชนิดของยากกลุ่มสเตียรอยด์มีดังนี้

1. Hydrocortisone
2. Prednisolone
3. Triamcinolone
4. Fluocinolone
5. Betamethasone
6. Clobetasol
7. Desoximetasone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

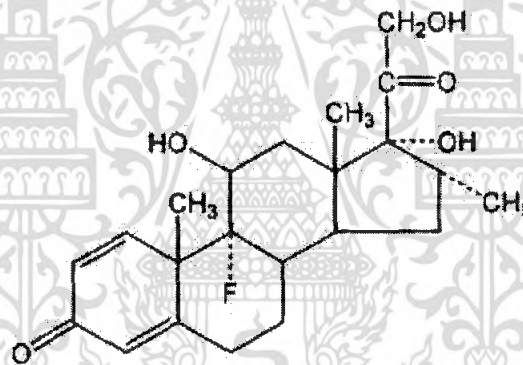
8. Prednicarbate
9. Mometasone
10. Beclomethasone
11. Budesonide
12. Dexamethasone

ถ้าสังเกตจากชื่อยาจะเห็นว่า มักลงท้ายด้วย -one หรือ -ol เสมอ ยกเว้นบางตัว ดังนั้นจึงพอใช้เป็นข้อสังเกตว่ายาตัวไหนเป็นสเตียรอยด์หรือไม่

2.1.2 ชนิดของสเตียรอยด์ที่ทำการวิเคราะห์

ชนิดของสเตียรอยด์ที่ทำการวิเคราะห์ คือ เดกซามเมทาโซน (Dexamethasone)

- ชื่อทางเคมี คือ (11beta, 16alpha)-9-FLUORO-11,17,21-TRIHIDROXY-16-METHYLPREGNA-1,4-DIENE-3,20-DIONE
- โครงสร้างทางเคมี เป็นดังนี้



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของเดกซามเมทาโซน

2.1.3 ประโยชน์และโทษของสเตียรอยด์ชนิดเดกซามเมทาโซน (Dexamethasone)

2.1.3.1 ประโยชน์ของเดกซามเมทาโซน

1. ทดแทนภาวะขาดฮอร์โมนจากต่อมหมวกไต
2. ข้ออักเสบ เฉพาะที่รุนแรง ควบคุมไม่ได้ด้วยยามาตรฐาน โดยให้ยาด้วยวิธีรับประทาน

หรือ ฉีดเข้าข้อโดยตรง

3. หัวใจอักเสบรูมาติก
4. โรคไต บางชนิด เช่น Glomerulonephritis, Nephrotic syndrome ,etc.
5. โรคเกี่ยวกับคอลลาเจนบางชนิด เช่น Polymyositis, Polyarteritis nodosa, systemic lupus erythematosus (SLE)

6. โรคภูมิแพ้ ที่รุนแรง ควบคุมด้วยยามาตรฐานแล้วไม่ได้ผล เช่น หอบ หืด โรคปอดอุดกั้น

เรื้อรัง โดยส่วนใหญ่ใช้ในรูปการพ่น สเตียรอยด์แต่ในรายรุนแรงก็จะให้กิน หรือ ฉีด

เอกสารนี้เป็นเอกสารหลวงในสสส หรือเป็นการแข่งขันเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. โรคตา ในรูปหยอด หรือป้ายตา เช่น โรคเส้นประสาทตาอักเสบ
8. โรคผิวหนัง ให้ในรูปยาทาเฉพาะที่ ได้แก่ โรคภูมิแพ้ในรูปแบบต่างๆ
9. โรคทางเดินอาหารบางชนิด ที่ไม่ใช่โรคแผลในกระเพาะอาหาร ได้แก่ Ulcerative colitis ,

Crohn's disease

10. โรคตับบางชนิด เช่น Subacute Hepatic Necrosis, Chronic active Hepatitis, ตับอักเสบจากแอลกอฮอล์ และตับแข็ง ในสตรีที่ไม่ดื่มสุรา

11. โรคมะเร็ง ในโรค Lymphoblastic Leukemia มะเร็งเต้านม
12. ป้องกันอาเจียนในผู้ที่ได้รับยาต้านมะเร็ง
13. ภาวะแคลเซียมในเลือดสูง
14. โรคโลหิตจางบางชนิด ได้แก่ Immuno-hemolytic anemia
15. การปลูกถ่ายอวัยวะ เพื่อให้เกิดการยอมรับอวัยวะผู้อื่นดีขึ้น
16. ใช้ร่วมกับยา Revlimid ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคเนื้องอก
17. ช่วยรักษาอาการ Acute Mountain Sickness (AMS) ซึ่งเป็นอาการป่วยระดับเริ่มต้นของอาการป่วยบนที่สูง เนื่องจากการได้รับปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอ
18. อื่นๆ อีกหลายอย่าง

2.1.3.2 โทษของเดกซามทาโซน

1. ยามีฤทธิ์กดการทำงานของต่อมหมวกไต ห้ามหยุดยาอย่างทันที หลังจากใช้เป็นระยะเวลา
2. เกิดลักษณะของผู้ที่ได้รับยาสเตียรอยด์นานๆ ที่เรียกว่า Cushing's Syndrome คือ มีอาการบวม ท้องลาย สิว ผิวน้ำขึ้น ความดันโลหิตสูง อ่อนแรง เหนื่อย ขนขึ้นตามตัว ฯลฯ
3. คิดเชื่องช้าขึ้น เพราะยากระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่คอยต่อต้านเชื้อโรค
4. กดการเจริญเติบโตในเด็ก
5. เกิดความดันโลหิตสูง ระดับโพแทสเซียมในเลือดต่ำ
6. กล้ามเนื้ออ่อนแรง ผิวน้ำขึ้นบาง ลีบ
7. เกิดภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำ ภาวะกระดูกพรุน
8. ความดันในลูกตาเพิ่มทำให้เป็นต้อหิน
9. เลนส์กระจกตาขุ่น เกิดต้อกระจก
10. ภาวะไขมันในเลือดสูง
11. ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง
12. อารมณ์และพฤติกรรมเปลี่ยนแปลงง่าย
13. คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร ทางเดินอาหารระคายเคือง เกิดแผลในกระเพาะอาหาร
14. เกิดเชื้อราในช่องปากง่ายขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. ถ้าใช้ยามานาน แล้วหยุดยาทันทีเกิดอาการถอนยา ทำให้เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน อ่อนล้า ปวดศีรษะ มีไข้ ปวดข้อ ปวดกล้ามเนื้อ น้ำหนักตัวลดลง ความดันโลหิตต่ำ

16. รับประทานผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ เช่น กคผลการทดสอบภูมิแพ้ทางผิวหนัง อื่นๆ ได้แก่ แผลหายช้า เกิดหือเลือด ฟกช้ำง่าย มีไขมันสะสมมากที่ตับ ตับอ่อนอักเสบ มีขนขึ้นมาก ประจำเดือนผิดปกติ หรืออาจไม่มีประจำเดือน ลดความรู้สึกทางเพศในผู้ชาย

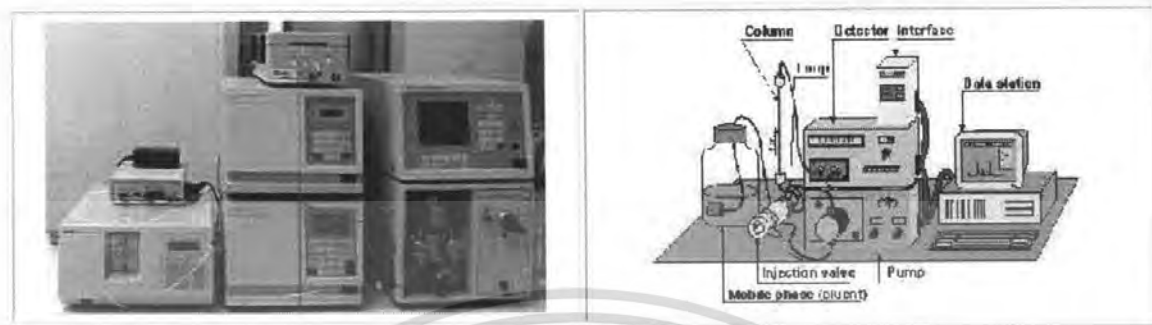
2.2 หลักการของโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

เทคนิค HPLC นี้ เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่เป็นของเหลวจะถูกบีบผ่านคอลัมน์แยกสาร ที่เป็นท่อบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) เมื่อตัวอย่างซึ่งเป็นองค์ประกอบหลายชนิดละลายอยู่ในรูปของเหลว จะถูกนำเข้าสู่ระบบปกติโดยการฉีดด้วยปริมาตรจำกัดที่จุดฉีด (Injector) ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ และแพร่กระจายเข้าสู่ระบบการไหล หน้าที่ของเฟสเคลื่อนที่ คือ ล้างตัวอย่างในขณะไหลผ่านคอลัมน์ ทำให้เกิดการแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดออกจากกัน อันเนื่องมาจากความแตกต่างของแรงที่เกิดเนื่องด้วยอันตรกิริยาขององค์ประกอบกับเฟสอยู่กับที่ และเฟสเคลื่อนที่ แต่ละองค์ประกอบจะใช้เวลาตั้งแต่เริ่มฉีด จนกระทั่งออกจากปลายคอลัมน์ ซึ่งเป็นเวลาส่วนใหญ่ของการเดินทาง เป็นช่วงเวลาที่เป็นคุณสมบัติเฉพาะตัว (Characteristic time) ของแต่ละสาร แต่อย่างไรก็ดีต้องระมัดระวังว่าภายใต้สภาวะแวดล้อมของการแยกนั้น สารบางชนิดที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน อาจจะใช้เวลาแยกใกล้เคียงกันจนเกิดการทับซ้อนกันได้ กฎโดยทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับการแยก คือ องค์ประกอบใดที่สามารถเกิดอันตรกิริยา หรือสามารถกระจายตัวอยู่ในชั้นของเฟสอยู่กับที่ได้ดีกว่าก็จะใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์ได้นานกว่า และในทางตรงกันข้าม สารใดที่มี interaction หรือสามารถกระจายตัวอยู่ในชั้นของเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่า ก็จะถูกชะ (elute) ออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า หรือใช้เวลาในคอลัมน์น้อยกว่านั่นเอง

2.2.1 ลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

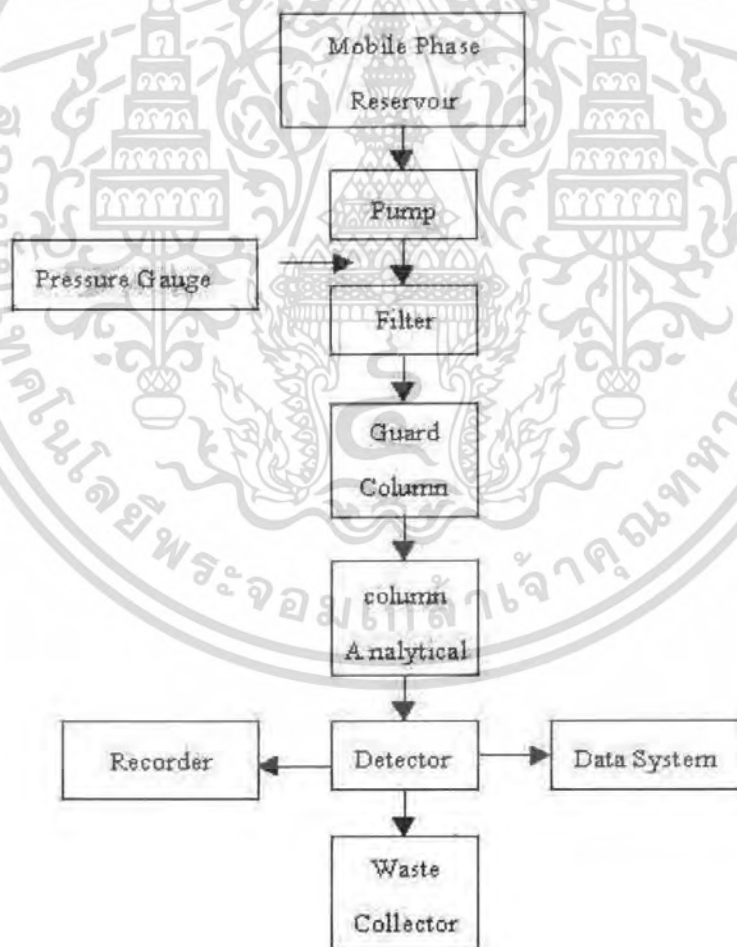
HPLC สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิด เช่น สารอินทรีย์ สารประกอบทางชีวภาพ โพลีเมอร์ คูอิแนนทิโอเมอร์ สารประกอบที่เสถียรสภาพได้ง่าย สารประกอบที่ระเหยยาก ไอออนขนาดเล็ก ไมโครโมเลกุล ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ต้องเป็นของแข็งหรือของเหลว ต้องละลายได้ 100 % (กรองด้วย) การแยกสารจะประสบความสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อสารมีอัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์ สารประกอบที่ถูกแยกนั้นจะเคลื่อนที่ไปตามความยาวทั้งหมดของคอลัมน์ โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวพาไป

2.2.2 ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC ที่สำคัญมีดังนี้



รูปที่ 2.2 เครื่องโครมาโทกราฟแบบของเหลวสมรรถนะสูง

HPLC ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ที่สำคัญและหน้าที่มีดังนี้



รูปที่ 2.3 ส่วนประกอบของเครื่องโครมาโทกราฟแบบของเหลวสมรรถนะสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.1. ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase reservoir)

เป็นขวดสำหรับใส่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ความจุประมาณ 1 ลิตร แต่ใน Preparative HPLC ความจุของขวดควรจะมากกว่านี้ และจะมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ จุดประสงค์ของการไล่อากาศ คือ ต้องการกำจัดแก๊สออกซิเจนซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ การไล่แก๊สจะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นสารมีขั้ว (Polar solvents) เครื่อง HPLC ของบางบริษัทสามารถใช้กับระบบที่ไม่ต้องไล่แก๊สก่อนได้



รูปที่ 2.4 ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่

2.2.2.2. ระบบของปั๊ม (Pumping System)

ใน มีความต้านทานการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ที่จะไหลผ่านคอลัมน์ซึ่งมีอนุภาคขนาดเล็ก บรรจุอยู่ ความต้านทานการไหลที่ว่าจะมากเมื่อใช้อนุภาคเล็กๆและคอลัมน์มีขนาดเล็กอีกด้วย จึงจำเป็นต้องใช้ความดันที่สูงดันเฟสเคลื่อนที่ให้ไหลไป

ปั๊มแบ่งออกเป็น 2 ชนิด

1. Mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่มีค่าคงที่
2. Pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่มีค่าคงที่

2.2.2.3 Guard column

เหมือนกับคอลัมน์จึงคัดสารที่ไม่สามารถถูกชะ หรืออนุภาคเล็กๆ เพื่อยืดอายุของคอลัมน์

2.2.2.4 Column

ลักษณะทั่วไป

- คอลัมน์ทำด้วยสแตนเลสตีล
- เส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก
- เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1,3,4.6 mm
- ความยาว 10,12.5,15,25 cm
- ขนาดอนุภาค 3,5,10 μm
- ปิดหัว-ท้ายด้วย Stainless steel gauze
- Reducing unions

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายในคอลัมน์จะบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งจนเต็ม ซึ่งอนุภาคนี้จะต้องบรรจุให้แน่นและไม่มีช่องว่าง จะต้องใช้ปั๊มช่วยให้ตัวทำละลายไหลผ่าน อุณหภูมิของคอลัมน์สามารถควบคุมได้โดยการติดตั้งคอลัมน์ไว้ใน Heater Column ปัจจุบันคอลัมน์มีขนาดเล็กถึงเรียกว่า Micro bore column



รูปที่ 2.5 คอลัมน์ของเครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

2.2.2.5 เครื่องตรวจวัด (Detector)

สิ่งที่ต้องการ คือ ความไวของเครื่องตรวจวัดซึ่งสามารถตรวจวัดสิ่งที้ออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้น เครื่องตรวจวัดในอุดมคติควรมีลักษณะดังนี้

- มีความไวสูง และให้สัญญาณตอบรับ (response) ที่คาดคะเนได้
- ให้สัญญาณตอบรับ (response) ได้กับสารทุกชนิด
- ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่
- เชื้อถือได้และง่ายต่อการใช้งาน
- ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นและสัญญาณตอบรับของเครื่องตรวจวัดควรมีสภาพเชิงเส้น (linearity) ในช่วงกว้าง
- ไม่ทำลายสาร
- ให้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณภาพวิเคราะห์สำหรับพิกที่ต้องการตรวจสอบ

เครื่องตรวจวัดที่ใช้ในการวิจัย คือ ยูวี-วิสิเบิล ดีเทคเตอร์ (UV-VIS Detectors)

อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง ลักษณะที่พิเศษ คือ ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลและอุณหภูมิ แต่ค่อนข้างมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ ยูวี-วิสิเบิลที่นิยมใช้ใน HPLC แบ่งเป็น 3 ชนิด

1. Fixed-wavelength UV detector
2. Variable UV-VIS detector
3. Photodiode-array detector

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 เครื่องตรวจวัด

2.2.2.6 ส่วนประเมินผลข้อมูล (Data system)

เป็นส่วนที่แปลงสัญญาณ analog เป็น digital

2.2.2.7 ส่วนที่ทิ้งของเสีย (Waste)

2.2.3 ข้อปฏิบัติในการใช้เครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์ [2]

1. การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ น้ำที่นำมาใช้ในการเตรียมควรเลือกใช้น้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง เช่น น้ำกลั่น 2 ครั้ง หรือ 3 ครั้ง และปราศจากไอออนชนิดต่าง ๆ สำหรับสารเคมีที่ใช้ เช่น Methanol ควรใช้เกรด HPLC grade เมื่อผสมเฟสเคลื่อนที่เสร็จแล้วต้องกรองผ่าน membrane filter ขนาด $0.45 \mu\text{m}$ สำหรับ membrane filter ก็ต้องเลือกให้ถูกว่าชนิดใดใช้กรอง aqueous mobile phase ได้ ชนิดใดใช้กรอง organic solvent หลังจากกรองแล้วนำเฟสเคลื่อนที่ ไปทำการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เช่น แก๊สออกซิเจน จุดประสงค์ของการไล่อากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ ก็คือ ต้องการกำจัดแก๊สออกซิเจน ซึ่งอาจทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ หรือแม้แต่นับเฟสอยู่กับที่ที่อยู่ในคอลัมน์ นอกจากนั้น ยังเป็นการลดโอกาสที่ทำให้เกิดฟองอากาศ (bubble) ในเครื่องตรวจวัดขณะทำการทดลองอยู่ การไล่อากาศที่ละลายอยู่นี้จะต้องทำเมื่อตัวทำละลายเป็นพวกสารมีขั้ว (polar solvent) กำจัดแก๊สที่ละลายในตัวทำละลาย (degas) อาจใช้การ Sonicare ในเครื่อง Ultrasonic ประมาณ 15 นาที หรือผ่าน gas helium 15 นาที

2. เมื่อเตรียมสารตัวอย่างเสร็จแล้วก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC จะต้องกรองผ่าน membrane filter ขนาด $0.45 \mu\text{m}$ ทุกครั้ง เพื่อป้องกันการอุดตันที่หัวคอลัมน์ ซึ่งทำให้ความดันสูงกว่าปกติ

3. ก่อนฉีดสารตัวอย่าง ต้องรอกอลัมน์ถึงจุดสมดุลด้วยเฟสเคลื่อนที่ก่อน โดยดูจาก baseline บนเครื่องบันทึกผลที่ต่อกับตัวตรวจวัด

4. ก่อนฉีดสารตัวอย่างควรตรวจสอบรอยรั่วต่าง ๆ รวมทั้งที่ eng fittings ของคอลัมน์ด้วย ซึ่งโดยมากมักมีรอยรั่วเพียงเล็กน้อย และตรวจพบได้ก็ต่อเมื่อใช้มือแตะจะรู้สึกเย็น เนื่องจากตัวทำละลายระเหยออกไป ถ้ามีการรั่วเกิดขึ้นมักจะทำให้ระดับ baseline ยกขึ้น มีอากาศเข้าไปในระบบ และอาจมี

ผลกระทบต่อค่าความสูงและพื้นที่ของพีก ทำให้การหาปริมาณแต่ละครั้งไม่เท่ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ไม่ควรขันข้อต่อของคอลัมน์แน่นเกินไป เพราะจะทำให้เกลียวของ fittings เป็นรอยจนร้าวได้ ซึ่งถึงแม้จะขันต่อไปอีกก็ไม่สามารถหยุดยั้งได้ เมื่อมีรอยร้าวเกิดขึ้นควรขันเพิ่มอีกเพียงเล็กน้อย และถ้ายังร้าวอยู่ควรถอดออกมาทั้งหมดแล้วจึงใส่กลับเข้าไปใหม่

6. การเลือกคอลัมน์และตัวตรวจวัด เลือกคอลัมน์ให้เหมาะสมกับงาน ในกรณีที่เริ่มใช้คอลัมน์ โดยไม่รู้ประวัติคอลัมน์นั้นเลย ให้ล้างคอลัมน์ (ไม่ต้องต่อเข้า Detector) ก่อนตามวิธีที่เหมาะสม ส่วนตัวตรวจวัดควรเลือกให้เหมาะสมกับสารที่จะวิเคราะห์

7. การใช้คอลัมน์ในงาน HPLC ควรหลีกเลี่ยง หรือป้องกันการเปลี่ยนแปลงความดัน อุณหภูมิ และสัดส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่โดยกะทันหัน เนื่องจากจะทำให้เกิดการจัดตัวของอนุภาคสารที่บรรจุ ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดช่องว่างในคอลัมน์ ควรเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลเป็นขั้น ๆ ขั้นละ 0.1 ml/min เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงความดันอย่างกะทันหัน (pressure shock) ควรใช้เวลาหลาย ๆ นาทีในการให้คอลัมน์อยู่ที่ความดันปกติของการทำงาน และปล่อยให้ความดันค่อย ๆ ลดลงมา เมื่อต้องการให้ปั๊มเล็กทำงาน การใช้ Guard column สามารถช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ เนื่องจากจะมีแผ่นกรองที่มีขนาดรูอนุภาคประมาณ 0.5 μm ทำหน้าที่กรองอนุภาคที่อาจหลุดลอดมาจากขั้นตอนการกรองตัวอย่าง และขณะเดียวกันก็เป็นการกรองเฟสเคลื่อนที่ซ้ำอีกครั้ง

8. เพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ ไม่ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มี pH สูงหรือต่ำมาก ควรใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มี pH อยู่ในช่วง 3.5 – 6.5

9. ตรวจสอบว่าอัตราการไหลคงที่หรือไม่ โดยสังเกตจากความดัน ถ้าคงที่ จึงเริ่มวิเคราะห์ได้ ถ้ายังไม่คงที่อาจมีปัญหาที่การไล่อากาศไม่ดีพอ ต้องทำการไล่อากาศใหม่

10. ไม่ควรเก็บคอลัมน์ไว้ในที่ชื้นหรืออุณหภูมิที่ทำให้คอลัมน์ และอนุภาคเกิดการขยายและหดตัวกลับไปกลับมา เพราะจะทำให้เกิดช่องว่างขึ้นในคอลัมน์ ดังนั้นควรเก็บที่อุณหภูมิระหว่าง 15 – 30 องศาเซลเซียส และเก็บในสภาพเปียก เช่น เก็บคอลัมน์ประเภท Liquid solid chromatography ด้วยตัวทำละลายที่แห้ง หรือเก็บคอลัมน์ประเภท Reversed phase ในตัวทำละลายอินทรีย์ 100% เป็นต้น ถ้าเก็บคอลัมน์ไว้นานเกิน 1 สัปดาห์ ควรเก็บด้วยตัวทำละลายดังต่อไปนี้

| | |
|------------------------------|---|
| คอลัมน์ประเภท Normal phase | เฮกเซน ไอโซออกเทน |
| คอลัมน์ประเภท Reversed phase | เมทานอล อะซิโตน ไทรล์ |
| คอลัมน์ประเภท Ion exchange | น้ำ + 0.005% sodium azide หรือ 50% เมทานอลในน้ำ |

2.3 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

J.M. Lemus Gallego และ J. Perez Arroyo [6] กล่าวถึงงานวิจัยที่ได้ศึกษาการวิเคราะห์หาเดกซามธาโซนฟอสเฟตและไตรมีโทพริม โดยเทคนิค HPLC การแยกสารตัวอย่างทำได้โดยใช้คอลัมน์ C_{18} และใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ผสม acetonitrile- NaH_2PO_4 (10mM)(70:30, v/v) (pH3) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่และปริมาณสารที่ฉีดคือ 1ml/min และ 20 μ L ตามลำดับ ชีตจำกัดในการหาปริมาณของแต่ละสารประกอบมีค่าประมาณ 0.25 mg/l วิธีการวิเคราะห์นี้ได้นำไปประยุกต์ใช้ในสารผสมสังเคราะห์และใช้ในการวิเคราะห์ทางยา การวิเคราะห์ทำได้โดยการเตรียมสารละลายสต็อกซึ่งผลที่ได้นำไปเทียบกับค่าเฉลี่ยจากวิธีการเดิมสารมาตรฐานผลที่ได้จาก 2 วิธีมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งพิสูจน์ได้ว่าค่าที่ได้จากการทดลองอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ โดยใช้ขบวนการวิเคราะห์จากงานวิจัยนี้

H.Hashem และ TH. Jira [4] ได้กล่าวถึงกระบวนการนี้เป็นการอธิบายการสกัด, แยกและวิเคราะห์หาปริมาณของสเตียรอยด์ 3 ชนิด ในขามเม็ด (Triamcinolone, Prednisolone และ Dexamethsone) การสกัดโดยใช้ Solid phase extraction (SPE) บนเข็ม RP-18 สารสเตียรอยด์ตรวจสอบโดยใช้ HPLC Chromatographic separation เป็นการนำเอา Chromolith โดยใช้ Performance RP-18e column ทำการ pack วัสดุที่มี monolithic ประกอบ สารแทรกผ่านโดยซิลิกา ใช้ isocratic binary mobile phase ของสารละลายเมทานอล และน้ำ ในอัตรา 1:1 Diode array detector วัดที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร การ validated นี้เป็นการทำสำหรับระบบที่เหมาะสม ค่าความเป็นเส้นตรง, แม่นยำ, ชีตจำกัดในการตรวจวัด, จำเพาะเจาะจง, ความคงที่และค่าความผิดพลาด ชีตจำกัดในการตรวจสอบคือ 6.25, 6.25, และ 12.50 นาโนกรัมต่อปริมาณสารตัวอย่าง 25 μ L ตามลำดับ ค่า recovery ของวิธีวิเคราะห์นี้มีค่าระหว่าง 89 และ 101% และค่าการทำซ้ำอยู่ในช่วง 6.86

M.Spangler และ E. Mularz [5] กล่าวว่ากระบวนการวิเคราะห์ด้วย HPLC ชนิดใหม่สำหรับการวิเคราะห์สารเดกซามธาโซน สิ่งปนเปื้อนที่ทำให้คุณภาพผลิตภัณฑ์ต่ำลง และผลิตภัณฑ์สารกันเสีย หากค่าความเป็นเส้นตรงของยาที่มีสารเดกซามธาโซนได้จาก 3 สภาวะ โดยใช้เครื่อง UV detection ที่ 240 nm และทำการวิเคราะห์เช่นนี้กับตัวอย่างที่เหลือ 2 ชนิด ค่าชีตจำกัดของปริมาณที่ตรวจวัดได้ (LOQ) ของเดกซามธาโซนที่เจือปนในยาคือ 0.05% และ 0.1% ในการตรวจวัดเดกซามธาโซนที่ทำให้คุณภาพผลิตภัณฑ์ต่ำ วิธีนี้ได้แสดงค่าความเป็นเส้นตรง ความเที่ยงและค่าความผิดพลาด การเตรียมตัวอย่างทำได้ง่ายและให้ความสมบูรณ์โดยไม่ต้องใส่สาร internal standard เดกซามธาโซนไป จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพต่ำหลาย ชนิดจึงตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ได้

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่

3.1.1 สารเคมี

1. สารมาตรฐานเดกซาเมทาโซน (Dexamethasone, $C_{22}H_{29}FO_5$) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Fluka Chemika
2. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodiumdihydrogenphosphate, NaH_2PO_4) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Fisher Chemicals
3. โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassiumhydroxide, KOH) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Asia Pacific Chemicals Limited CAN 000 316 138
4. อะซิโตรไนล์ (Acetonitrile, CH_3CN) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Fisher Scientific
5. เมทานอล (Methanol, CH_3OH) เกรดวิเคราะห์ บริษัท Fisher Scientific
6. น้ำปราศจากไอออน (deionized water)

3.1.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. เครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC) บริษัท Waters ; 515 HPLC Pump ; waters486 Tunable Absorbance Detector
2. เครื่องชั่งน้ำหนัก
3. เครื่อง pH meter
4. ถ้วยบดสาร
5. อุปกรณ์เครื่องแก้ว

3.1.3 สถานที่ดำเนินการวิจัย

ห้อง อ.514 ชั้น 5 อาคารวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยี
พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การเตรียมสารละลาย [3]

3.2.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) เข้มข้น 0.048 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตจำนวน 7.4885 กรัม อย่างละเอียด ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน เทใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกริมาตร

3.2.2 การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้มข้น 0.5 โมลาร์

ชั่งโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์จำนวน 2.8055 กรัม อย่างละเอียด ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน เทใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกริมาตร

3.2.3 สารละลายบัฟเฟอร์

นำสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.048 โมลาร์ ที่เตรียมได้ในข้อ 3.2.1 มาปรับ pH ให้เท่ากับ 5.4 โดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่เตรียมได้ในข้อ 3.2.2

3.2.4 สารละลายเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase)

สารละลายเฟสเคลื่อนที่เตรียม โดย ผสมสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.3 อะซีโตนไนโตรล์ และเมทานอล ในอัตราส่วน 1.73 : 1.16 : 1 ตามลำดับ กรองสารละลายผสมภายใต้ระบบสุญญากาศผ่านกระดาษกรองไนลอนที่มีความละเอียด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำมาไล่อากาศโดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic bath) เป็นเวลา 30 นาที

3.2.5 สารละลายมาตรฐานเดกซามิทาโซน เข้มข้น 200 ppm

ชั่งเดกซามิทาโซนจำนวน 0.0200 กรัม อย่างละเอียด ละลายในสารละลายเฟสเคลื่อนที่ที่เตรียมได้ในข้อ 3.2.4 เทใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ กรองสารละลายผสมภายใต้ระบบสุญญากาศผ่านกระดาษกรองไนลอนที่มีความละเอียด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำมาไล่อากาศ โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic bath) เป็นเวลา 30 นาที

3.2.6 สารละลายมาตรฐานเดกซามิทาโซน เข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm

ปีปตสารละลายมาตรฐานเดกซามิทาโซน เข้มข้น 200 ppm มา 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 และ 25.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ กรองสารละลายผสมภายใต้ระบบสุญญากาศผ่านกระดาษกรองไนลอนที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความละเอียด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำมาไล่อากาศ โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic bath) เป็นเวลา 30 นาที

3.2.7 สารละลายตัวอย่างจากยาถูกกลอน

บดยาลูกกลอนให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักยาลูกกลอนที่บดละเอียดแล้ว 0.1200 กรัม อย่างละเอียด ละลายในสารละลายเฟสเคลื่อนที่ที่เตรียมได้ในข้อ 3.2.4 เทใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ กรองสารละลายผสมภายใต้ระบบสุญญากาศผ่านกระดาษกรองไนลอนที่มีความละเอียด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำมาไล่อากาศ โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic bath) เป็นเวลา 30 นาที

3.2.8 สารละลาย spiked sample

เปิดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 3.2.7 มา 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนเข้มข้น 100 ppm ลงในปริมาตรที่เท่ากับที่คาดว่าความเข้มข้นของ spiked sample มีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นของเดกซาเมทาโซนที่มีในตัวอย่างยา ลูกกลอน ปรับปริมาตรให้ถึงขีดบอกปริมาตรด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ กรองสารละลายผสมภายใต้ระบบสุญญากาศผ่านกระดาษกรองไนลอนที่มีความละเอียด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำมาไล่อากาศ โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic bath) เป็นเวลา 30 นาที

3.3 เตรียมกราฟมาตรฐานเดกซาเมทาโซน

ฉีดสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนที่เตรียมจากข้อ 3.2.6 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยเรียงลำดับจากความเข้มข้นน้อยไปมาก และแต่ละความเข้มข้นทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง สภาวะของเครื่องโครมาโทกราฟแบบของเหลวสมรรถนะสูง ที่ใช้เป็นดังนี้

- คอลัมน์ : C₁₈ reverse phase kingsorb 5 μm C₁₈ (150 mm × 4.6 mm i.d.)
- เฟสเคลื่อนที่ : สารละลายบัฟเฟอร์ : อะซีโทไนล์ : เมทานอล
(1.73 : 1.16 : 1)
- อัตราการไหล : 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที
- เครื่องตรวจวัด : ยูวี-ดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่นที่ 254 นาโนเมตร

พลอตกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้น กับความเข้มข้นของเดกซาเมทาโซน

3.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Validation of Analytical Method) [1]

ทำได้โดยใช้หลักทางสถิติประเมินผลดังนี้

3.4.1 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

การตรวจสอบการตอบสนองความเป็นเส้นตรง ทำได้โดยนำผลที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานเดกซามเทาโซนที่แต่ละระดับความเข้มข้น (20, 40, 60, 80 และ 100 ppm) ซ้ำ 3 ครั้ง ในข้อ 3.3 พล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้น (แกน X) กับความเข้มข้นของเดกซามเทาโซน (แกน Y) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, R^2) จาก

$$R^2 = \left\{ \frac{N \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{[(N \sum x^2) - (\sum x)^2] - [(N \sum y^2) - (\sum y)^2]} \right\}^2 ; N = \text{จำนวนตัวอย่าง}$$

3.4.2 การศึกษาความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ ทำได้โดยฉีดสารละลายมาตรฐานเดกซามเทาโซนที่ความเข้มข้น 60 ppm ที่เตรียมได้ในข้อ 3.2.6 โดยทำซ้ำ 7 ครั้ง นำผลที่ได้มาคำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) และค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative standard deviation, % RSD) จากสมการต่อไปนี้

$$\text{Mean} = \bar{X} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\%RSD = \left(\frac{SD}{\bar{X}} \right) \times 100$$

3.4.3 การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความถูกต้อง ทำได้โดยฉีดสารละลาย spiked sample ที่เตรียมได้ในข้อ 3.2.8 และสารละลายตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารละลายมาตรฐานเดกซามเทาโซน โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery)

$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ spiked sample เฉลี่ย} - \text{ความเข้มข้นของตัวอย่างเริ่มต้นเฉลี่ย}}{\text{ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป}} \times 100$

$$\text{หรือ } \% \text{ Recovery} = \frac{C_{\text{spiked sample}} - C_{\text{original sample}}}{C_{\text{add}}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ หรือขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ โดยมีความถูกต้อง และความเที่ยงที่ยอมรับได้ (Limit of quantification, LOQ)

การหาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ ทำได้โดยนิตสารละลายมาตรฐานเดกซามะทาโซนที่เตรียมได้ในข้อ 3.2.6 แล้วนำผลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเฉลี่ยที่ตรวจวัดได้ กับความเข้มข้นของสารละลายเดกซามะทาโซนมาตรฐาน แล้วคำนวณค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ จากสมการต่อไปนี้

$$\text{LOD} = \frac{3S_{x/y}}{\text{slope}} \quad \text{และ} \quad \text{LOQ} = \frac{10S_{x/y}}{\text{slope}}$$

เมื่อ $S_{x/y}$ คือ จุดตัดแกน y

3.5 การตรวจวัดปริมาณเดกซามะทาโซนในสารละลายตัวอย่างยาลูกกลอน

นิตสารละลายตัวอย่างยาลูกกลอนที่เตรียมจากข้อ 3.2.7 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นหาปริมาณเดกซามะทาโซนในตัวอย่างยาลูกกลอน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

107900

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

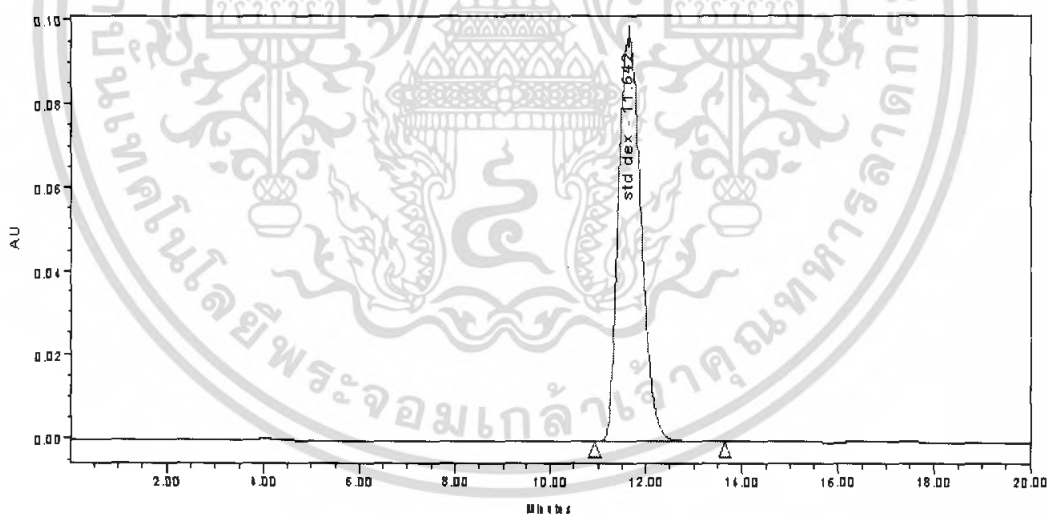
บทที่ 4

ผลการทดลอง และการอภิปรายผล

จากงานวิจัยนี้ได้รับผลการทดลองซึ่งพอสรุปได้ดังนี้

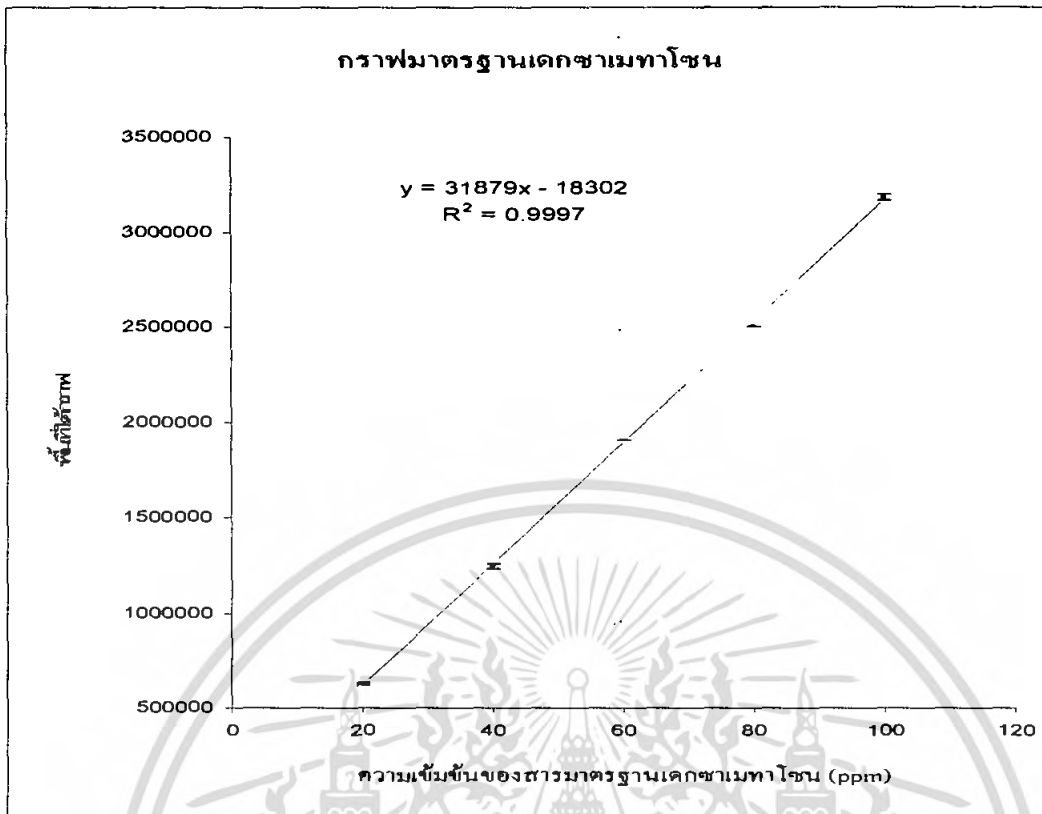
4.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายเดกซามेटาโซน

กราฟมาตรฐานเดกซามेटาโซนเตรียมได้จากการนำสารละลายมาตรฐานเดกซามेटาโซนที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ (20, 40, 60, 80 และ 100 ppm) ที่ครอบคลุมความเข้มข้นของเดกซามेटาโซนในตัวอย่างยาถูกกลอนมาฉีดเข้าเครื่องโครมาโทกราฟแบบของเหลวสมรรถนะสูง โครมาโทแกรมที่ได้มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 4.1 สารเดกซามेटาโซนถูกแยกออกที่เวลาประมาณ 11.00 นาที (retention time, t_R) และนำพื้นที่ใต้พีคที่ได้มาพลอตกราฟกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเดกซามेटาโซน ได้กราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงดังแสดงในรูปที่ 4.2 เมื่อใช้วิธี Linear least square ได้สมการเส้นตรง คือ $y = 31879x - 18302$ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9997 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จากนั้นนำสมการเส้นตรงที่ได้นี้ไปใช้ในการหาปริมาณเดกซามेटาโซนในตัวอย่างในขั้นขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเดกซามेटาโซนเข้มข้น 100 ppm ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 กราฟมาตรฐานสารละลายเดกชาเมทาโซน

4.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Validation of Analytical Method)

4.2.1 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) สามารถทำได้โดยนำสารละลายมาตรฐานเดกชาเมทาโซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 20-100 ppm มาทำการวัดหาปริมาณเดกชาเมทาโซน นำผลที่ได้จากการวิเคราะห์มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของความเข้มข้น กับความเข้มข้นของเดกชาเมทาโซน ได้กราฟดังแสดงในรูปที่ 4.2 เมื่อใช้วิธี Linear least square ได้สมการเส้นตรง คือ $y = 31879x - 18302$ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9997 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้ (R^2 ไม่น้อยกว่า 0.990)

ตารางที่ 4.1 แสดงความเข้มข้น (ppm) และพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานเดกซามะทาโซน

| ความเข้มข้นของ สารละลาย มาตรฐานเดกซามะ ทาโซน (ppm) | พื้นที่ใต้กราฟ | | | |
|---|----------------|------------|------------|--------------------------|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | $\bar{X} \pm SD$ |
| 20 | 631992.00 | 624626.50 | 627199.00 | 627939.20 ± 3738.12 |
| 40 | 1259018.00 | 1229888.50 | 1245496.00 | 1244801.00 ± 14577.19 |
| 60 | 1906308.00 | 1905602.00 | 1910781.00 | 1907564.00 ± 2808.56 |
| 80 | 2507989.00 | 2507561.50 | 2506479.00 | 2507343.00 ± 778.32 |
| 100 | 3197005.00 | 3171191.00 | 3185542.00 | 3184579.00 ± 12933.90 |

4.2.2 การศึกษาความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

การศึกษาความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์ สามารถทำได้โดยนำสารละลายมาตรฐานเดกซามะทาโซนมาหนึ่งความเข้มข้นแล้วทำการวัดซ้ำ 7 ครั้ง นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) และค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative standard deviation, % RSD)

สารละลายมาตรฐานเดกซามะทาโซนที่นำมาศึกษาหาความเที่ยง คือ สารละลายมาตรฐานเดกซามะทาโซนเข้มข้น 60 ppm ผลที่ได้จากการวัดซ้ำ 7 ครั้ง แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 ซึ่งค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 1937005.00 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 9818.14 และค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.5069 ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำ แสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยงดี

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์

| ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน เดกซามेटาโซน (ppm) | พื้นที่ใต้กราฟ | ค่าเฉลี่ย | ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน | % RSD |
|--|----------------|-----------|---------------------|--------|
| 60 | 1936308 | 1937005 | 9818.1370 | 0.5069 |
| | 1945602 | | | |
| | 1930908 | | | |
| | 1955026 | | | |
| | 1932052 | | | |
| | 1927706 | | | |
| | 1921433 | | | |

4.2.3 การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์ สามารถทำได้โดยการตรวจวัดปริมาณเดกซามेटาโซนใน spiked sample และตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารมาตรฐานลงไป ทำการตรวจวัดซ้ำ 3 ครั้ง ได้ร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery)

ตัวอย่างยาที่ถูกกลอนที่นำมาศึกษาหาความถูกต้อง คือ ยาเหงือกปลาหมอ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ แสดงไว้ในตารางที่ 4.3 ซึ่งได้ค่าร้อยละของการคืนกลับเท่ากับ 104.23 % จะเห็นว่าค่าร้อยละของการคืนกลับอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (อยู่ในช่วง 95 -105 %)

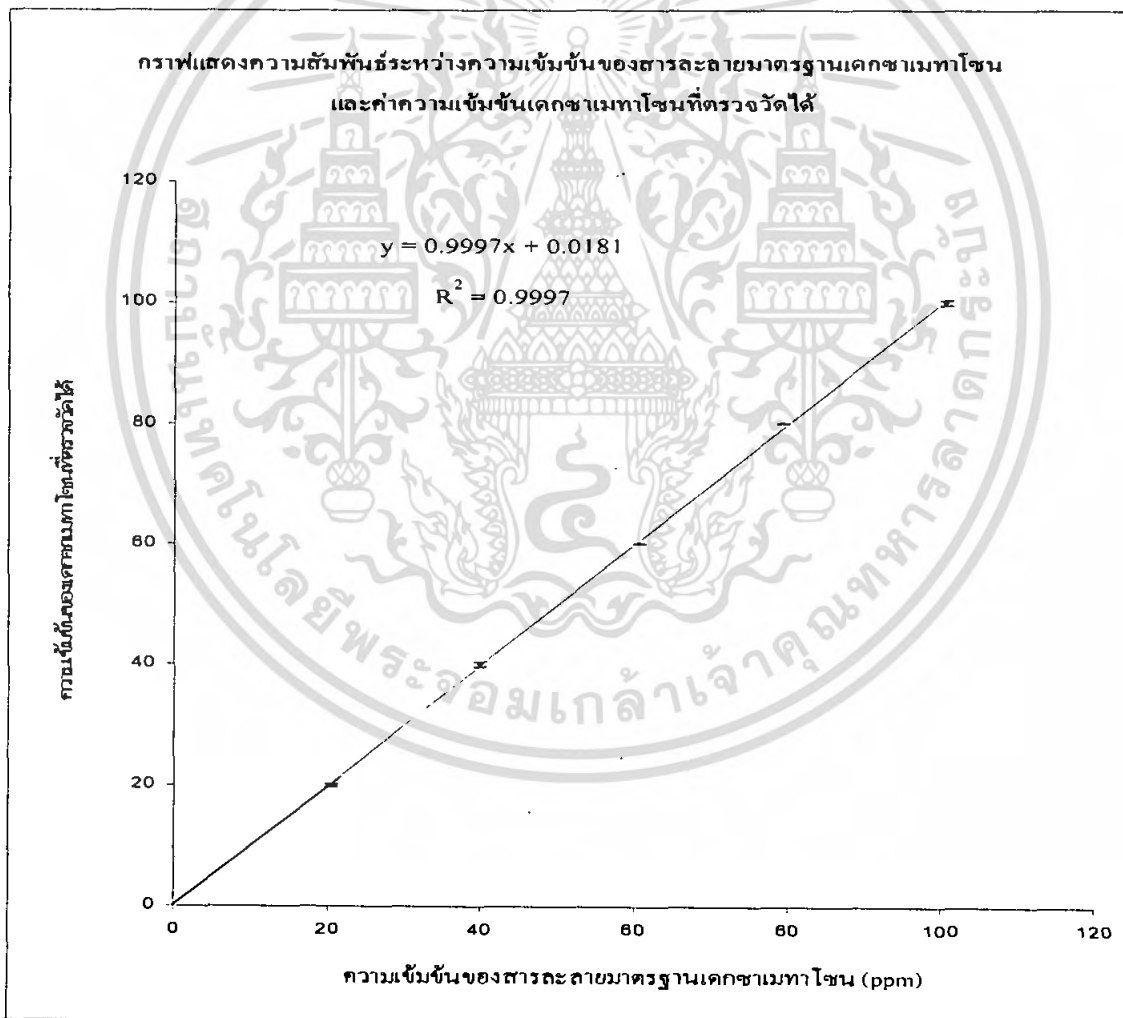
ตารางที่ 4.3 แสดงผลการวัดปริมาณเดกซามेटาโซนใน original sample และ spiked sample และค่าร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery)

| ตัวอย่างยา ถูกกลอน | C_{standard} (ppm) | $C_{\text{spiked sample}}$ (ppm) | $C_{\text{spiked sample}}$ เฉลี่ย (ppm) | C_{sample} (ppm) | C_{sample} เฉลี่ย (ppm) | % Recovery |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------------------|---|------------------------------|--|------------|
| ยาเหงือก ปลาหมอ | 7.6 | 13.6521 | 13.3314 | 5.7531 | 5.4101 | 104.23 |
| | | 13.3568 | | 5.3485 | | |
| | | 12.9852 | | 5.1288 | | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ หรือขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ โดยมีความถูกต้อง และความเที่ยงที่ยอมรับได้ (Limit of quantification, LOQ)

การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of quantification, LOQ) สามารถทำได้โดยนำสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 20-100 ppm มาทำการตรวจวัดปริมาณเดกซาเมทาโซน นำผลที่ได้จากการวิเคราะห์มาพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเฉลี่ยของเดกซาเมทาโซนที่ตรวจวัดได้ กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซน ได้กราฟดังแสดงในรูปที่ 4.3 สมการเส้นตรง คือ $y = 0.9997x + 0.0181$ นำค่าที่ได้จากกราฟ (ค่าจุดตัดแกน y และค่าความชัน) มาคำนวณ LOD และ LOQ ได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก.3.4 ซึ่งได้ค่า LOD เท่ากับ 0.0543 และ LOQ เท่ากับ 0.1811



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ กับความเข้มข้นของเดกซาเมทาโซน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การตรวจวัดปริมาณเดกซามิทาโซนในยาลูกกลอน

นำสารละลายตัวอย่างยาลูกกลอนที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังแสดงในหัวข้อ 3.2.7 มาตรวจวัดปริมาณเดกซามิทาโซนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยแต่ละตัวอย่างทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณเดกซามิทาโซนในยาลูกกลอน

| ตัวอย่างยาลูกกลอน | $\bar{X} \pm SD$ (mg/g) |
|-----------------------|----------------------------|
| ยาเหงือกปลาหมอ | 5.89 ± 0.03 |
| ยาสมุนไพรรพญามือเหล็ก | 3.13 ± 0.02 |
| ยาคลายเส้นวัดโพธิ์ | 10.20 ± 0.12 |

$\bar{X} \pm SD$ คือ ปริมาณเดกซามิทาโซนเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าปริมาณเดกซามิทาโซนที่มีอยู่ในยาลูกกลอนนั้นมีในปริมาณมาก โดยตัวอย่างยาลูกกลอนที่มีปริมาณเดกซามิทาโซนมากที่สุดที่นำมาวิเคราะห์ คือ ยาคลายเส้นวัดโพธิ์ รองลงมา คือ ยาเหงือกปลาหมอ และยาสมุนไพรรพญามือเหล็ก ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณเดกซามิทาโซนอยู่เท่ากับ 10.20 ± 0.12 , 5.89 ± 0.03 และ 3.13 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อยาลูกกลอนหนึ่งกรัม ตามลำดับ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการตรวจวัดปริมาณสเตียรอยด์ ชนิดเดกซามेटาโซนในยาลูกกลอนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งทางคณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสเตียรอยด์ ชนิดเดกซามेटาโซนในยาลูกกลอน และเปรียบเทียบปริมาณเดกซามेटาโซนในยาลูกกลอนที่มาจากแหล่งผลิตต่าง ๆ กัน นอกจากนี้ยังต้องการตรวจสอบประสิทธิภาพ และความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ว่าเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความเที่ยง และความถูกต้องในการให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ และยอมรับได้หรือไม่ ซึ่งสามารถสรุปผลการวิเคราะห์ได้ดังนี้

สภาวะที่เหมาะสมของเครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้แยก และตรวจวัดปริมาณเดกซามेटาโซนในยาลูกกลอน คือ ใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 5.4) สารละลายอะซีโตไนโตรล์ และสารละลายเมทานอล โดยมีอัตราส่วนเป็นดังนี้ 1.73 : 1.16 : 1 ตามลำดับ ด้วยอัตราการไหลของสารละลายเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมีเครื่องตรวจวัดเป็นยูวี-ดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ผลการวิเคราะห์พบว่า ได้โครมาโทแกรมที่มีความคมชัด โดยเดกซามेटาโซนมีเวลาการคงไว้ที่ประมาณ 11.00 นาที กราฟมาตรฐานเดกซามेटาโซนที่ได้มีสมการเส้นตรง คือ $y = 31879x - 18302$ และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.9997 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตัวอย่างที่นำมาทำการวิเคราะห์ คือ ยาลูกกลอน ทำการเตรียมได้โดยนำยาลูกกลอนมาละลายกับสารละลายเฟสเคลื่อนที่ และทำการเจือจางให้เหมาะสม หลังจากนั้นนำไปตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ได้ผลดังนี้ ยาคลายเส้นวัดโพธิ์ ยาเหงือกปลาหมอ และยาสมุนไพรมือเหล็ก มีปริมาณเดกซามेटาโซนอยู่เท่ากับ 10.20 ± 0.12 , 5.89 ± 0.03 และ 3.13 ± 0.02 มิลลิกรัมต่อยาลูกกลอนหนึ่งกรัม ตามลำดับ

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบว่า

ความสัมพันธ์เชิงเส้น มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9997

ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งบ่งบอกได้ด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 9818.14 และค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ มีค่าเท่ากับ 0.5069 %

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งบ่งบอกได้ด้วยร้อยละการคืนกลับ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 104.23 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ มีค่าเท่ากับ 0.0543 และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ มีค่าเท่ากับ 0.1811

สรุปได้ว่า จากค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น ความเที่ยง และความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่จัดว่าอยู่ในเกณฑ์ดี และยังสามารถตรวจวัดปริมาณแคชมาเมทาโซนได้ในระดับต่ำถึงหนึ่งในล้านส่วน (ppm) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงที่มีความเหมาะสมในการหาปริมาณแคชมาเมทาโซนในตัวอย่างต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี และให้ผลที่น่าเชื่อถือได้

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างยาลูกกลอนพบว่า ยาลูกกลอนที่มีปริมาณแคชมาเมทาโซนมากที่สุดในตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์ คือ ยาลูกกลอนชนิดเม็ด 100 เม็ด ร่องลงมา คือ ยาเหน็บอิมพลาหมอน และยาสมุนไพรพญามือเหล็ก ตามลำดับ ซึ่งตัวอย่างยาลูกกลอนที่นำมาวิเคราะห์ มีปริมาณแคชมาเมทาโซนเกินกว่าปริมาณที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนดไว้ (0.5 มิลลิกรัมต่อยาลูกกลอนหนึ่งกรัม)

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากเครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง มีความไวสูงจึงต้องล้างอุปกรณ์เครื่องแก้วให้สะอาดทุกครั้ง เพื่อป้องกันความผิดพลาดจากสารปนเปื้อน
2. ก่อนที่จะนำสารละลายมาวิเคราะห์ต้องทำการกรองด้วยกระดาษกรองในลอนที่มีความละเอียด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำมาไล่อากาศ โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก (Ultrasonic bath) เป็นเวลา 30 นาที เพื่อป้องกันสารปนเปื้อน
3. ก่อนที่จะทำการฉีดสารจะต้องไล่ฟองอากาศในไซริงค์ออกก่อนทำการฉีดสาร เพื่อป้องกันการรบกวนการวิเคราะห์
4. หลังจากทำการวิเคราะห์แล้ว ทำการล้างคอลัมน์ด้วยน้ำปราศจากไอออน และสารละลายเมทานอล อย่างละ 30 นาที เพื่อป้องกันการสะสมของสารในคอลัมน์
5. การล้างอุปกรณ์ทุกครั้งควรแช่ และล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็นน้ำสุดท้ายทุกครั้ง

เอกสารอ้างอิง

- [1] คณิตา ตั้งคณานุรักษ์ เอกสารประกอบการสอนวิชาการวิเคราะห์ทางเคมี และควบคุมคุณภาพ
ผลิตภัณฑ์
- [2] อรุณี คงศักดิ์ไพศาล เอกสารประกอบการสอนวิชาการบำรุงรักษาเครื่องมือวิเคราะห์
- [3] M.s. Iqbal, M.A. Shad, M.W. Ashral, M. Bilal, M. Saeed, Development and Validation of an HPLC Method for the Determination of Dexamethasone, Dexamethasone Sodium Phosphate and Chloramphenicol in Presence of Each Other in Pharmaceutical Preparations, Chromatographia, 2006, vol. 64, no. 3-4, 219-222.
- [4] H.Hashem, TH. Jira, Chromatographic Application on Monoclinic Column : Determination of Triamcinolone, Prednisolone and Dexamethasone in Pharmaceutical Tablet Formulation Using a SPE, Chromatographia, 2005, vol. 61, no. 3-4, 133-136.
- [5] M.Spangler, E. Mularz, A validated, stability-indicating method for the assay of dexamethasone in drug substance and drug productanalyses, and the assay of preservative in drug product, Chromatographia, 2001, vol. 54, no. 5-6, 329-334.
- [6] J.M. Lemus Gallego, J. Perez Arroyo, Simultaneous determination of dexamethasone and betamethasone in pharmaceuticals by reversed-phase HPLC, Chromatographia, 1994, vol. 39, no. 9-10, 329-334.

ค้นเมื่อวันที่ 15 ธันวาคม 2550

<http://www.kmitl.ac.th/sisc/>

http://www.geocities.com/HotSprings/Bath/8143/drug_steroid.html

<http://www.springerlike.com>

<http://www.ist.cmu.ac.th/riseat/nl/2004/07/02.php>

<http://library.dip.go.th/multim6/edoc/16730.pdf>

http://www.pharm.chula.ac.th/clinic101_5/article/fadditive.htm

<http://bisd.dip.go.th/agro/HTML/eBooking/elementinfood.ppt#256,1,Slide%201>

http://www.bangkokhealth.com/consult_htdoc/Question.asp?GID=78055

<http://dormicum.multiply.com/reviews/item/13>

<http://www.geocities.com/omfsesan/injectnerve.htm>

<http://www.geocities.com/vichiena/new/steroids.htm>

http://chiangmaitox.org/datalink_1/tab2.php?send=7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

ค้นเมื่อวันที่ 6 กุมภาพันธ์ 2551

<http://www.thaipr.net/nc/printprnews.aspx?newsid=A54A08AADD6D65C6521289BF50E47556>

<http://service.cmtc.ac.th/board/index.php?board=5;action=display;threadid=1207>

http://med_sakolhospital.tripod.com/sle.html

<http://www.forumtown.net/phanomgon-about16.html>

<http://pcog.pharmacy.psu.ac.th/thi/Article/2546/04-46/04-46.html>

http://www.drugs.com/search.php?searchterm=dexamethasone&is_main_search=1

<http://www.dmsc.moph.go.th/indexmain.html>

<http://ed2547.thaifda.com/>

<http://www.thaifda.com/ed2547/ed-list.asp>

<http://www2.fda.moph.go.th/ed2547/generic-list.asp>

<http://www2.fda.moph.go.th/ed2547/generic-search.asp>

<http://elib.fda.moph.go.th/elib/cgi-bin/opacexe.exe?op=kwx&qst=@9376,@9377,^,@2004,^,@15786,-&wa=D0238C8&lang=0&db=Main&pat=%a1%cd%a7%a4%c7%ba%a4%d8%c1%c2%d2&cat=gen&skin=u&lpp=85&catop=&scid=zzz&nx=85>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

แสดงผลการวิเคราะห์

ก.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเดกซามิทาโซน

ตารางที่ ก.1 แสดงความเข้มข้น (ppm) และพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานเดกซามิทาโซน

| ความเข้มข้นของ สารละลาย มาตรฐานเดกซามิทา โซน (ppm) | พื้นที่ใต้กราฟ | | | |
|---|----------------|------------|------------|--------------------------|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | $\bar{X} \pm SD$ |
| 20 | 631992.00 | 624626.50 | 627199.00 | 627939.20 ± 3738.12 |
| 40 | 1259018.00 | 1229888.50 | 1245496.00 | 1244801.00 ± 14577.19 |
| 60 | 1906308.00 | 1905602.00 | 1910781.00 | 1907564.00 ± 2808.56 |
| 80 | 2507989.00 | 2507561.50 | 2506479.00 | 2507343.00 ± 778.32 |
| 100 | 3197005.00 | 3171191.00 | 3185542.00 | 3184579.00 ± 12933.90 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (Validation of Analytical Method)

ก.2.1 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

ตารางที่ ก.2 แสดงผลการวัดหาปริมาณเดกซาเมทาโซน และพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐาน
เดกซาเมทาโซน

| ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเดกซาเมทาโซน (ppm) | ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ (ppm) | | | | พื้นที่ใต้กราฟ | | | |
|---|--------------------------------|------------|------------|--------------------------|----------------|------------|------------|------------------------------|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | $\bar{X} \pm SD$ | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | $\bar{X} \pm SD$ |
| 20 | 20.3988 | 20.1678 | 20.2485 | 20.2717 ± 0.1173 | 631992.00 | 624626.50 | 627199.00 | 627939.20 ± 3738.12 |
| 40 | 40.0678 | 39.1540 | 39.6436 | 39.6218 ± 0.4573 | 1259018.00 | 1229888.50 | 1245496.00 | 1244801.00 ± 14577.19 |
| 60 | 60.3724 | 60.3502 | 60.5127 | 60.4117 ± 0.0881 | 1906308.00 | 1905602.00 | 1910781.00 | 1907564.00 ± 2808.56 |
| 80 | 79.2462 | 79.2328 | 79.1989 | 79.2260 ± 0.0244 | 2507989.00 | 2507561.50 | 2506479.00 | 2507343.00 ± 778.32 |
| 100 | 100.8579 | 100.0500 | 100.5001 | 100.4699 ± 0.4057 | 3197005.00 | 3171191.00 | 3185542.00 | 3184579.00 ± 12933.90 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2.2 การศึกษาความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์

ตารางที่ ก.3 แสดงค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์

| ความเข้มข้นของ สารละลายมาตรฐาน เดกซามโทโซน (ppm) | พื้นที่ใต้กราฟ | ค่าเฉลี่ย | ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน | % RSD |
|---|---|-----------|-------------------------|--------|
| 60 | 1936308 1945602 1930908 1955026 1932052 1927706 1921433 | 1937005 | 9818.1370 | 0.5069 |

คำนวณค่าพื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย

$$\text{จาก } \bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$\bar{X} = \frac{1936308 + 1945602 + 1930908 + 1955026 + 1932052 + 1927706 + 1921433}{7}$$

$$\bar{X} = 1937005$$

คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$$\text{จาก } SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$SD = \sqrt{\frac{(1936308 - 1937005)^2 + (1945602 - 1937005)^2 + (1930908 - 1937005)^2 + (1955026 - 1937005)^2 + (1932052 - 1937005)^2 + (1927706 - 1937005)^2 + (1921433 - 1937005)^2}{7-1}}$$

$$SD = 9818.1370$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

$$\text{จาก } \%RSD = \left(\frac{SD}{\bar{X}} \right) \times 100$$

$$\%RSD = \left(\frac{9818.1370}{1937005} \right) \times 100$$

$$\%RSD = 0.5069$$

ก.2.3 การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

ตารางที่ ก.4 แสดงผลการวัดปริมาณแคชมาเมทาโซนใน *original sample* และ *spiked sample* และค่าร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery)

| ตัวอย่างยา ลูกกลอน | C _{standard} (ppm) | C _{spiked sample} (ppm) | C _{spiked sample} เฉลี่ย (ppm) | C _{sample} (ppm) | C _{sample} เฉลี่ย (ppm) | % Recovery |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------------------|---|------------------------------|--|------------|
| ยาเหงือก ปลาหมอ | 7.6 | 13.6521 | 13.3314 | 5.7531 | 5.4101 | 104.23 |
| | | 13.3568 | | 5.3485 | | |
| | | 12.9852 | | 5.1288 | | |

คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ทำเช่นเดียวกับข้อ ก.1.2

คำนวณค่าร้อยละของการคืนกลับ (% Recovery)

$$\text{จาก } \% \text{ Recovery} = \frac{C_{\text{spiked sample}} - C_{\text{original sample}}}{C_{\text{add}}} \times 100$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{13.3314 - 5.4101}{7.6} \times 100$$

$$\% \text{ Recovery} = 104.2276\%$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2.4 การศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ หรือขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ โดยมีความถูกต้องและความเที่ยงที่ยอมรับได้ (Limit of quantification, LOQ)

ตารางที่ ก.5 แสดงผลการวัดความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเดกซามิทาโซน เพื่อหาค่า LOD และ LOQ

| ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเดกซามิทาโซน (ppm) | ความเข้มข้นที่ตรวจวัดได้ (ppm) | | | ความเข้มข้นเฉลี่ย (ppm) |
|---|--------------------------------|------------|------------|-------------------------|
| | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | |
| 20 | 20.3988 | 20.1678 | 20.2485 | 20.2717 |
| 40 | 40.0678 | 39.1540 | 39.6436 | 39.6218 |
| 60 | 60.3724 | 60.3502 | 60.5127 | 60.4117 |
| 80 | 79.2462 | 79.2328 | 79.1989 | 79.2260 |
| 100 | 100.8597 | 100.0500 | 100.5001 | 100.4699 |

คำนวณค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ทำเช่นเดียวกับข้อ ก.1.2

คำนวณค่า LOD และ LOQ

นำค่าเฉลี่ยมาสร้างกราฟ ได้กราฟรูปที่ 4.4 ที่มีสมการเส้นตรงเท่ากับ $y = 0.9997x + 0.0181$

$$\text{จาก } LOD = \frac{3S_{x/y}}{\text{slope}}$$

$$LOD = \frac{3 \times 0.0181}{0.9997}$$

$$LOD = 0.0543$$

$$\text{จาก } LOQ = \frac{10S_{x/y}}{\text{slope}}$$

$$LOQ = \frac{10 \times 0.0181}{0.9997}$$

$$LOQ = 0.1811$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.3 การวิเคราะห์ปริมาณเดกซาเมทาโซนในยาลูกกลอน

ตารางที่ ก.6 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณเดกซาเมทาโซนในยาลูกกลอน

| ตัวอย่างยา ลูกกลอน | น้ำหนักยา ลูกกลอน (g) | ความเข้มข้นเดกซาเมทาโซนใน สารละลายตัวอย่างยาลูกกลอน (ppm) | | | ปริมาณเดกซาเมทาโซนในยา ลูกกลอน 1 กรัม (mg) | | | $\bar{X} \pm SD$ (mg/g) |
|---------------------------------|-----------------------------|---|------------|------------|---|------------|------------|----------------------------|
| | | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | ครั้งที่ 1 | ครั้งที่ 2 | ครั้งที่ 3 | |
| ยาเหงือกปลา หมอ | 0.1210 | 7.0977 | 7.1369 | 7.1728 | 5.8659 | 5.8983 | 5.9279 | 5.8973 ± 0.0310 |
| ยาสมุนไพร นางพญามือ เหล็ก | 0.1200 | 3.7341 | 3.7919 | 3.7732 | 3.1117 | 3.1599 | 3.1444 | 3.1387 ± 0.0246 |
| ยาคลายเส้นวัด โพธิ์ | 0.1217 | 12.4828 | 12.2499 | 12.5263 | 10.2571 | 10.0657 | 10.2928 | 10.2052 ± 0.1221 |

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณเดกซาเมทาโซนในยาลูกกลอน 1 กรัม

ตัวอย่างยาเหงือกปลาหมอ

จากผลการวิเคราะห์ที่ได้จากเครื่องโครมาโทกราฟีแบบสมรรถนะสูง โดยชั่งตัวอย่างยาลูกกลอนมา 0.1201 กรัม วัดครั้งที่ 1 ได้ 7.0977 ppm แสดงว่า

ในสารละลาย 1000 มิลลิลิตร มีปริมาณเดกซาเมทาโซน 7.0977 มิลลิกรัม

ในสารละลาย 100 มิลลิลิตร มีปริมาณเดกซาเมทาโซน $\frac{7.0977 \times 100}{1000} = 0.7098$ มิลลิกรัม

ในยาลูกกลอน 0.1210 กรัม มีปริมาณเดกซาเมทาโซน 0.7098 มิลลิกรัม

ในยาลูกกลอน 1 กรัม มีปริมาณเดกซาเมทาโซน $\frac{0.7098 \times 1}{0.1201} = 5.8659$ มิลลิกรัม

ตัวอย่างอื่น ๆ คำนวณเช่นเดียวกัน

เมื่อคำนวณปริมาณเดกซาเมทาโซนในยาลูกกลอน 1 กรัม ทั้งหมดแล้ว ทำการคำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดทั้ง 3 ครั้ง ของการชั่งตัวอย่าง 1 ครั้ง นำค่าที่ได้มาทำการคำนวณค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานรวมของตัวอย่าง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



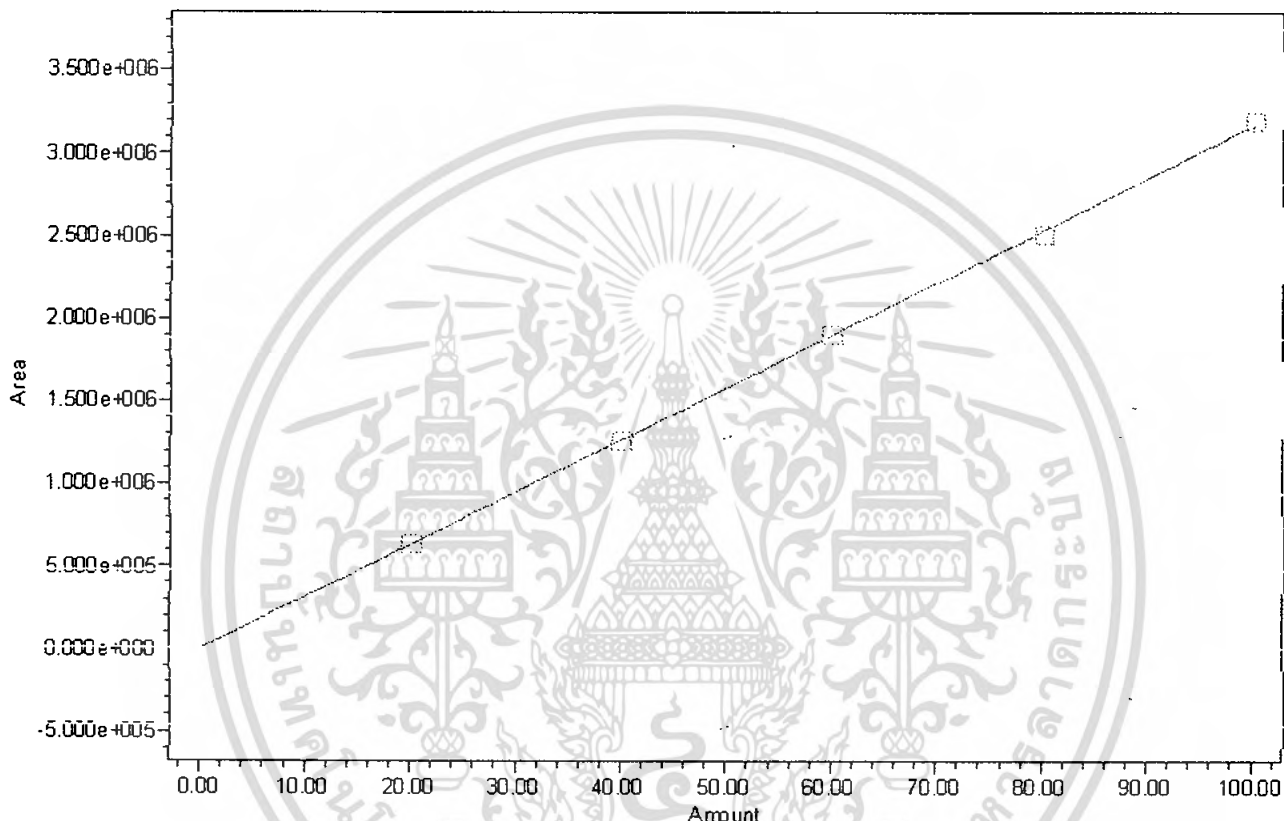
Calibration Information

Name std dex
 System 486
 Channel 486
 Fit Type Linear thru Zero

A 0.000000e+000
 R 3.171448e+004
 C 0.000000e+000
 D 0.000000e+000
 R² 0.999604

Calibration Id 62848
 Date Calibrated 01/28/2008 12:13:15 PM
 Time 11.623
 Processing Method Jutathip

Calibration Plot



Peak: std dex

| | Name | Level | X Value | Response | Calc. Value | % Deviation | Manual | Ignore |
|---|---------|-------|------------|----------------|-------------|-------------|--------|--------|
| 1 | std dex | | 20.000000 | 631992.000000 | 19.927561 | -0.362 | No | No |
| 2 | std dex | | 40.000000 | 1259018.000000 | 39.698517 | -0.754 | No | No |
| 3 | std dex | | 60.000000 | 1906308.000000 | 60.108434 | 0.181 | No | No |
| 4 | std dex | | 80.000000 | 2507909.000000 | 79.000230 | -1.150 | No | No |
| 5 | std dex | | 100.000000 | 3197005.000000 | 100.805832 | 0.806 | No | No |

รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานเดกชาเมทาโซนที่ได้จากเครื่องโครมาโทกราฟแบบของเหลวสมรรถนะสูง

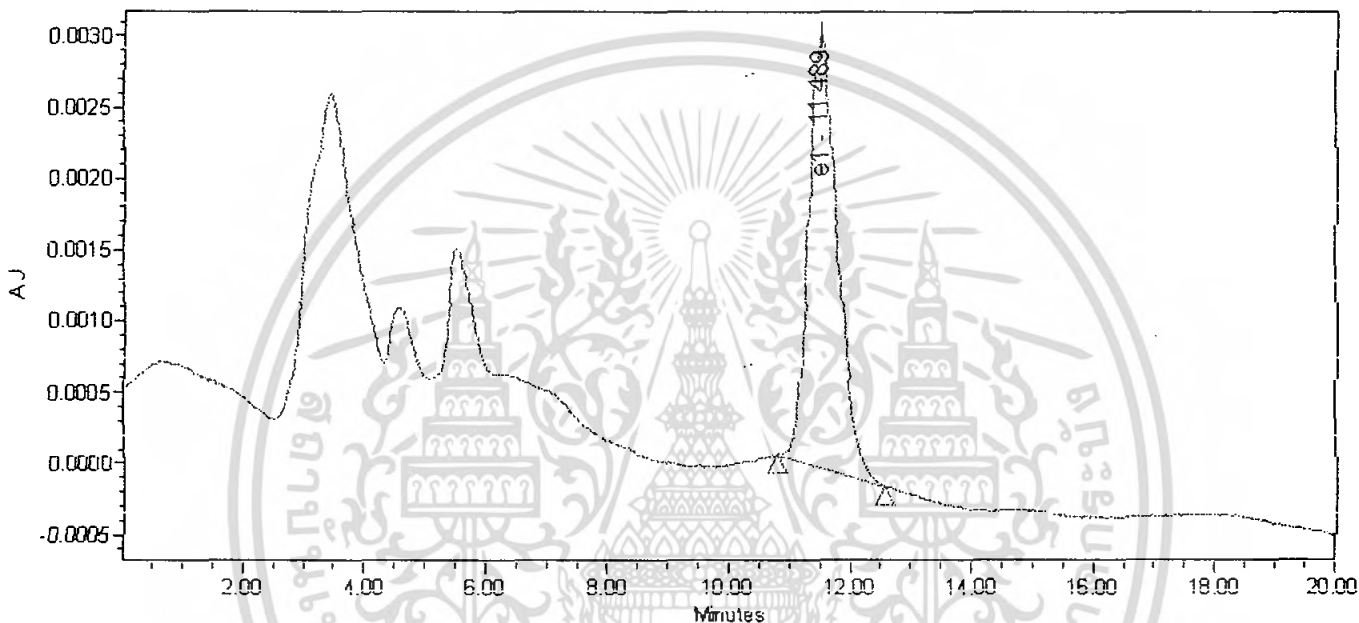
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



SAMPLE INFORMATION

| | | | |
|-------------------|--------------|---------------------|------------------------|
| Sample Name: | e1 | Acquired By: | System |
| Sample Type: | Unknown | Date Acquired: | 03/14/2008 01:48:58 PM |
| Vial: | 1 | Acq. Method Set: | LC_MSET |
| Injection #: | 1 | Date Processed: | 03/14/2008 02:13:27 PM |
| Injection Volume: | 10.00 ul | Processing Method: | sample_e |
| Run Time: | 20.0 Minutes | Channel Name: | 486 |
| Sample Set Name: | sample_e | Proc. Chnl. Descr.: | |

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

| Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|------|----|--------|--------|--------|-------|
| 1 | e1 | 11.489 | 100737 | 3031 | |

รูปที่ ข.2 โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างยาสมุนไพรนางพญามือเหล็ก

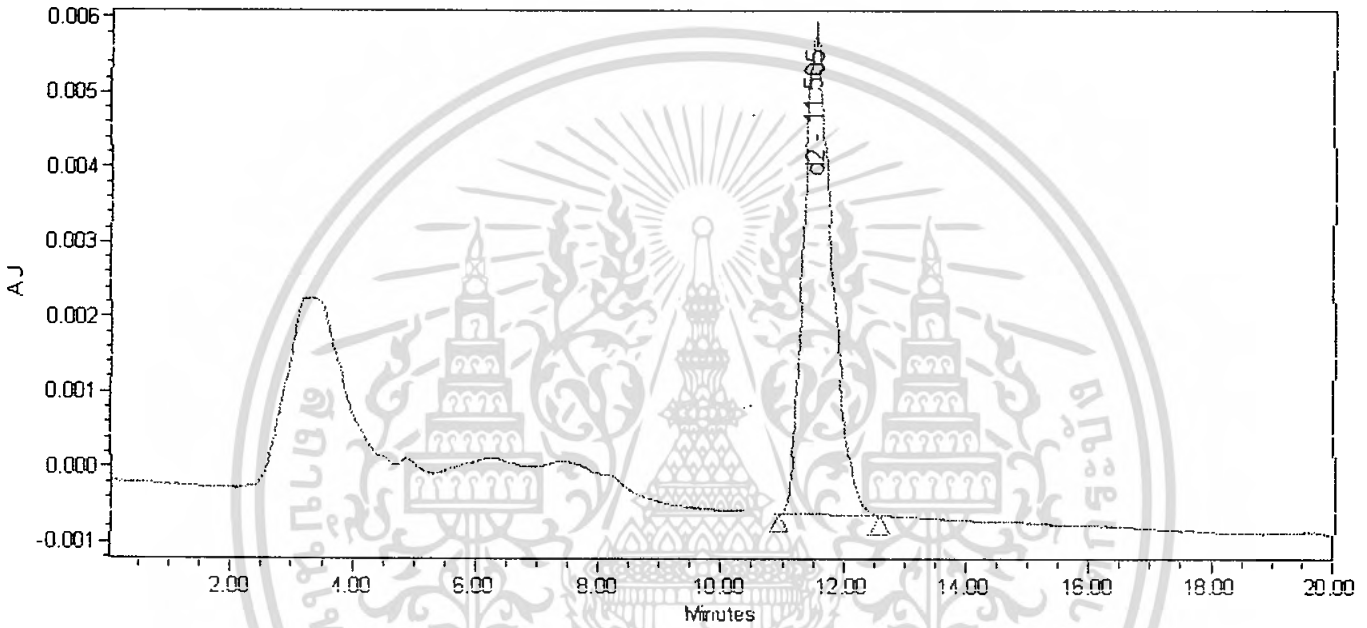
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



SAMPLE INFORMATION

| | | | |
|-------------------|--------------|---------------------|------------------------|
| Sample Name: | d2 | Acquired By: | System |
| Sample Type: | Unknown | Date Acquired: | 03/14/2008 12:44:46 PM |
| Vial: | 2 | Acq. Method Set: | LC_MSET |
| Injection #: | 1 | Date Processed: | 03/14/2008 01:32:28 PM |
| Injection Volume: | 10.00 ul | Processing Method: | sample_d |
| Run Time: | 20.0 Minutes | Channel Name: | 486 |
| Sample Set Name: | sample_d | Proc. Chnl. Descr.: | |

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

| Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|------|----|--------|--------|--------|-------|
| 1 | d2 | 11.505 | 207965 | 6399 | |

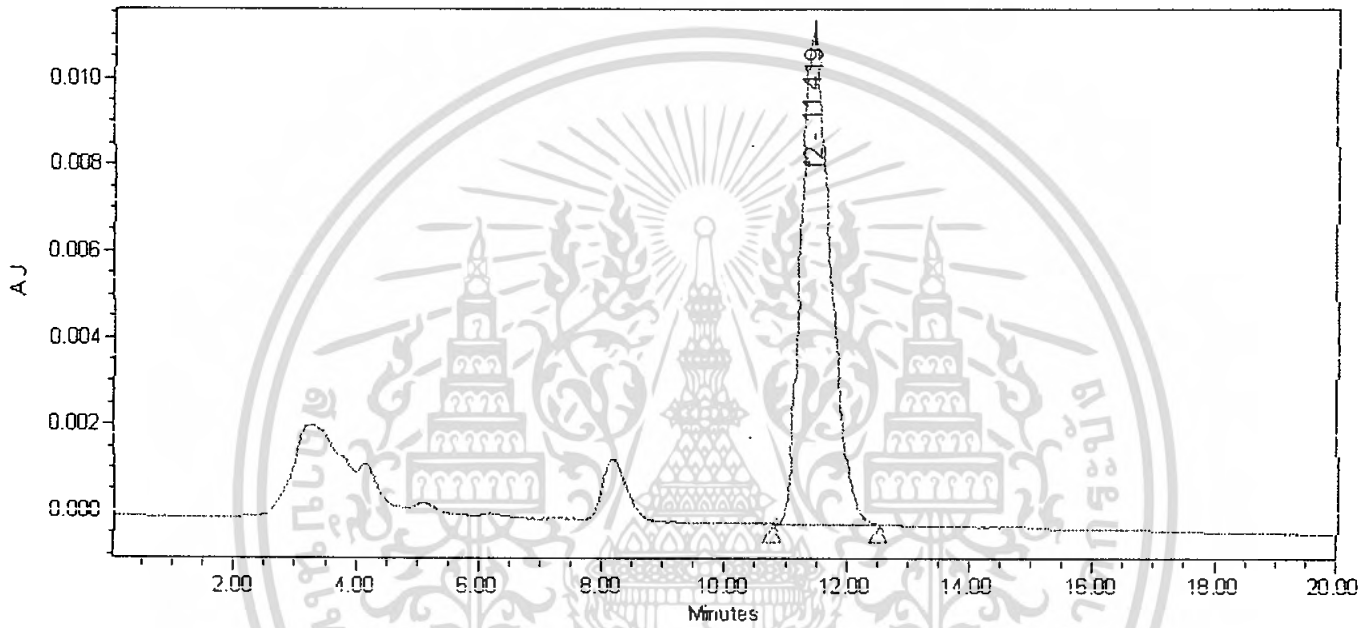
รูปที่ ข.3 โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างยาเหงือกปลาหมอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SAMPLE INFORMATION

| | |
|----------------------------|--|
| Sample Name: f2 | Acquired By: System |
| Sample Type: Unknown | Date Acquired: 03/14/2008 03:16:48 PM |
| Vial: 2 | Acq. Method Set: LC_MSET |
| Injection #: 1 | Date Processed: 03/14/2008 03:40:15 PM |
| Injection Volume: 10.00 ul | Processing Method: sample_f |
| Run Time: 20.0 Minutes | Channel Name: 486 |
| Sample Set Name: sample_f | Proc. Chnl. Descr.: |

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

| Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|------|----|--------|--------|--------|-------|
| 1 | f2 | 11.419 | 379638 | 11312 | |

รูปที่ ข.4 โครมาโทแกรมที่ได้จากตัวอย่างชาคลายเส้นวัดโพธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้