บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. สารเคมีและรีเอเจนต์

สารเคมีใช้ในการศึกษา มีดังนี้

ธีโอฟิลลีน (Theophylline) ของ Aldirch, USA, มีความบริสุทธิ์ 99.90%

แคฟเฟอีน (Caffeine); แวนโคมัยซิน ไฮโดรคลอไรด์ (Vancomycin hydrochloride); เบต้า-ไฮรอกซีเอทิลธีโอฟิลลีน (Beta-hydroxyethyltheophylline) ของ Sigma, USA, มีความบริสุทธิ์ 99.90%

ฟีโนบาร์บิทอล (Phenobarbital); ซัลบูทามอล ซัลเฟต (Salbutamol sulfate); เทอร์บูทาลีน ซัลเฟต (Terbutaline sulfate); คีโททิเฟน ฟูมาเรต (Ketotifen fumarate); เพร็ดนิโซโลน (Prednisolone); เดกซาเมทาโซน โซเดียม ฟอสเฟต (Dexamethasone sodium phosphate); เพนิซิลลิน จี โซเดียม (Penicillin G sodium); แอมพิซิลลิน โซเดียม (Ampicillin sodium); คล็อกซาซิลลิน โซเดียม (Cloxacillin sodium); เซฟาโซลิน โซเดียม (Cefazolin sodium) ได้รับความอนุเคราะห์จากองค์การเภสัชกรรม, มีความบริสุทธิ์อยู่ในช่วง95.00 ถึง 99.00%

เฟนิโทอิน (Phenytoin); ไรแฟมพิซิน (Rifampicin); ลอราซีแฟม (Lorazepam); คลอนาซีแฟม (Clonazepam);ลิโดเคน ไฮโดรคลอไรด์ (Lidocaine hydrochloride) ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, มีความบริสุทธิ์อยู่ในช่วง 95.00 ถึง 99.00%

คาร์บามาซีพีน (Carbamazepine); กรดวาลโปรอิก (Valproic acid);ไดอะซีแฟม (Diazepam); เอฟีดรีน ไฮโดรคลอไรด์ (Ephedrine hydrochloride) ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, มีความบริสุทธิ์อยู่ในช่วง 95.00 ถึง 99.00%

เซฟูรอกซีม อะซีทิล (Cefuroxime axetile); เซฟไตรอะโซน โซเดียม (Ceftriaxone sodium); เซโฟเปอราโซน โซเดียม (Cefoperazone sodium); เซฟาคลอร์ (Cefaclor); เซโฟทาซีม โซเดียม (Cefotaxime sodium) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทสยามเภสัช จำกัด, มีความบริสุทธิ์อยู่ในช่วง 95.00 ถึง 99.00%

โปแตสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต เกรด AR (Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4); ไดโปแตสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต เกรด AR (Dipotassium hydrogen phosphate, K_2HPO_4); กรดฟอสฟอริค เกรด AR (Ortho-phosphoric acid, H_3PO_4); โซเดียม อะซีเตด เกรด AR (Sodium acetate, CH_3COONa); โปแตสเซียม ไฮดรอกไซด์ เกรด AR (Potassium hydroxide); ซิงค์ ซัลเฟต เกรด AR (Zinc sulphate); กรดไตรคลอโรอะซีติค เกรด AR (Trichloroacetic acid) ของ Merck, Germany

รีเอเจนต์ใช้ในการศึกษา มีดังนี้

เมธานอล เกรด HPLC (Methanol); อะซีโตไนไตรล์ เกรด HPLC (Acetonitrile); กรดอะซีติค เกรด AR (Acetic acid glacial, CH_3COOH) ของ Lab Scan Analytical Sciences, Thailand

2. **พลาสมาของคน** ตลอดการศึกษาใช้พลาสมาของคน ซึ่งได้รับอนุเคราะห์จากสภากาชาดไทย โดยเก็บรักษาในช่องแช่แข็งของตู้เย็น (-18±3°C) จนกว่าจะนำมาใช้

3. **เครื่องมือ** เครื่องมือในการศึกษาครั้งนี้ มีดังนี้

ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี (HPLC) (Milton Roy LDC Division, USA) ประกอบด้วย pump, Model CM4100 multiple solvent delivery system ;detector, Model SM4100 programmable wavelength detector และintegrator, Model CI4000 computing integrator

ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโตกราฟี (HPLC) (Shimadzu, Japan) ประกอบด้วย pump, Model LD-10AD solvent delivery system; detector, Model SPD-10A uv-vis detector และintegrator, Model C-R6A Chromatopac integrator

อินเจคเตอร์ ขนาด 20 ไมโครลิตร (Injector; Rheodyne, USA)

HPLC คอลัมน์ (HIQ Sil C18) ขนาด 150X4.6 มิลลิลิตร, i.d. บรรจุด้วยอนุภาค C18 ขนาด 5 ไมโครเมตร

ไดโอดแอเรย์สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (Dioded-array spectrophotometer; Milton Roy,USA)

เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge; Berthold Hermie, Germany)

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH-meter; Consort, Germany)

เครื่องผสมวอร์แทกซ์ (Vortex Mixer; Vorterx-Genie, Scientific Industries , USA)

ตู้เย็น (Sanyo, Japan)

วิธีการศึกษาทดลอง

เพื่อให้ได้วิธีการปฏิบัติในการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของธีโอฟิลลีน แคฟเฟอีน เฟนิโทอิน ฟีโนบาร์บิทอล และแวนโคมัยซิน ในการนำไปใช้ควบคุม และติดตามระดับยาหรือสารของผู้ป่วย ณ สถานพยาบาล

แบ่งการศึกษาทดลองเป็น 3 ขั้นตอน มีดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาและตัว และแคฟเฟอีนในพลาสมา

ขั้นตอนที่ 2 การจัดทำมาตรฐานวิธีการปฏิบัติในการวิเคราะห์ยา และแคฟเฟอีนในตัวอย่างพลาสมา

ขั้นตอนที่ 3 การทดลองปฏิบัติตามมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ

ขั้นตอนที่ 1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาและตัว และแคฟเฟอีนในพลาสมา ประกอบด้วยขั้นตอนย่อย 4 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1.1 การศึกษาทดลองเพื่อให้ได้สภาวะทาง HPLC สำหรับการวิเคราะห์ยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน

ขั้นตอนที่ 1.2 การศึกษาวิธีวิเคราะห์ยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา

ขั้นตอนที่ 1.3 การพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (validate) ของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนที่พัฒนาได้

ขั้นตอนที่ 1.4 การศึกษาระยะเวลาการใช้กราฟเทียบมาตรฐานในการวิเคราะห์ยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา

ขั้นตอนที่ 1.1 การศึกษาทดลองเพื่อให้ได้สภาวะทาง HPLC สำหรับการวิเคราะห์ยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน

หลักการในการศึกษาทดลองเพื่อหาสภาวะทาง HPLC ของแต่ละตัวยา หรือแคฟเฟอีน จะเป็นการกำหนดจากคุณสมบัติทางเคมี กายภาพของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน โดยอิงสภาวะทาง HPLC ของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนที่เคยมีรายงาน พร้อมทั้งปรับ หรือดัดแปลงให้เหมาะสม

การศึกษาทดลอง เพื่อให้ได้สภาวะทาง HPLC ของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน ประกอบด้วย

การเลือกคอลัมน์ที่เหมาะสม

การกำหนดความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับอัลตร้าไวโอเลต ดีเทคเตอร์ (ultraviolet detector)

การคัดเลือกสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

การกำหนดส่วนประกอบที่เหมาะสมของโมบายเฟส

เกณฑ์ประเมินสภาวะทาง HPLC ที่เหมาะสม คือ มีพีคยา หรือแคฟเฟอีน และสารมาตรฐานภายใน ปรากฏภายในโครมาโตแกรม และเวลาที่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ (retention time)ที่ได้ของแต่ละพีคไม่สั้น และนานจนเกินไป

1. **การเลือกคอลัมน์ที่เหมาะสม** การศึกษานี้ได้เลือกใช้คอลัมน์ ที่บรรจุด้วย silica bonded phase ที่ non-polar ที่สุด คือ octadecyl silane (C-18) โดยใช้คอลัมน์ HIQ Sil ขนาด 150X4.6 มิลลิเมตร, i.d. บรรจุด้วยอนุภาค C18 ขนาด 5 ไมโครเมตร เป็นคอลัมน์สำหรับยาแต่ละตัว และแคฟเฟอีน

2. **การกำหนดความยาวคลื่นที่เหมาะสมกับอัลตร้าไวโอเลต ดีเทคเตอร์** เป็นการหาความยาวคลื่นของยา หรือแคฟเฟอีนที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด หรือดูดกลืนแสงเพียงพอที่สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ด้วย HPLC

วิธีการทดลอง เตรียมสารละลายมาตรฐานของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนในเมธานอล ให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปสแกนสเปคตรัมของการดูดกลืนแสงของสารละลายของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน ในช่วงความยาวคลื่น 200-300 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไดโอดแอเรย์สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ ค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด จะถูกนำไปกำหนดเป็นความยาวคลื่นของอัลตร้าไวโอเลตดีเทคเตอร์ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC ซึ่งอาจมีการปรับตามความเหมาะสม เมื่อมีการนำใช้สารมาตรฐานภายในสำหรับการวิเคราะห์ในพลาสมา

3. **การคัดเลือกสารมาตรฐานภายในที่เหมาะสมในการวิเคราะห์** เนื่องจากยาแต่ละตัว และแคฟเฟอีนที่ศึกษานี้ ต้องถูกนำไปกำหนดมาตรฐานวิธีการปฏิบัติการศึกษานี้ จึงพยายามทดลองดูความเป็นไปได้ของการใช้ยา และแคฟเฟอีนที่ไม่ถูกเป็นตัวอย่างในขณะนั้นมาเป็นสารมาตรฐานภายใน เพื่อการควบคุมระดับยา และแคฟเฟอีน ถ้าไม่มียา หรือสารใดสามารถนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน จึงเลือกใช้สารอนุพันธ์ของยา หรือแคฟเฟอีนนั้น มาเป็นสารมาตรฐานภายในแทน ทั้งนี้สารมาตรฐานภายในที่ถูกคัดเลือกมาใช้ ต้องมีคุณสมบัติการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่นของยา หรือแคฟเฟอีนที่ศึกษา จากแนวทางการคัดเลือกสารมาตรฐานภายใน ดังกล่าวข้างต้น สามารถกำหนดสารมาตรฐานภายในของแต่ละตัวยา และแคฟเฟอีน แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สารมาตรฐานภายในที่ถูกคัดเลือกเพื่อการวิเคราะห์

ยา และสาร	สารมาตรฐานภายใน
Theophylline	Beta-hydroxyethyltheophylline
Caffeine	Beta-hydroxyethyltheophylline
Phenytoin	Phenobarbital
Phenobarbital	Phenytoin
Vancomycin	Beta-hydroxyethyltheophylline

4. **การกำหนดส่วนประกอบที่เหมาะสมของโมบายเฟส** เป็นการหาส่วนประกอบที่เหมาะสมของโมบายเฟสในการวิเคราะห์ยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนในสารละลายมาตรฐาน สำหรับการศึกษานี้ใช้เทคนิค reversed-phase HPLC จากการได้พิจารณาคุณสมบัติทางเคมี กายภาพของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนที่ศึกษา ร่วมกับรายงานการวิเคราะห์ยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนที่เคยมี [5, 7, 12, 33-45] ค้นหาส่วนประกอบของโมบายเฟสที่คาดว่าจะสามารถใช้ร่วมกันได้ของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน แล้วกำหนดโมบายเฟสเริ่มแรกในการวิเคราะห์ยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน คือ อะซีโตไนไตรล์: ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.50 โดยที่อัตราส่วนต่อปริมาตรของโมบายเฟสเริ่มแรกแตกต่างกันตามตัวยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนที่ศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 โมบายเฟสเริ่มแรกที่ใช้ในการวิเคราะห์

ยา และสาร	ส่วนประกอบโมบายเฟส (อัตราส่วนของปริมาตร)
Theophylline	Acetonitrile: Phosphate buffer 0.05 M pH 4.50 10:90
Caffeine	Acetonitrile: Phosphate buffer 0.05 M pH 4.50 10:90
Phenytoin	Acetonitrile: Phosphate buffer 0.05 M pH 4.50 30:70
Phenobarbital	Acetonitrile: Phosphate buffer 0.05 M pH 4.50 30:70
Vancomycin	Acetonitrile: Phosphate buffer 0.05 M pH 4.50 10:90

วิธีการทดลอง ฉีดยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนที่ศึกษา และสารมาตรฐานภายใน จากผลการคัดเลือกสารมาตรฐานภายใน ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้โมบายเฟส ดังแสดงในรูปที่ 2 ถ้าโครมาโตแกรมไม่เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด ต้องมีการปรับส่วนประกอบโมบายเฟสใหม่ จนกว่าจะได้ส่วนประกอบโมบายเฟสที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนในสารละลายมาตรฐาน

ขั้นตอนที่ 1.2 **การศึกษาวิธีวิเคราะห์ยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนใน พลาสมา** ประกอบด้วย

การศึกษาวิธีเตรียมตัวอย่างพลาสมา

การปรับสภาวะทาง HPLC ให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน ในพลาสมา

1. **การศึกษาวิธีเตรียมตัวอย่างพลาสมา** ได้เลือกใช้หลักการแยกพลาสมาโปรตีน เพราะทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และไม่สิ้นเปลื้องค่าใช้จ่าย เมื่อเทียบกับการเตรียมตัวอย่างแบบอื่นๆ การศึกษานี้ได้ทดลองใช้อะซีโตไนไตรล์ และเมธานอล เป็นอันดับแรก แต่หากอะซีโตไนไตรล์ และเมธานอล ไม่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง ก็จะนำสารแยกพลาสมาโปรตีนที่มีประจุบวกมาใช้ร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารแยกพลาสมาโปรตีนที่มีประจุลบ มาทดลองใช้ตามลำดับ โดยอิงแนวทางการคัดเลือกจากกระสวนการการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาของยากลุ่มกรดที่มีค่าการจับกับพลาสมาโปรตีนสูง โดยหลักการแยกพลาสมาโปรตีน [46]

การคัดเลือกสารแยกพลาสมาโปรตีน ให้พิจารณาจาก

1. **ลักษณะของตะกอน** ตะกอนพลาสมาโปรตีนที่เกิดขึ้นควรหนัก เมื่อหมุนเหวี่ยงแล้วสามารถแยกสารละลายเหนือตะกอนได้

2. **ลักษณะของสารละลายเหนือตะกอน** ควรเป็นสารละลายที่ใสสะอาด และความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย มีค่า pH อยู่ในช่วง 2-8 สามารถฉีดเข้า HPLC ได้

3. **ลักษณะโครมาโตแกรม** โครมาโตแกรมที่ได้ควรไม่มีการรบกวนของ endogenous substance พีคมีรูปร่างที่ดี ฐานพีคแคบ และเวลาที่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์เหมาะสมของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนที่ศึกษา และสารมาตรฐานภายในไม่นานเกินไป

4. %Physical recovery ค่า %physical recovery ของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน และสารมาตรฐานภายในที่ได้ ต้องไม่น้อยกว่า 60% และไม่มากกว่า 100 % [47-49]

วิธีการทดลอง เตรียมแบลงค์พลาสมา และน้ำที่มีการเติมสารมาตรฐานของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน ให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 2 ตัวอย่าง นำไปแยกพลาสมาโปรตีนตามขั้นตอนเตรียมพลาสมาเพื่อวิเคราะห์ ดังแสดงในรูปที่ 2 สังเกตลักษณะของตะกอนและสารละลายเหนือตะกอน จากนั้นนำสารละลายใสที่แยกได้มาฉีดเข้า HPLC ตามผลทดลองในขั้นตอนที่ 1.1 เมื่อได้โครมาโตแกรม ให้พิจารณาลักษณะโครมาโตแกรมที่ได้ และคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับ (%physical recovery) แสดงในสมการที่ 1

$$\%\text{physical Recovery} = \frac{\text{peak area of the analyte in plasma}}{\text{peak area of the analyte in water}} \times 100 \qquad (1)$$

โดย peak area of the analyte in plasma = พื้นที่ภายใต้พีคของสารที่วิเคราะห์ได้ในพลาสมา

peak area ratio of the analyte in water = พื้นที่ภายใต้พีคของสารที่วิเคราะห์ได้ในน้ำ

รูปที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมพลาสมาเพื่อการวิเคราะห์

ผสมแบลงค์พลาสมา 100 ไมโครลิตร กับสารละลายมาตรฐานของยา หรือแคฟเฟอีน
ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร 10 ไมโครลิตร
↓ผสมโดยการวอร์เทก
เติมสารละลายมาตรฐานภายใน 10 ไมโครลิตร
↓ผสมโดยการวอร์เทก
เติมสารแยกพลาสมาโปรตีน
↓ผสมโดยการวอร์เทก
หมุนเหวี่ยงตัวอย่างพลาสมาด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง
ความเร็ว 15,000 X g ต่อนาที นาน 5-15นาที
↓
นำสารละลายใสเหนือตะกอนมาฉีดเข้า HPLC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การปรับสภาวะทาง HPLC ให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน ในพลาสมา

หากโครมาโตแกรมที่ได้ในการศึกษาเตรียมตัวอย่างพลาสมา ด้วยสภาวะทาง HPLC จากขั้นตอนที่ 1.1 มี endogenous substance รบกวนการวิเคราะห์ ให้ปรับส่วนประกอบของโมบายเฟสให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา โดยปรับส่วนประกอบของโมบายเฟส ไม่ว่าในส่วนตัวดัดแปลงอินทรีย์ pH และความเข้มข้นของฟอสเฟต บัฟเฟอร์ แต่ถ้าวิธีเตรียมตัวอย่างพลาสมาของยา และแคฟเฟอีนที่ศึกษาใดๆ ไม่สามารถเข้ากับฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบในโมบายเฟสได้ จึงเลือกใช้อะซีเตด บัฟเฟอร์ แทนฟอสเฟต บัฟเฟอร์

ขั้นตอนที่ 1.3 การพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนที่พัฒนาได้

วิธีวิเคราะห์ทั้งหมดที่ได้ศึกษาทดลอง สำหรับยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนจากขั้นตอนที่ 1.2 ต้องผ่านการพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ก่อนนำไปกำหนดมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ ตามเกณฑ์ของ Bioanalytical method validation [47-51]

หัวข้อในการทำ Bioanalytical method validation ประกอบด้วย

ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค และความเข้มข้นของยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา (Linearity)

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity and Selectivity)

ความคงตัวของยา หรือแคฟเฟอีน (Stability)

สำหรับขีดจำกัดของการวิเคราะห์หาปริมาณ (Limit of Quantitation) ไม่ได้ศึกษาในที่นี้ เนื่องจากตามเกณฑ์ของ Bioanalytical method validation ถือว่าการติดตามระดับยา และสาร มุ่งเน้นการวิเคราะห์หาปริมาณยา และสารในพลาสมา ซึ่งอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการรักษา และความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดพิษ หรืออาการข้างเคียง มิได้เน้นการวิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นต่ำ [47, 49-50]

1. **ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค และความเข้มข้นของยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา** (Linearity) เป็นการศึกษาเพื่อหาช่วงความเข้มข้นของยาแต่ละตัว และแคฟเฟอีนในพลาสมาที่มีความสัมพันธ์เป็นเชิงเส้นตรงกับอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค

วิธีการทดลอง วิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของตัวยาหรือแคฟเฟอีน จำนวน 3 ชุด ในแต่ละชุดประกอบด้วยความเข้มข้น 6 ความเข้มข้น ที่ครอบคลุมความเข้มข้นยา หรือแคฟเฟอีนในร่างกาย โดยอิงความเข้มข้นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษา และความเข้มข้นของยา หรือแคฟเฟอีนที่อาจก่อให้เกิดพิษ หรืออาการข้างเคียง ดังแสดงในตารางที่ 3 สร้างเส้นกราฟระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค กับความเข้มข้นของยา หรือแคฟเฟอีน ในพลาสมา ถ้าเส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ใช้ linear regression ในการสร้างสมการเชิงเส้นตรง โดยร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของความชัน (slope) ของสมการความสัมพันธ์ ต้องไม่เกินร้อยละ 15

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษา และความเข้มข้นยาและแคฟเฟอีน ที่ก่อให้เกิดพิษ หรืออาการข้างเคียงที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

ยา และสาร	ความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการรักษา (มคก/มล)	ความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดพิษ หรืออาการข้างเคียง (มคก/มล)	ความเข้มข้นในพลาสมาที่ใช้หาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง(มคก/มล)
Theophylline	10-20	>20	0, 2.5, 5, 10, 20, 40
Caffeine	-	>25	0, 2.5, 5, 10, 20, 40
Phenytoin	10-20	>25	0, 2.5, 5, 10, 20, 40
Phenobarbital	20-40	>50	0, 5, 10, 20, 40, 100
Vancomycin	peak level =30-40 trough level <10	trough level ≥10	0, 5, 10, 20, 40, 100

2. **ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์** (Accuracy)

วิธีการทดลอง วิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของตัวยาหรือแคฟเฟอีน จำนวน 3 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่าง โดยความเข้มข้นทั้ง 3 ครอบคลุมความเข้มข้นสูง กลาง ต่ำของของตัวยา หรือแคฟเฟอีนที่พบในร่างกาย ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยในการศึกษานี้สร้างกราฟเทียบมาตรฐานควบคู่ไปด้วย แสดงความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในเทอมของร้อยละของความเบี่ยงเบน (%bias) และเปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับของความเข้มข้นของยา หรือแคฟเฟอีนจากการวิเคราะห์ (%analytical recovery) ดังแสดงในสมการ (2) และ (3) ตามลำดับ

$$\%bias = [(analyzed\ conc. - added\ conc.)/added\ conc.] \times 100 \quad (2)$$

$$\%analytical\ recovery = (analyzed\ conc./added\ conc.) \times 100 \quad (3)$$

โดย analyzed conc. = ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้

added conc. = ความเข้มข้นที่เติม

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของยาแต่ละตัว และแคฟเฟอีนในพลาสมาที่ใช้ในการศึกษา

ยา และสาร	ความเข้มข้นในพลาสมาที่ใช้ในการศึกษา (มคก/มล)
Theophylline	5, 10, 20
Caffeine	5, 10, 20
Phenytoin	5, 10, 20
Phenobarbital	10, 20, 40
Vancomycin	10, 20, 40

วิธีวิเคราะห์ที่ยอมรับให้ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาได้ ต้องมี %bias ไม่เกิน ±15% สำหรับ %analytical recovery ต้องไม่น้อยกว่า 80% และไม่มากกว่า 100 %

3. **ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์** (Precision) ประกอบด้วย ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันใน (intra-day precision) ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน (inter-day precision) และความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์เมื่อใช้เครื่อง HPLC ต่างกัน (reproducibility)

3.1 **ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน**

วิธีการทดลอง วิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของตัวยา หรือแคฟเฟอีน จำนวน 3 ความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 4 ความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่าง ให้เสร็จสิ้นภายในวันเดียวกัน ควบคู่การสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน ค่าความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ ต้องมีค่า %RSD ไม่เกิน 15%

3.2 **ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน**

วิธีการทดลอง วิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของตัวยา หรือแคฟเฟอีน จำนวน 3 ความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 4 ความเข้มข้นละ 1 ตัวอย่างต่อวันอย่างน้อย ไม่น้อยกว่า 5 วัน ควบคู่กับการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน ค่าความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ ต้องมีค่า %RSD ไม่เกิน 15%

3.3 **ความเที่ยงตรงของการวิเคราห์เมื่อใช้เครื่อง HPLC ต่างกัน**

วิธีการทดลอง วิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานตัวยาหรือแคฟเฟอีนด้วยเครื่อง HPLC ที่ต่างกัน 2 เครื่อง โดยแต่ละเครื่อง วิเคราะห์แบลงค์พลาสมา จำนวน 3 ความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 4 ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ควบคู่กับการสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน ค่าความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ในแต่ละเครื่อง HPLC ต้องมีค่า %RSD ไม่เกิน 15% และหาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ของเครื่อง HPLC ทั้ง 2 ในทางสถิติ

4. **ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์** (Specificity and Selectivity) แบ่งเป็นการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ยา และแคฟเฟอีนในพลาสมา (Specificity) และการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของยา หรือแคฟเฟอีน กับยาต่างๆที่อาจมีการใช้ก่อน หรือยาที่ใช้ร่วมกับยา และแคฟเฟอีนที่ศึกษา (Selectivity)

4.1 **ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา**

วิธีการทดลอง วิเคราะห์แบลงค์พลาสมา และแบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน และสารมาตรฐานภายใน ถ้าวิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจง โครมาโตแกรมที่ได้ต้องไม่มีการรบกวนจาก endogenous substance ในแบลงค์พลาสมาต่อยา หรือแคฟเฟอีน และสารมาตรฐานภายใน

4.2 **ความจำเพาะเจาะจงของยา หรือแคฟเฟอีน กับยาต่าง ๆที่อาจมีการใช้ก่อน หรือยาที่ใช้ร่วมกับยา และแคฟเฟอีนที่ศึกษา** เนื่องจากผู้ป่วยที่ต้องมีการติดตามระดับยา หรือแคฟเฟอีน อาจมีการใช้ยาอื่นๆมาก่อน หรือใช้ยาร่วมกันหลายตัว การหาความจำเพาะเจาะจงของยา หรือแคฟเฟอีนที่ศึกษา กับยาที่มีการใช้ก่อน หรือยาที่ใช้ร่วมด้วย เป็นการยืนยันความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์นั้น

วิธีการทดลอง วิเคราะห์ยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนที่ศึกษา ยาที่คาดว่าอาจถูกใช้ก่อน และยาที่ใช้ร่วมด้วย ในสารละลายมาตรฐาน ถ้าวิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจง เวลาที่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน จะต้องไม่ตรงกับยาที่มีการใช้ก่อน และยาที่ใช้ร่วมกับยา หรือแคฟเฟอีนที่ศึกษา

ยาต่างๆที่คาดว่ามีการใช้ก่อน และใช้ร่วมกับธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีน [14] มีดังนี้ คิโททิเฟน ซัลบูทามอล เทอร์บูทาลีน เดกซาเมทาโซน เพร็ดนิโซโลน เอฟีดรีน และอะดรีนาลีน

ยาต่างๆที่คาดว่ามีการใช้ก่อน และใช้ร่วมกับเฟนิโทอิน และฟีโนบาร์บิทอล [30, 54] มีดังนี้ เป็นยาที่ใช้ป้องกัน หรือบรรเทาอาการชัก ซึ่งมีดังนี้ คาร์บามาซีฟีน ลิโดเคน ไฮโดรคลอไรด์ ลอราซีแฟม คลอนาซีแฟม ไดอะซีแฟม และกรดวาลโปรอิก

ยาต่างๆที่คาดว่ามีการใช้ก่อน และใช้ร่วมกับแวนโคมัยซิน [29] มีดังนี้ เพนิซิลลิน จี แอมพิซิลลิน เซฟาโซลิน เซฟาไตรอะโซน เซฟูรอกซีม เซโฟทาซีม เซโฟเปอราโซน เซฟาคลอร์ คล็อกซาซิลลีน ไรแฟมพิซิน และยาในกลุ่ม aminoglycosides

5. **ความคงตัวของยา หรือแคฟเฟอีน** (Stability) เป็นการศึกษาความคงตัวของยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา และสารละลายมาตรฐาน เพื่อกำหนดระยะเวลาเก็บตัวอย่างพลาสมา และสารละลายมาตรฐาน

5.1 การศึกษาความคงตัวของยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา ประกอบด้วย

5.1.1 **การศึกษาความคงตัวของยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมาที่อุณหภูมิห้อง** เป็นการศึกษาความคงตัวของยา หรือแคฟเฟอีน ณ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ในช่วงเวลาของการเตรียมตัวอย่างพลาสมาเพื่อการวิเคราะห์

วิธีการทดลอง วิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน 2 ความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 5 ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ที่อุณหภูมิห้อง (25±2°C) ครอบคลุมเวลา 8 ชั่วโมง หรือจนพบความไม่คงตัวก่อนครบ 8 ชั่วโมง ในการวิเคราะห์ต้องสร้างกราฟเทียบมาตรฐานควบคู่กันไปด้วย คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างของความเข้มข้นของยา หรือแคฟเฟอีน (%difference) ที่เวลาศูนย์ กับเวลาต่างๆ ดังแสดงในสมการที่ 4

5.1.2 **การศึกษาความคงตัวของยา และแคฟเฟอีนในพลาสมาที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง** เป็นการหาช่วงเวลาที่ยา หรือแคฟเฟอีนมีความคงตัวในการเก็บตัวอย่างพลาสมาในช่องแช่แข็ง (-18±3°C)

วิธีการทดลอง วิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน 2 ความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 5 ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง เก็บที่ช่องแช่แข็ง และนำออกมาวิเคราะห์ในวันที่ 2, 5, 7, 14 และ 30 วัน หรือจนพบความไม่คงตัวก่อน 30 วัน ในการวิเคราะห์แต่ละวัน สร้างกราฟเทียบมาตรฐานควบคู่กันไปด้วย คำนวณ % difference ที่เวลาศูนย์ กับเวลาต่างๆ ดังแสดงในสมการที่ 4

5.1.3 การศึกษาความคงตัวของยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา ที่ freeze-thaw cycle

วิธีการทดลอง วิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน 2 ความเข้มข้น ดังแสดงในตารางที่ 5 ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ก่อนนำเข้าแช่ในช่องแช่แข็ง 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำตัวอย่างพลาสมาวางที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีเพื่อวิเคราะห์ ทำเช่นนี้จนครบ 3 รอบ หรือจนพบความไม่คงตัวก่อน 3 รอบ ในการวิเคราะห์แต่ละรอบ สร้างกราฟเทียบมาตรฐานควบคู่กันไปด้วย คำนวณ %difference ก่อนนำไปแช่กับหลังผ่านแช่ในแต่ละรอบ ดังแสดงในสมการที่ 4

$$\%difference = [(Ct-Co)/Co] X100 \quad (4)$$

โดย Ct = ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ ที่เวลาต่างๆ

Co = ความเข้มข้นที่วิเคราะห์ ที่เวลาศูนย์

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของยาแต่ละตัว และแคฟเฟอีนในพลาสมาที่ใช้ในการศึกษาความคงตัวในพลาสมา

ยา และสาร	ความเข้มข้นในพลาสมาที่ใช้ในการศึกษา (มคก/มล)
Theophylline	5, 20
Caffeine	5, 20
Phenytoin	5, 20
Phenobarbital	10, 40
Vancomycin	10, 40

ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างพลาสมาในสภาวะต่างๆ พิจารณาจากค่า %difference หากค่า %difference ไม่เกิน ±10% ถือว่ายาแต่ละตัว และแคฟเฟอีนในพลาสมายังคงตัวอยู่

5.2 **การศึกษาความคงตัวของสารละลายมาตรฐานของยาแต่ละตัว แคฟเฟอีน และสารมาตรฐานภายใน** แบ่งการศึกษา เป็นความคงตัวของยาแต่ละตัว แคฟเฟอีน และสารมาตรฐานภายใน ในสารละลายมาตรฐาน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิในช่องแช่แข็ง (-18±3°C)

วิธีการทดลอง เตรียมสารละลายมาตรฐานของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน ในเมธานอล ประกอบด้วยความเข้มข้นสูง กับต่ำที่ใช้ในการวิเคราะห์ และความเข้มข้นที่ใช้เป็นสต็อก ส่วนสารละลายมาตรฐานของสารมาตรฐานภายใน เตรียมที่ความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ และความเข้มข้นที่ใช้เป็นสต็อก ดังแสดงในตารางที่ 6 ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ทุกๆ 7 วัน จนครบ 30 วัน ถ้าสารละลายมาตรฐานยังคงตัว ทำการวิเคราะห์ทุกๆ 10 วัน จนครบ 60 วัน ถ้าสารละลายมาตรฐานไม่แสดงความไม่คงตัว นำมาวิเคราะห์ครั้งสุดท้ายเมื่อครบ 90 วัน โดยในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง จะทำควบคู่กับสารที่เตรียมขึ้นมาใหม่ คำนวณ %response ของสารละลายมาตรฐาน เทียบกับที่เตรียมขึ้นใหม่ ดังแสดงในสมการที่ 5

$$\%\text{response} = \frac{\text{peak area of the analyte}}{\text{peak area of the freshly prepared analyte}} \times 100 \qquad (5)$$

โดย peak area of the analyte = พื้นที่ภายใต้พีคยา หรือสาร ที่เวลาใดๆ

peak area of the freshly prepared analyte = พื้นที่ภายใต้พีคยา หรือสาร ที่เตรียมใหม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของยา และสารในสารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาความคงตัว

ยา และสาร	ความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มคก/มล)	ความเข้มข้นที่ใช้เป็นสต็อก (มก/มล)
Theophyiline	100, 200	1.0
Caffeine	100, 200	1.0
Phenytoin	100, 200	1.0
Phenobarbital	100, 400	1.0
Vancomycin	100, 400	1.0
Beta-hydroxyethyltheophylline	10[1], 100[2]	1.0

หมายเหตุ 1. ความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ธีโอฟิลลีน และแคฟเฟอีนในพลาสมา

2. ความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์แวนโคมัยซินในพลาสมา

ระยะเวลาการเก็บสารละลายมาตรฐานในแต่ละครั้ง พิจารณาจากค่า %response หาก %response อยู่ในช่วง 90% ถึง 110% ถือว่า สารละลายมาตรฐานยังคงตัวอยู่

ขั้นตอนที่ 1.4 การศึกษาระยะเวลาการใช้กราฟเทียบมาตรฐานในการวิเคราะห์ยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา

ปกติแล้วการวิเคราะห์ด้วย HPLC จำเป็นต้องสร้างกราฟเทียบมาตรฐานควบคู่ด้วยทุกครั้ง การศึกษานี้เป็นการทดลองหาความเป็นไปได้ในการใช้กราฟเทียบมาตรฐานที่เตรียมขึ้นว่าสามารถนำไปใช้หาความเข้มข้นของยา และแคฟเฟอีน จากการวิเคราะห์ในวันอื่นๆได้หรือไม่ และใช้ได้ภายในกี่วัน ซึ่งเป็นการจำลองการวิเคราะห์จากชุดตรวจสอบต่างๆ ที่ใช้หลักการทางอิมมูโนวิทยา

วิธีการทดลอง วิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่เติมสารมาตรฐานของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีนที่ศึกษา จำนวน 3 ชุด แต่ละชุดประกอบด้วยความเข้มข้น 6 ความเข้มข้นเพื่อสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน ตามผลการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ภายใต้พีค และความเข้มข้นของยา หรือแคฟเฟอีนในพลาสมา เมื่อได้กราฟเทียบมาตรฐานแล้ว ทำการวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของยา หรือแคฟเฟอีนที่ศึกษา จำนวน 2 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ตัวอย่างต่อวัน โดยความเข้มข้นทั้ง 2 ครอบคลุมความเข้มข้นสูง และต่ำ ของยา หรือแคฟเฟอีน ในช่วงความเข้มข้นที่ใช้สร้างเส้นกราฟเทียบมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 7 ทำการวิเคราะห์เช่นนี้ทุกๆวัน จนครบ 30 วัน หรือจนกว่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้มีค่า %bias เกิน ±15%

หากกราฟเทียบมาตรฐานที่เตรียมขึ้นสามารถวิเคราะห์หาความเข้มข้นของยาหรือแคฟเฟอีน จากการวิเคราะห์ในวันอื่นๆได้ การวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของยา หรือแคฟเฟอีน ทั้ง 2 ความเข้มข้นในวันอื่นๆ ด้วยกราฟเทียบมาตรฐานนั่นจะต้องได้ค่าความเข้มข้นจากการวิเคราะห์ที่มีค่า % bias ไม่เกิน ±15% ส่วนระยะเวลาในการใช้กราฟเทียบมาตรฐานของยาแต่ละตัว หรือแคฟเฟอีน ในพลาสมา คือ ระยะเวลาตั้งแต่เตรียมกราฟเทียบมาตรฐานทั้ง 3 เส้น จนกระทั่งกราฟเทียบมาตรฐานนั่นไม่สามารถวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมสารมาตรฐานของยา หรือแคฟเฟอีน ได้ถูกต้องอีกต่อไป

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของยาแต่ละตัว และแคฟเฟอีนในพลาสมาที่ใช้ในการศึกษาระยะเวลาการใช้กราฟเทียบมาตรฐาน

ยา และสาร	ความเข้มข้นในพลาสมาที่ใช้ในการศึกษา (มคก/มล)
Theophylline	8, 32
Caffeine	8, 32
Phenytoin	8, 32
Phenobarbital	16, 50
Vancomycin	8, 50

ขั้นตอนที่ 2 การจัดทำมาตรฐานวิธีการปฏิบัติในการวิเคราะห์ยา และแคฟเฟอีนในตัวอย่างพลาสมา นำผลการศึกษาตามที่ได้ทำในขั้นตอนที่ 1 ของยาแต่ละตัว และแคฟเฟอีน มารวบรวม และจัดทำมาตรฐานวิธีการปฏิบัติในการวิเคราะห์ยา และแคฟเฟอีนในตัวอย่างพลาสมา โดยมาตรฐานวิธีการปฏิบัติที่จัดทำ จะต้องเป็นมาตรฐานวิธีการปฏิบัติที่มีวิธีการเตรียม HPLC ให้พร้อมกับการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาในแต่ละวันตลอดเวลา และมีขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาที่ได้ผลรวดเร็ว เหมาะแก่การปฏิบัติงานในสถานพยาบาล

มาตรฐานวิธีการปฏิบัติแต่ละฉบับที่จัดทำ มีรูปแบบของมาตรฐานวิธีปฏิบัติ [52-53] ดังนี้

1. **ชื่อเรื่อง** การให้ชื่อเรื่องของมาตรฐาน ใช้ประโยคที่สั้นๆและสื่อความหมายได้ชัดเจน

2. **แบบฟอร์ม** ประกอบด้วย

2.1 **ใบปะหน้า** มีส่วนประกอบ ดังนี้ ชื่อสถานที่ที่ใช้มาตรฐานวิธีการปฏิบัติ หมายเลข ชื่อเรื่อง และสารบัญของมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ

2.2 **แผ่นเนื้อหา** ในแต่ละฉบับของมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ ทุกๆหน้าจะต้องมีหัวข้อดังต่อไปนี้ คือ ชื่อสถานที่ที่ใช้มาตรฐานวิธีปฏิบัติ หมายเลข และชื่อเรื่องของมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ วันที่เริ่ม และสิ้นสุดของผลบังคับใช้ ตลอดจน เลขที่หน้าของมาตรฐานวิธีการปฏิบัติในจำนวนหน้าทั้งหมด

3. **เนื้อหาของมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ** ประกอบด้วยหัวข้อต่างๆ ดังนี้

3.1 **วัตถุประสงค์** เป็นการสรุปเนื้อหาทั้งหมดของมาตรฐานวิธีการปฏิบัติในรูปข้อความสั้นๆ และบอกเจตนารมณ์ของมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ ช่วยให้ผู้อ่านเกิดความเข้าใจเนื้อหาชัดเจนขึ้น

3.2 **ขอบเขตของงาน** เป็นการระบุขอบเขตการใช้งาน จุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของงานตามมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ

3.3 **หน่วยงานที่รับผิดชอบ** เป็นการระบุถึงบุคคลที่รับผิดชอบในการนำมาตรฐานวิธีการปฏิบัติไปใช้

3.4 **คำอธิบายศัพท์** เป็นอธิบายคำที่ยากต่อการเข้าใจ และคำที่ต้องการให้เข้าใจตรงกัน

3.5 **แผนภูมิการทำงาน** เป็นการแสดงขั้นตอนการทำงานโดยย่อในลักษณะของแผนภูมิ ให้เข้าใจในขั้นตอนการทำงานตามลำดับได้ง่าย โดยเขียนแผนภูมิการทำงานเป็นวลีของปฏิกิริยาของการกระทำ

3.6 **รายละเอียดของขั้นตอนการทำงาน** เป็นการบรรยายรายละเอียดของการทำงานแต่ละขั้นตอน ตามที่กำหนดไว้ในแผนภูมิการทำงานข้างต้น

3.7 **เอกสารประกอบ** เป็นการระบุเฉพาะหมายเลข และชื่อของเอกสารประกอบต่างๆไว้ที่ใช้ในมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ โดยตัวเอกสารประกอบ ได้แยกไว้ต่างหาก ไม่รวมกับมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ

ทั้งนี้การเขียนเนื้อหาของมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ เลือกใช้ภาษาที่เข้าใจง่ายและเหมาะสมกับระดับความรู้ความเข้าใจของบุคคลที่คาดว่าจะนำมาตรฐานวิธีการปฏิบัติดังกล่าวไปใช้

ขั้นตอนที่ 3 การทดลองปฏิบัติตามมาตรฐานวิธีการปฏิบัติ เมื่อจัดทำมาตรฐานวิธีการปฏิบัติในขั้นตอนที่ 2 เสร็จ ให้นำมาตรฐานวิธีการปฏิบัติมาลองปฏิบัติตาม โดยให้บุคคลที่ไม่เกี่ยวข้องกับการศึกษานี้จำนวน 2 คนมาประเมิน โดยคุณสมบัติของผู้ประเมินจะต้องมีความรู้ความเข้าใจในการวิเคราะห์ทั่วไป ตลอดจนสามารถใช้เครื่อง HPLC ได้ แต่อาจจะมี หรือไม่มีประสบการณ์ในการวิเคราะห์สารต่างๆในพลาสมาก็ได้

ในการทดลอง ทั้ง 2 คนจะประเมินการใช้มาตรฐานวิธีการปฏิบัติดังกล่าว พร้อมๆ กับวิเคราะห์แบลงค์พลาสมาที่มีการเติมยา หรือแคฟเฟอีน ซึ่งในแต่ละคน จะได้วิเคราะห์ยาแต่ละตัว และแคฟเฟอีน ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวละ 1 ตัวอย่าง และเมื่อมาตรฐานวิธีการปฏิบัติผ่านการประเมินจากทั้ง 2 คนแล้ว จึงนำจุดบกพร่อง หรือจุดที่ต้องปรับปรุง แก้ไขจากทั้ง 2 คน มารวบรวม และแก้ไข ปรับปรุง มาตรฐานวิธีการปฏิบัติให้เหมาะสมต่อไป