



การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมา

นางนันทน์ภัส ธิติศักดิ์สกุล
นักวิชาการวิทยาศาสตร์ ปฏิบัติการ
งานสนับสนุนการวิจัยและวิเทศสัมพันธ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น





การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมา

จัดทำโดย

นางนันทน์ภัส ธิติศักดิ์สกุล
นักวิชาการวิทยาศาสตร์ ปฏิบัติการ
งานสนับสนุนการวิจัยและวิเทศสัมพันธ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมา มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) พัฒนาวิธีวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมา 2) เพื่อนำผลที่ได้ไปพัฒนางานตรวจวัดระดับยาและสารเคมีในซีรุ่ม คณະเภสัชศาสตร์ 3) เพื่อใช้ในการให้บริการตรวจวัดระดับยา Levetiracetam ในพลาสมาแก่โรงพยาบาลศรีนครินทร์และโรงพยาบาลทั้งภาครัฐและเอกชน

การศึกษานี้เป็นการวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมา โดยสามารถสรุปผลการวิเคราะห์ได้ดังนี้ วิธีวิเคราะห์โดยใช้ HPLC ด้วย C-18 reverse phase column ร่วมกับ guard column เฟสเคลื่อนที่ใช้ 0.1% Formic acid:ACN (40:60) อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที วัดโดยใช้ UV-Spectrometer ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร เตรียมตัวอย่างพลาสมาด้วยวิธีตกตะกอนโปรตีน ด้วย ACN และใช้ Nelfinavir เป็น internal standard ตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ พบว่า calibration curve ($R^2=0.9974$) อยู่ในช่วง 5.00-100.00 $\mu\text{g/mL}$ มีค่า LLOQ เท่ากับ 5.00 $\mu\text{g/mL}$ ค่าเฉลี่ยของ %accuracy อยู่ระหว่างร้อยละ 93.09-111.13 (%CV; 0.32 – 7.25 %) Intra- และ inter-assay precision มีค่า %CV 3.60 – 15.41 %, 1.94 – 14.86 % ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของ %recovery อยู่ระหว่างร้อยละ 89.42-102.13 (% CV; 0.63 – 2.73 %) Freeze-Thaw assay มี %difference อยู่ระหว่างร้อยละ 1.15-8.74 Long-term assay มีค่า %difference อยู่ระหว่างร้อยละ 0.46- 13.56% Short-term assay มีค่า %difference อยู่ระหว่างร้อยละ 0.07-3.88 Stock solution stability มี %difference ของ Levetiracetam และ Nelfinavir เท่ากับ 1.28 % และ 0.90 % ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะจากการศึกษาการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Levetiracetam และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ดังนี้ เนื่องจากเป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างพลาสมาที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าการตกตะกอนโปรตีนในการวิเคราะห์ ในงานประจำอาจปรับเพิ่ม flow rate หรือ อาจพิจารณาลด Run time เหลือเพียง 7-8 นาทีได้ เพื่อลดเวลาในการวิเคราะห์ และในการทดสอบความคงตัวของ stock solution ควรทดสอบโดยใช้ %difference ของความเข้มข้น โดยอาจพิจารณา stock solution ให้ได้เป็นความเข้มข้นต่างๆ แล้วทำ standard curve ไม่ควรใช้ %difference ของ peak area ในการทดสอบ เพราะอาจทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้

คำนำ

รายงานการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมา จัดทำขึ้นเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่เปิดให้บริการในห้องปฏิบัติการตรวจวัดระดับยาและสารเคมีในชีววัตถุของคณะเภสัชศาสตร์ที่สอดคล้องกับประเด็นยุทธศาสตร์ที่ 4 การปรับเปลี่ยนการบริการวิชาการ ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการให้บริการวิชาการ ด้านการตรวจวัดระดับยาและสารเคมีในชีววัตถุ ของคณะเภสัชศาสตร์ รวมถึงให้บริการตรวจวัดระดับยาแก่โรงพยาบาลทั้งภาครัฐและเอกชน ทั้งนี้ผู้วิเคราะห์ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นรินทร์ จันทร์ศรี คณบดีคณะเภสัชศาสตร์ รองศาสตราจารย์ ดร.เยาวเรศ ชูลิขิต รองคณบดีฝ่ายวิจัย นวัตกรรมและวิเทศสัมพันธ์ คุณจิระวัฒน์ หาญเวช รักษาการแทนผู้อำนวยการกองบริหารงานคณะเภสัชศาสตร์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เด่นพงศ์ พัฒนเศรษฐานนท์ ผู้จัดการศูนย์พัฒนาการบริการวิชาการและวิจัย และคุณอาทิตย์ วงษ์พระจันทร์ หัวหน้างานสนับสนุนการวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้คำชี้แนะและให้ความกรุณาตรวจสอบเนื้อหา รวมถึงให้ข้อเสนอแนะปรับปรุง การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมาเล่มนี้สำเร็จด้วยดี

ผู้วิเคราะห์หวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมา ฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ปฏิบัติงานด้านการตรวจวัดระดับยาและสารเคมีในชีววัตถุ และผู้ที่ปฏิบัติงานในสายงานลักษณะเดียวกัน เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงาน รวมทั้งประกอบการตัดสินใจกับการปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้อง และพัฒนากระบวนการตรวจวัดระดับยาให้มีประสิทธิภาพต่อไป

นางนันทน์ภัส ธิติศักดิ์สกุล

นักวิชาการวิทยาศาสตร์ ปฏิบัติการ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

มีนาคม 2567

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ก
คำนำ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญรูปภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษาและวิเคราะห์	3
1.3 ขอบเขตของการศึกษาและวิเคราะห์	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 แนวคิด หลักการ และทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 โรคลมชัก	5
2.2 ยา Levetiracetam	6
2.3 การตรวจวัดระดับยา Levetiracetam ในเลือด	9
2.4 การเตรียมตัวอย่าง	9
2.5 การวิเคราะห์ยาด้วย HPLC	11
2.6 ตัวอย่างสารมาตรฐานภายในที่ใช้ในการวิเคราะห์ยา Levetiracetam ด้วยวิธี HPLC	15
2.7 ตัวอย่างวิธีการวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ด้วยวิธี HPLC	16
2.8 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน	22
3.1 รูปแบบงานวิจัย	22
3.2 ขอบเขตการวิจัย	22
3.3 สถานที่ทำการวิจัย	22
3.4 กลุ่มตัวอย่าง	22
3.5 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้	22
3.6 ขั้นตอนการทำวิจัย	24
บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล	29
4.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)	29
4.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)	30
4.3 ความถูกต้อง (Accuracy)	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4 ความแม่นยำ (Precision)	33
4.5 Recovery of extraction	34
4.6 การทดสอบความคงตัว (Stability)	34
บทที่ 5 สรุปผลการวิเคราะห์และข้อเสนอแนะ	36
5.1 สรุปผลการวิเคราะห์	36
5.2 ข้อเสนอแนะ	37
บรรณานุกรม	39
ประวัติผู้วิเคราะห์	44

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของยา Levetiracetam	7
รูปภาพที่ 2 UCB 17025 (30)	15
รูปภาพที่ 3 Gabapentin (44)	15
รูปภาพที่ 4 Caffeine (45)	15
รูปภาพที่ 5 Nelfinavir (46)	15
รูปภาพที่ 6 Adenosine (47)	15
รูปภาพที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Levetiracetam และ Peak area ratio	29
รูปภาพที่ 8 Chromatogram ของ blank plasma	30
รูปภาพที่ 9 Chromatogram ของ Levetiracetam ในพลาสมา	31
รูปภาพที่ 10 Chromatogram ของ Internal standard (Nelfinavir) ในพลาสมา	31
รูปภาพที่ 11 Chromatogram ของ Levetiracetam และ Internal standard ในพลาสมา	32

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะเฉพาะที่สำคัญของตัวตรวจวัดในระบบโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้กันเป็นส่วนมาก	14
ตารางที่ 2 ปริมาตรของพลาสมา, ACN, stock solution ของ Levetiracetam และ Internal standard ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างพลาสมา	25
ตารางที่ 3 Peak area ratio และความเข้มข้นของ Levetiracetam	29
ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของยา Levetiracetam ที่คาดการณ์กับที่ได้จากการคำนวณ	30
ตารางที่ 5 Accuracy ของวิธีวิเคราะห์ Levetiracetam ในพลาสมา	32
ตารางที่ 6 Precision (Within-day and Between-day) ของวิธีวิเคราะห์ Levetiracetam ในพลาสมา	33
ตารางที่ 7 Precision of injection ของวิธีวิเคราะห์ Levetiracetam ในพลาสมา	33
ตารางที่ 8 Recovery ของวิธีวิเคราะห์ Levetiracetam ในพลาสมา	34
ตารางที่ 9 Stability ของวิธีวิเคราะห์ Levetiracetam ในพลาสมา	35
ตารางที่ 10 Stability ของสารมาตรฐาน Levetiracetam และ Nelfinavir	35

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคลมชักเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบเอเชีย จากการศึกษพบว่ามีความชุกของผู้ป่วยโรคลมชักอยู่ที่ประมาณ 10 รายต่อประชากรโลก 1,000 รายและ 7 รายต่อประชากรไทย 1,000 ราย (Shakirullah, Ali N, Khan A, Nabi M, 2014) การรักษาโรคลมชักสามารถทำได้โดยใช้ยาที่เรียกว่า ยากันชัก (antiepileptic drugs, AEDs) ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ ยากันชักรุ่นเก่า ได้แก่ Carbamazepine Clonazepam Phenytoin Phenobarbital และ Valproic acid ยากันชักรุ่นเก่านั้นถือว่าเป็นยาที่มีประสิทธิภาพดีและราคาไม่แพง แต่มีข้อเสียคือสามารถทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์รุนแรง และอาจเกิดอันตรกิริยากับยาได้หลายชนิด ดังนั้นจึงมีการพัฒนายากันชักรุ่นใหม่ เช่น Gabapentin, Lamotrigine, Topiramate, Levetiracetam, Oxcarbazepine, Vigabatrin และ Pregabalin ขึ้นมาใช้ในการรักษาทดแทนเพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดของยากันชักรุ่นเก่า (ภูนิคม ศัชรินทร์, 2555) แนวทางเวชปฏิบัติโรคลมชักของสถาบันประสาทวิทยาได้แนะนำการเลือกชนิดของยากันชักในการรักษาโรคลมชักโดยพิจารณาจากชนิดอาการชัก(seizure type)ของผู้ป่วยเป็นหลักและควรพิจารณาถึงปัจจัยอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น อายุ เพศ โรคประจำตัวของผู้ป่วยหรือยาอื่นที่ผู้ป่วยใช้อยู่ นอกจากนี้การเลือกใช้ยาควรเลือกใช้ในกลุ่มนยาหลัก(first line drug) เช่น Carbamazepine, Phenytoin, Phenobarbital และ Valproic acid ก่อนกลุ่มนยารองหรือยาเสริม(second line drug) (อันวศ์ กาญจนนา, 2559)

Levetiracetam เป็นยากันชักกลุ่มใหม่ได้รับการจดสิทธิบัตรในประเทศไทยจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เมื่อปี พ.ศ. 2542 โดยจัดเป็นยาในบัญชียาหลักแห่งชาติของประเทศไทย บัญชี ง. จากแนวทางเวชปฏิบัติโรคลมชักของสถาบันประสาทวิทยา พบว่าควรพิจารณาเลือกใช้ยา Levetiracetam สำหรับการรักษาอาการชักชนิด partial onset seizure ในผู้ใหญ่ generalized tonic clonic seizure และ atonic/tonic seizure (อันวศ์ กาญจนนา, 2559) จะเห็นได้ว่า ยา Levetiracetam จัดเป็นยาที่ไม่แนะนำให้เลือกใช้เป็นอันดับแรก แต่ควรพิจารณาเลือกใช้ในกรณีที่ผู้ป่วยใช้ยาในกลุ่มนยาหลักแล้วไม่ได้ผลหรือมีข้อห้ามใช้หรือทนผลข้างเคียงของยากลุ่มหลักไม่ได้ แต่จากการศึกษาของ Liu และคณะ ในปี พ.ศ. 2560 พบว่าความชุกในการใช้ยา Levetiracetamในการรักษาโรคลมชักเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก โดยเพิ่มขึ้นจาก 5.1 % ในปี พ .ศ.2542 เป็น 32.0% ในปี พ .ศ.2552 นอกจากนี้ยังพบว่าแนวโน้มการใช้ยา Levetiracetam เพื่อทดแทนยา Valproic acidเพิ่มสูงขึ้นในการรักษาโรคลมชักในผู้ป่วยเด็กอีกด้วย (Liu X, Carney PR, Bussing R, Segal R, Cottler LB, Winterstein AG, 2017)

อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของระดับยา Levetiracetamในกระแสเลือดกับประสิทธิภาพทางคลินิกของผู้ป่วยโรคลมชักในปัจจุบันยังได้ข้อสรุปที่ไม่แน่ชัด อีกทั้งวิธีการตรวจวัดระดับยากันชักรุ่นใหม่ยังไม่เป็นที่แพร่หลายในปัจจุบันทั้งนี้ ดังนั้นผู้จัดทำจึงมีความสนใจที่จะทำวิจัยเพื่อ

พัฒนาวิธีวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมาด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) เนื่องจาก HPLC มีความเฉพาะเจาะจงต่อการตรวจวิเคราะห์ยาค่อนข้างสูง อีกทั้งยังสามารถพัฒนาวิธีได้ง่ายในระยะเวลาและเงินทุนที่จำกัด ซึ่งวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นจะนำไปใช้สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ Levetiracetam กับประสิทธิภาพทางคลินิกและผลไม่พึงประสงค์ที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยโรคลมชัก รวมทั้งตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นเพื่อให้สามารถนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้ในการวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในชีวิตจริงในงานประจำของห้องปฏิบัติการ

มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้กำหนดแผนยุทธศาสตร์การบริหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2563 - 2566 ตามประเด็นยุทธศาสตร์ที่ 4 ปรับเปลี่ยนการบริการวิชาการ (Academic Service Transformation) ในยุคปัจจุบันที่มีการเข้าถึงการบริการด้านสาธารณสุขเป็นสิทธิตามกฎหมายของคนไทยทุกคน แม้กระทั่งการศึกษา มหาวิทยาลัยจะต้องพัฒนาหน่วยงานด้านการส่งมอบคุณค่าแก่ประชาคม โดยอาศัยการสร้างศูนย์บริการการแพทย์ชั้นเลิศ ที่ร่วมกันรักษาผู้ป่วยโดยสหสาขาวิชาชีพ ซึ่งอาศัยสมรรถนะหลักของมหาวิทยาลัยที่มีองค์ความรู้หลากหลายสาขาวิชาที่สามารถบูรณาการให้เกิดองค์ความรู้แบบสหสาขา ด้วยวิสัยทัศน์ของสภามหาวิทยาลัยที่มุ่งการนำมหาวิทยาลัยขอนแก่นสู่การเป็น “มหาวิทยาลัยวิจัยและพัฒนาชั้นนำระดับโลก” ที่ยังคงการเป็นสถาบันที่มีคุณค่าต่อสังคม (แผนยุทธศาสตร์การบริหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2563 – 2566, 2562)

แผนยุทธศาสตร์การบริหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2567 - 2570 ประเด็นยุทธศาสตร์ที่ 4 การปรับเปลี่ยนการบริการวิชาการ (Academic Service Transformation) ได้กำหนดกลยุทธ์ 3 ด้าน คือ โดยสร้างกลไกดังกล่าวผ่านกลยุทธ์ 3 ด้าน คือ กลยุทธ์ที่ 1 ส่งเสริมการบริการวิชาการที่มีอยู่เดิม กลยุทธ์ที่ 2 สร้างโครงการบริการวิชาการใหม่เพื่อให้มหาวิทยาลัยเป็นแหล่งเรียนรู้และภูมิปัญญาของสังคม (Center of Social Wisdom) กลยุทธ์ที่ 3 ปรับเปลี่ยนการบริการวิชาการจากความรับผิดชอบต่อสังคม (Corporate Social Responsibility : CSR) สู่การสร้างคุณค่าร่วมกัน (Creating shared value :CSV) (แผนยุทธศาสตร์การบริหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2567 – 2570, 2566)

ยุทธศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเด็นยุทธศาสตร์ด้านการบริการวิชาการ โดยมีเป้าประสงค์ คือ ส่งเสริมงานบริการวิชาการสู่สังคม ให้ได้รับการยอมรับจากชุมชนด้านการบริการวิชาการ และเพื่อดำเนินการให้บริการวิชาการเพื่อการพึ่งตนเอง และเป็นแหล่งฝึกงานนักศึกษา (แผนยุทธศาสตร์การบริหาร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2563 - 2566)

ดังนั้น จากแผนยุทธศาสตร์การบริหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2563 – 2566 และแผนยุทธศาสตร์การบริหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2567 – 2570 รวมทั้งยุทธศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทำให้ผู้วิเคราะห์มีความสนใจในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมา เพื่อนำผลการวิเคราะห์มาเป็นข้อมูลในการพัฒนาการปฏิบัติงาน และรายงานให้ผู้บริหาร และศูนย์พัฒนาการบริการวิชาการและวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ เป็นข้อมูลในการตัดสินใจ และเปิดให้บริการตรวจวัดระดับยาและสารเคมีชีวิตต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษาและวิเคราะห์

- 1.2.1 เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมา
- 1.2.2 เพื่อนำผลที่ได้ไปพัฒนางานตรวจวัดระดับยาและสารเคมีในชีววัตถุ คณะเภสัชศาสตร์
- 1.2.3 เพื่อใช้ในการให้บริการตรวจวัดระดับยา Levetiracetam ในพลาสมาแก่โรงพยาบาล
ศรีนครินทร์และโรงพยาบาลทั้งภาครัฐและเอกชน

1.3 ขอบเขตของการศึกษาและวิเคราะห์

- 1.3.1 วิธีวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมา

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ได้วิธีวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมา เพื่อใช้ในการให้บริการตรวจวัดระดับยา
- 1.4.2 เพื่อใช้ในการให้บริการตรวจวัดระดับยา Levetiracetam ในพลาสมาแก่โรงพยาบาลศรีนครินทร์
และโรงพยาบาลทั้งภาครัฐและเอกชน
- 1.4.3 นำผลการวิเคราะห์ที่ได้ไปใช้ในการปรับระดับยาเพื่อรักษาผู้ป่วยโรคลมชักแก่โรงพยาบาล
ศรีนครินทร์และโรงพยาบาลทั้งภาครัฐและเอกชน
- 1.4.4 ได้นำเสนอผลการวิเคราะห์ในการประชุมวิชาการทั้งภายในและภายนอกหน่วยงาน เป็นการ
แลกเปลี่ยนเรียนรู้กับหน่วยงานอื่นๆ ต่อไป

บทที่ 2

แนวคิด หลักการ และทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้กำหนดแผนยุทธศาสตร์การบริหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ.2563-2566 ตามประเด็นยุทธศาสตร์ที่ 4 ปรับเปลี่ยนการบริการวิชาการ (Academic Service Transformation) ในยุคปัจจุบันที่มีการเข้าถึงการบริการด้านสาธารณสุขเป็นสิทธิตามกฎหมายของคนไทยทุกคน แม้กระทั่งการศึกษา มหาวิทยาลัยจะต้องพัฒนาหน่วยงานด้านการส่งมอบคุณค่าแก่ประชาคม โดยอาศัยการสร้างศูนย์บริการการแพทย์ชั้นเลิศ ที่ร่วมกันรักษาผู้ป่วยโดยสหสาขาวิชาชีพ ซึ่งอาศัยสมรรถนะหลักของมหาวิทยาลัยที่มีองค์ความรู้หลากหลายสาขาวิชาที่สามารถบูรณาการให้เกิดองค์ความรู้แบบสหสาขาด้วยวิสัยทัศน์ของสภามหาวิทยาลัยที่มุ่งการนำมหาวิทยาลัยขอนแก่นสู่การเป็น “มหาวิทยาลัยวิจัยและพัฒนาชั้นนำระดับโลก” ที่ยังคงการเป็นสถาบันที่มีคุณค่าต่อสังคม โดยได้กำหนดกลยุทธ์ 3 ด้าน คือ โดยสร้างกลไกดังกล่าวผ่านกลยุทธ์ 3 ด้าน คือ กลยุทธ์ที่ 1 ส่งเสริมการบริการวิชาการที่มีอยู่เดิม กลยุทธ์ที่ 2 สร้างโครงการบริการวิชาการใหม่เพื่อให้มหาวิทยาลัยเป็นแหล่งเรียนรู้และภูมิปัญญาของสังคม (Center of Social Wisdom) กลยุทธ์ที่ 3 ปรับเปลี่ยนการบริการวิชาการจากความรับผิดชอบต่อสังคม (Corporate Social Responsibility : CSR) สู่การสร้างคุณค่าร่วมกัน (Creating shared value :CSV)

ยุทธศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ ได้กำหนดประเด็นยุทธศาสตร์ด้านการบริการวิชาการ โดยมีเป้าประสงค์ คือ ส่งเสริมงานบริการวิชาการสู่สังคม ให้ได้รับการยอมรับจากชุมชนด้านการบริการวิชาการ และเพื่อดำเนินการให้บริการวิชาการเพื่อการพึ่งตนเอง และเป็นแหล่งฝึกงานนักศึกษา

งานสนับสนุนการวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้ให้บริการวิชาการแก่สังคมในด้านของการให้บริการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ การให้บริการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์แก่ทั้งหน่วยงานภาครัฐและเอกชน การให้บริการตรวจวิเคราะห์ระดับยาและสารพิษในชีววัตถุ เป็นงานบริการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่ให้บริการแก่โรงพยาบาลศรีนครินทร์และโรงพยาบาลอื่นๆ ทั้งภาครัฐและเอกชนในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นหลัก วิธีการตรวจวัดระดับยาในชีววัตถุ ปัจจุบันห้องปฏิบัติการตรวจวัดระดับยาและสารเคมีในชีววัตถุได้เปิดให้บริการทั้งหมด 23 รายการ ซึ่งผลการตรวจวัดระดับยาดังกล่าว ใช้ในขบวนการติดตามผลการรักษาของแพทย์ต่อผู้ป่วยยา Levetiracetam เป็นยาชนิดหนึ่งที่แพทย์มีความจำเป็นในการติดตามผลการรักษาของผู้ป่วย โดยวิธีการตรวจวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam นี้มีอยู่หลายวิธีด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน การนำวิธีมาใช้ต้องคำนึงถึงความถูกต้อง ประหยัด ที่สำคัญต้องรวดเร็วเหมาะสมกับสถานะของห้องปฏิบัติการและงานที่ให้บริการในลักษณะประจำ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องการพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมา โดยทางห้องปฏิบัติการตรวจวัดระดับยาและสารเคมีได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมา

การวิเคราะห์ครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมา เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าว ผู้วิเคราะห์จึงได้ศึกษาค้นคว้าเอกสาร บทความ ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ดังต่อไปนี้

2.1 โรคลมชัก

2.2 ยา Levetiracetam

2.3 การตรวจวัดระดับยา Levetiracetam ในเลือด

2.4 การเตรียมตัวอย่าง

2.5 การวิเคราะห์ยาด้วย HPLC

2.6 ตัวอย่างสารมาตรฐานภายในที่ใช้ในการวิเคราะห์ยา Levetiracetam ด้วยวิธี HPLC

2.7 ตัวอย่างวิธีการวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ด้วยวิธี HPLC

2.8 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

2.1 โรคลมชัก

2.1.1 อาการชัก โรคลมชัก และการจัดจำแนกประเภทของอาการชัก

อาการชัก (seizure) คือ อาการที่เกิดจากภาวะที่เซลล์สมองมีการปลดปล่อยคลื่นไฟฟ้าที่ผิดปกติออกมาจากเซลล์สมองจำนวนมากพร้อม ๆ กันอย่างเฉียบพลันจากสมองจุดใดจุดหนึ่งหรือทั้งหมด ผู้ป่วยที่มีอาการชักไม่จำเป็นต้องเป็นโรคลมชักเสมอไป อาการชักที่เกิดจากปัจจัยกระตุ้นหรือความเจ็บป่วยปัจจุบัน เช่น ความผิดปกติทางเมแทบอลิกจากยาหรือใช้สูงในเด็ก โดยที่ไม่ได้มีพยาธิสภาพที่สมองชัดเจน จัดเป็นการชักที่มีปัจจัยชักนำ (provoked seizure) จึงไม่ถือว่าเป็นโรคลมชัก

โรคลมชัก (epilepsy) เป็นโรคทางระบบประสาทที่พบได้บ่อย ผู้ป่วยที่มีอาการชักหรือมี reflex seizure มากกว่า 2 ครั้ง โดยเกิดขึ้นห่างกันมากกว่า 24 ชั่วโมงและอาการชักที่เกิดขึ้นนั้นไม่มีปัจจัยกระตุ้นชัดเจนจะได้รับการวินิจฉัยเป็นผู้ป่วยกลุ่ม epilepsy syndrome

ในปัจจุบันประเภทของอาการชักถูกจัดจำแนกโดย International League Against Epilepsy (ILAE) 2010 (The new ILAE classification - Shinnar, 2010.) โดยแบ่งตาม mode of onset ดังนี้

1. Generalized onset เป็นอาการชักที่เกิดจากความผิดปกติของคลื่นไฟฟ้าสมอง อาจเกิดขึ้นจากจุดใดจุดหนึ่งในสมองและแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปยังสมองทั้ง 2 ด้าน แบ่งชนิดของอาการชักย่อยออกได้เป็น ชักเกร็ง กระตุกทั้งตัว (tonic clonic) ชักสะดุ้ง (myoclonic) ชักเหม่อ (absence) ชักกระตุก (clonic) ชักเกร็ง (tonic) และชักตัวอ่อน (atonic)

2. Focal onset เป็นอาการชักที่มีความผิดปกติของคลื่นไฟฟ้าสมอง โดยเริ่มเกิดขึ้นจากจุดใดจุดหนึ่งของสมองด้านใดด้านหนึ่งเท่านั้น

3. Not clear onset อาการชักที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ epileptic spasms ซึ่งข้อมูลยังไม่เพียงพอที่จะบอกว่าเป็น focal หรือ generalized seizure

2.1.2 แนวทางการใช้ยารักษาโรคลมชัก

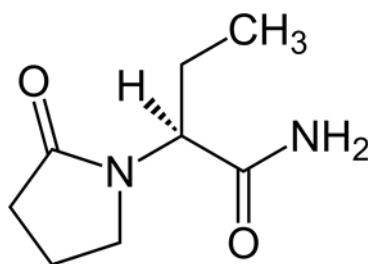
การใช้ยากันชักควรพิจารณาเริ่มใช้ในผู้ป่วยที่ถูกวินิจฉัยว่าเป็นโรคลมชักแล้วเท่านั้น โดยพิจารณาถึงโอกาสที่ผู้ป่วยจะเกิดอาการชักซ้ำเป็นครั้งที่สอง โดยพบว่าในผู้ป่วยที่ไม่มีปัจจัยเสี่ยงและไม่พบความผิดปกติจากการตรวจ Magnetic Resonance Imaging (MRI) และ Electroencephalography (EEG) จะมีโอกาสเกิดอาการชักซ้ำเป็นครั้งที่สองน้อยกว่าร้อยละ 10 ในปีแรกและประมาณร้อยละ 21 ในปีที่สอง หากผู้ป่วยมีปัจจัยเสี่ยงที่จะทำให้เกิดอาการชัก พบว่ามีโอกาสเกิดอาการชักซ้ำประมาณร้อยละ 26 ในปีแรกและร้อยละ 41 ในปีที่สอง (6) ในทางปฏิบัติพบว่า แพทย์บางท่านได้เริ่มสั่งใช้ยากันชักหลังจากที่ผู้ป่วยมีอาการชักครั้งแรก ในขณะที่แพทย์บางท่านเริ่มสั่งใช้ยากันชักหลังจากผู้ป่วยมีอาการชักชนิดไม่มีปัจจัยกระตุ้นชัดเจนพร้อมกับตรวจพบความผิดปกติ epileptiform activity จาก EEG แพทย์อีกส่วนหนึ่งตัดสินใจไม่เริ่มยากันชักจนกว่าผู้ป่วยจะมีอาการชักชนิดไม่มีปัจจัยกระตุ้น ชัดเจนเกิดขึ้นเป็นครั้งที่สอง ดังนั้นการพิจารณาเริ่มยากันชักโดยทั่วไปแล้วจะขึ้นอยู่กับดุลยพินิจของแพทย์และปัจจัยของผู้ป่วย เช่น พฤติกรรมการใช้ชีวิตและความต้องการที่จะเริ่มยากันชักของผู้ป่วย อย่างไรก็ตามผู้ป่วยที่มีอาการชักชนิดไม่มีปัจจัยกระตุ้นเกิดขึ้นตั้งแต่ 2 ครั้งขึ้นไปควรพิจารณาเริ่มยากันชัก (Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al., 2014.)

หลักการพิจารณาเลือกใช้ยากันชักมีข้อควรพิจารณาหลายประการด้วยกัน โดยควรพิจารณาเลือกใช้ยากันชักให้เหมาะสมกับชนิดของโรคและอาการชักของผู้ป่วย เนื่องจากยากันชักแต่ละตัวจะมีประสิทธิภาพต่อชนิดของโรคและอาการชักที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ควรพิจารณาเลือกใช้ยาที่ผู้ป่วยสามารถทนผลข้างเคียงของยาได้มากที่สุด โดยอาศัยปัจจัยต่าง ๆ เช่น อายุ เพศและโรคร่วมของผู้ป่วยมาประกอบการพิจารณาเลือกใช้ยาด้วย โดยควรพิจารณาเลือกใช้ยาที่จะทำให้ระดับยาถึงระดับการรักษาเร็วที่สุด ควรหลีกเลี่ยงการใช้ยาที่ต้องค่อย ๆ เพิ่มขนาดการใช้และถึงระดับการรักษาช้า เช่น Lamotrigine หรือ Topiramate (Nguyen V-HV, Baca CB, Chen JJ, Rogers SJ, et al., 2017.)

2.2. ยา Levetiracetam

2.2.1 ข้อมูลทางเคมีของยา Levetiracetam

ยา Levetiracetam มีชื่อทางเคมี คือ (α S)- α -ethyl-2-oxo-1-pyrrolidine acetamide มีสูตรโมเลกุล คือ $C_8H_{14}N_2O_2$ และสูตรโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 1 มีเลข Chemical Abstracts Service (CAS) เป็น 102767-28-2 มวลโมเลกุลเท่ากับ 170.2 กรัมต่อโมล ผงยามีลักษณะทางกายภาพเป็นผงสีขาว มีกลิ่นเล็กน้อย รสชาติขม มีจุด หลอมเหลวที่ 119 องศาเซลเซียส ละลายได้ดีมาก (very soluble) ในน้ำ 104 กรัมของยาต่อ 100 มิลลิลิตรของน้ำ ละลายได้ดี (freely soluble) ใน chloroform 65.3 กรัมของยาต่อ 100 มิลลิลิตรของ chloroform และ methanol 53.6 กรัม ของยาต่อ 100 มิลลิลิตรของ methanol ละลายได้ (soluble) ใน ethanol 16.5 กรัมของยาต่อ 100 มิลลิลิตรของ ethanol ละลายได้เล็กน้อย (sparingly soluble) ใน acetonitrile 5.7 กรัมของยาต่อ 100 มิลลิลิตรของ acetonitrile และไม่ละลาย (insoluble) ใน hexane



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของยา Levetiracetam

2.2.2 ข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์ของยา Levetiracetam

ยา Levetiracetam ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายทางระบบทางเดินอาหารได้อย่างสมบูรณ์ การรับประทานยาร่วมกับอาหารไม่มีผลเพิ่มการดูดซึมของยาแต่จะลดระดับความเข้มข้นของยาสูงสุดในกระแสเลือด (peak plasma concentrations) ประมาณ 20% และใช้เวลานานขึ้นเพื่อให้ยาในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นจนมีความเข้มข้นสูงสุดจากเดิม 1 เป็น 1.5 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นของยาในกระแสเลือดจะคงที่ เมื่อรับประทานยาไปแล้วประมาณ 2 วัน เมแทบอลิซึมของยาภายในร่างกายจะใช้วิธีไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เป็นหลัก ไม่มีการเมแทบอลิซึมผ่านการทำงานของ CYP450 ซึ่งเป็นเอนไซม์จากตับทำให้ไม่เกิดอันตรกิริยากับยากันชักตัวอื่น ส่วนเมแทบอลิท์ (metabolite) ที่เกิดขึ้นจะถูกขับออกทางไตเป็นหลักโดย 66% จะอยู่ในรูปที่ไม่เปลี่ยนแปลง (unchanged) และ 27% จะอยู่ในรูปที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (inactive product)

ยา Levetiracetam มีชีวประสิทธิผลทางการรับประทาน (oral bioavailability) ประมาณ 95-100% มีค่าครึ่งชีวิตในเด็ก(neonates)ประมาณ 16-18 ชั่วโมง (Krasowski MD, 2010.) ในผู้ใหญ่ (adults) ประมาณ 6-8 ชั่วโมง ผู้สูงอายุและผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตลดลงค่าครึ่งชีวิตของยาจะเพิ่มขึ้น ปริมาตรของการกระจายตัว (volume of distribution) อยู่ที่ 0.5-0.7 ลิตรต่อกิโลกรัม มีการจับกับโปรตีนในกระแสเลือดน้อยกว่า 10% มีอัตราการกำจัดยาออกจากร่างกาย (total body clearance) เท่ากับ 0.96 มิลลิตรต่อนาทีต่อกิโลกรัม ผู้สูงอายุและผู้ป่วยที่การทำงานของไตลดลงอัตราการกำจัดยาออกจากร่างกายจะลดลงตามไปด้วย โดยลดลง 40% 50% และ 60% สำหรับผู้ป่วยที่การทำงานของไตลดลงเล็กน้อย (mild) ปานกลาง (moderate) และมาก (severe) ตามลำดับ

2.2.3 ข้อมูลทางเภสัชวิทยาของยา Levetiracetam

2.2.3.1 กลไกการออกฤทธิ์

Levetiracetam มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกับยากันชักรุ่นเก่าที่มักออกฤทธิ์ยับยั้ง voltage-gated Na⁺ channels หรือปรับเปลี่ยนการทำงานของ GABA receptors โดยกลไกการออกฤทธิ์ของยา Levetiracetam จะเกี่ยวข้องกับโปรตีน SV2A ที่เซลล์ประสาทสมอง โดยยาจะจับกับโปรตีน SV2A บริเวณผนังเซลล์ของถุงไซแนปส์ ทำให้ลดการหลั่งสารสื่อประสาทที่เซลล์ประสาทก่อนไซแนปส์ (presynaptic neuron) เมื่อสารสื่อประสาทลดลงเซลล์ประสาทหลังไซแนปส์ (postsynaptic neuron) ก็จะตอบสนองได้ช้าและน้อยลง ส่งผลให้สามารถควบคุมอาการชักของผู้ป่วยได้ แต่กลไกการจับของยา

Levetiracetam กับโปรตีน SV2A รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีน SV2A ที่เกี่ยวกับสารสื่อประสาทอย่างละเอียดนั้นยังไม่มีเป็นที่ทราบแน่ชัดยังต้องรอข้อมูลจากการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป (Meehan AL, Yang X, McAdams BD, Yuan L, Rothman SM, et al, 2011.)

2.2.3.2 ขนาดยาที่ใช้ในการรักษา

ขนาดยา Levetiracetam ที่ใช้ในการรักษาโรคลมชักจะขึ้นอยู่กับข้อบ่งใช้ อายุ รูปแบบยาและการทำงานของไต โดยขนาดยาเริ่มต้นที่ใช้ในการรักษา คือ 1 กรัมต่อวัน โดยแบ่งรับประทานวันละ 2 ครั้ง และค่อยๆปรับเพิ่มขนาดยาได้สูงสุดถึง 3 กรัมต่อวัน ทั้งในการรักษาแบบยาเดี่ยวและที่ใช้เป็นยาเสริม ไม่ต้องปรับขนาดยาในผู้ป่วยที่มีปัญหาการทำงานของไตบกพร่อง แต่ควรปรับลดขนาดยาลงในผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตบกพร่อง เนื่องจากในการศึกษาพบว่าค่าครึ่งชีวิตของยาจะยาวนานขึ้น 2.5 เท่าในผู้ป่วยสูงอายุที่มีการทำงานของไตบกพร่องเมื่อเทียบกับคนปกติ (Wright C, Downing J, Mungall D, Khan O, Williams A, Fonkem E, et al, 2013.)

2.2.3.3 อาการไม่พึงประสงค์

เนื่องจากยา Levetiracetam เป็นยากันชักรุ่นใหม่ จึงมีอาการไม่พึงประสงค์ไม่มากและได้รับการยอมรับว่ามีข้อมูลความปลอดภัยที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับยากันชักรุ่นเก่า ในการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์พบอาการไม่พึงประสงค์ที่พบได้บ่อย (มากกว่าร้อยละ 5) ได้แก่ อาการอ่อนเพลีย มึนงง ปวดศีรษะ คลื่นไส้ ง่วงซึม หงุดหงิด กังวลใจ มีอาการคล้ายไข้หวัด ติดเชื้อ เยื่อโพรงจมูกอักเสบ คอหอยอักเสบ ติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ มีอาการคล้ายโรคจิตและมีอาการคัน (Adams ME, Chung AM, Eiland LS, et al, 2009.) จากการศึกษา SKATETM study ในปีพ.ศ.2550 พบว่าอาการไม่พึงประสงค์ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยต้องหยุดการใช้ยา Levetiracetam ที่พบบ่อยที่สุด ได้แก่ อาการง่วงซึม อ่อนเพลีย และการเพิ่มการเกิดอาการชัก (Steinhoff BJ, Somerville ER, Van Paesschen W, Ryvlin P, Schelstraete, et al, 2007.)

2.2.3.4 การเกิดอันตรกิริยาต่อกันของยา Levetiracetam กับยาอื่น

จากการศึกษาในหลอดทดลองเกี่ยวกับการเกิดอันตรกิริยาต่อกันของยา Levetiracetam กับยาอื่นผ่านทางกระบวนการเมแทบอลิซึม พบว่ายา Levetiracetam ทั้งในรูปแบบรับประทานและยาฉีดมีแนวโน้มการเกิดอันตรกิริยาน้อยมาก โดยยา Levetiracetam ไม่จัดเป็น CYP 450 inhibitor และไม่มี affinity ในการเป็น substrate ของเอนไซม์ CYP 450, epoxide hydrolase หรือ uridine diphosphate glucuronidation ทำให้การใช้ยา Levetiracetam ร่วมกับยา Warfarin Digoxin ยาเม็ดคุมกำเนิดชนิดรับประทานและยากันชักตัวอื่น เช่น Phenytoin และ Valproic acid สามารถให้ร่วมกันได้อย่างปลอดภัย (Farooq MU, Bhatt A, Majid A, Gupta R, Khasnis A, Kassab MY, et al, 2009.) ยังมีการศึกษาทางคลินิกที่แสดงให้เห็นว่าระดับยาในเลือดของยา Levetiracetam จะลดลงเมื่อให้รวมกันกับยา Phenytoin Carbamazepine และ Oxcarbazepine แต่การให้รวมกับยา Valproic acid Phenobarbital และ Lamotrigine ไม่พบผลดังกล่าว (Neels HM, Sierens AC, Naelaerts K, Scharpé SL, Hatfield GM, Lambert WE, et al, 2004.)

2.2.3.5 ประสิทธิภาพทางคลินิก

การติดตามประสิทธิภาพการรักษาสามารถทำได้ 2 วิธี ได้แก่ติดตามประสิทธิภาพหลังจากให้ Levetiracetam ในขนาดต่างๆ (fixed dose และการติดตามประสิทธิภาพโดยการตรวจวัดระดับยาในกระแสเลือด ตัวอย่างการศึกษาประสิทธิภาพในการใช้ยา Levetiracetam โดยติดตามผลการรักษาเป็นระยะเวลา 1 ปี พบว่าผู้ป่วยมากกว่าร้อยละ 50 สามารถควบคุมอาการชักได้ (Alsaadi TM, Shatzel A, Marquez AV, Jorgensen J, Farias S, et al, 2005.) นอกจากนี้ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพทางคลินิกของยา Levetiracetam กับยา Carbamazepine ซึ่งเป็นยากันชักรุ่นเก่า พบว่า ร้อยละ 73 ของผู้ป่วยที่ได้รับยา Levetiracetam สามารถควบคุมอาการชักได้ใกล้เคียงกับยา Carbamazepine (ร้อยละ 72.8) โดยยา Levetiracetam มีอัตราการหยุดใช้ยาอันเนื่องมาจากผลไม่พึงประสงค์ที่น้อยกว่ายา Carbamazepine (Brodie MJ, Perucca E, Ryvlin P, Ben-Menachem E, Meencke H-J, et al, 2007.) ส่วนการติดตามประสิทธิภาพโดยการตรวจวัดระดับยาในกระแสเลือด พบว่าการศึกษาส่วนใหญ่ไม่พบความสัมพันธ์ของระดับยาในกระแสเลือดและประสิทธิภาพทางคลินิก ตัวอย่างการศึกษาประสิทธิภาพของยา Levetiracetam ในผู้ป่วยเด็กที่ไม่ตอบสนองต่อการใช้ยากันชักรุ่นเก่า พบว่า ความถี่ในการเกิดอาการชักไม่มีความสัมพันธ์กับระดับยาในเลือดอย่างมีนัยสำคัญ (Sheinberg R, Heyman E, Dagan Z, Youngster I, Kohn E, Gandelman-Marton R, et al, 2015.) การศึกษาของ Lancelin และคณะ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับยา ในเลือดระหว่างผู้ตอบสนองต่อการรักษาและผู้ที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา (Lancelin F, Franchon E, Kraoul L, Garciau I, Brovedani S, Tababouti K, et al, 2007.) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Giroux และคณะ (Giroux PC, Salas-Prato M, Théorêt Y, Carmant L, et al, 2009.) แต่ก็มีบางการศึกษาที่พบความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพและระดับยาในเลือด ตัวอย่างเช่นในการศึกษาประสิทธิภาพของยา Levetiracetam ในการรักษา focal seizure ในผู้ป่วยเด็ก พบว่าระดับยาและความถี่ในการชักมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อติดตามการรักษาไปได้ 2 อาทิตย์และ 1 ปี (Iwasaki T, Toki T, Nonoda Y, Ishii M, et al, 2015.)

2.3. การตรวจวัดระดับยา Levetiracetam ในกระแสเลือด

ข้อมูลจากการศึกษาระดับยาที่เหมาะสมในกระแสเลือด (therapeutic range) เพื่อใช้ในการรักษา โรคลมชักให้มีประสิทธิภาพสูงสุดและเกิดผลข้างเคียงจากการใช้ยาต่ำสุดของยา Levetiracetam ยังมีอยู่อย่างจำกัด ทำให้ไม่สามารถระบุระดับยาได้อย่างชัดเจน แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าระดับยาที่เหมาะสมในกระแสเลือดของยา Levetiracetam เท่ากับ 10–37 มิลลิกรัมต่อลิตร (Neels HM, Sierens AC, Naelaerts K, Scharpé SL, Hatfield GM, Lambert WE, et al, 2004.) 12 – 46 มิลลิกรัมต่อลิตร (Krasowski MD, et al, 2010.) และ 20–40 มิลลิกรัมต่อลิตร (Stepanova D, Beran RG, et al, 2014.) เป็นต้น

2.4. การเตรียมตัวอย่าง

จุดประสงค์ของการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC คือการทำให้ตัวอย่างอยู่ใน

สภาพที่สามารถฉีดเข้าเครื่องมือได้สารที่วิเคราะห์จึงควรละลายอยู่ในตัวทำละลายที่เหมาะสม ถ้าสามารถใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นตัวทำละลายได้จะมีความเหมาะสมมากที่สุดแต่ถ้าไม่สามารถใช้เฟสเคลื่อนที่ได้ควรเป็นตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเฟสเคลื่อนที่อย่างน้อยที่สุดตัวทำละลายนั้นควรผสมเป็นเนื้อเดียวกับกับเฟส เคลื่อนที่ได้ ซึ่งส่วนใหญ่การเตรียมตัวอย่างจะเป็นขั้นตอนที่เสียเวลามากและทำให้ผลการทดลองผิดพลาดได้ง่าย ดังนั้นการเลือกวิธีในการเตรียมตัวอย่างให้เหมาะสมจึงมีความสำคัญมาก การเตรียมตัวอย่างมี 4 วิธี ดังนี้

2.4.1 Liquid-solid extraction

คือ การใช้ตัวทำละลายหรือส่วนผสมของตัวทำละลายที่สามารถละลายด้วยได้ดีแต่ไม่ละลายสารอื่นที่อยู่ในตำรับยาออกมา มักใช้กับตำรับที่เป็นของแข็ง เช่น ยาเม็ดหรือยาแคปซูล แต่การเตรียมตัวอย่างโดยวิธีนี้มักมีสารอื่นละลายออกมาด้วย ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ควรจะสามารถแยกพีค (peaks) ของตัวยาออกจากพีคของสารอื่นได้

2.4.2 Liquid-Liquid extraction

คือ การที่อาศัยคุณสมบัติของยาที่สามารถละลายในตัวทำละลาย 2 ชนิดที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งส่วนมากจะเป็นการสกัดตัวยาออกจากสารละลายที่เป็นน้ำให้เข้าไปอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ มีความนิยมมากแต่พบว่าประสิทธิภาพในการสกัดไม่ค่อยดีไม่สามารถสกัดสารออกมาได้อย่างสมบูรณ์ ใช้เวลาและตัวทำละลายในปริมาณสูงและไม่เหมาะกับการสกัดสารหลายชนิด

2.4.3 Solid-phase extraction (SPE)

คือ การใส่ตัวอย่างลงไปบนคอลัมน์พลาสติกเล็กๆที่มีรูปร่างคล้าย syringe ซึ่งมีสารดูดซับ (adsorbent) บรรจุอยู่การแยกมี 2 แบบ แบบแรกสารที่ต้องการวิเคราะห์จะถูกจับไว้ในคอลัมน์ในขณะที่สารปนเปื้อนอื่นๆจะผ่านออกมาก่อนต่อจากนั้นจึงค่อยชะสารที่ต้องการออกมาด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยใช้ตัวทำละลายเพียง 0.5 - 1.0 มิลลิกรัม จะทำให้ได้สารในความเข้มข้นที่สูงขึ้นมากเหมาะกับสารที่จะวิเคราะห์ที่มีความเข้มข้นต่ำหรือตัวอย่างประกอบด้วยสารหลายชนิดที่มีขั้วต่างกัน แบบที่สองสารปนเปื้อนจะถูกจับไว้ในคอลัมน์ ส่วนสารที่ต้องการจะผ่านออกมาก่อนเหมาะกับสารที่จะวิเคราะห์ที่มีความเข้มข้นสูง คุณสมบัติของสารดูดซับที่บรรจุอยู่จะคล้ายกับเฟสนิ่งใน HPLC แต่มีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า (40-50 ไมครอน) เหมาะกับการวิเคราะห์ตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม เช่น การวิเคราะห์ยากำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในน้ำหรือในดิน การตรวจวิเคราะห์ยาและแอมแทบอไลต์

2.4.4 Protein precipitation (PP)

ตัวอย่างจากของเหลวร่างกายจะมีสารประกอบจากร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน เป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูงมากและยาบางตัวจับอยู่กับโปรตีนทำให้ไม่สามารถฉีดตัวอย่างเข้าไปในเครื่อง HPLC ได้โดยตรง เพราะ นอกจากจะทำให้มีปัญหาในการแยกแล้วโปรตีนในเลือดยังทำให้คอลัมน์เสียหาย การตกตะกอนโปรตีนจึงเป็นขั้นตอนแรกในการเตรียมตัวอย่างที่ง่าย สะดวก รวดเร็วและนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งการตกตะกอนโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การให้ความร้อน การเติมกรดหรือเติม

ตัวทำละลายบางชนิด เช่น methanol, acetone, acetonitrile, trichloroacetic acid และ perchloric acid หลังจากนั้นจึงนำไปปั่นแยกตะกอนโปรตีนออกก่อนที่จะนำสารที่ได้ไปสกัดยาหรือทำการวิเคราะห์ต่อไป

2.5. การวิเคราะห์ยาด้วย HPLC

HPLC เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารออกจากสารผสมโดยอาศัยความแตกต่างของ interaction ของสารแต่ละชนิดระหว่างเฟสหนึ่งกับเฟสเคลื่อนที่ทำให้สารถูกจับอยู่ในคอลัมน์นานมากน้อยแตกต่างกัน ส่งผลให้สารจะถูกชะ (elute) ออกมาที่ละชนิดด้วยเฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นของเหลวการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่หรือตัวทำละลายจะถูกปั๊มผ่านเฟสหนึ่งที่มีอนุภาคขนาดเล็กซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์เฟสเคลื่อนที่ที่จะพาสารแต่ละชนิดออกจากคอลัมน์ผ่านเครื่องตรวจวัด (detector) ที่เหมาะสมแล้วแสดงผลออกมาในรูปแบบของโครมาโทแกรม (chromatogram) ที่ประกอบด้วยพีคของสารต่างๆที่มีอยู่ในสารผสมนั้น

2.5.1 ทฤษฎีพื้นฐานของ HPLC

ปัจจัยสำคัญที่จะทำให้ได้ระบบในการแยกที่ดีมีหลายประการ ประการแรกจะต้องพิจารณาถึงความสามารถในการแยกสารออกจากกัน (resolution) ประการที่สองคือความไวในการตรวจวัดสาร (sensitivity) ซึ่งมักจะสัมพันธ์กับความเฉพาะเจาะจง (specificity) ของเครื่องตรวจวัด ประการที่สามเพื่อให้ผู้วิเคราะห์มั่นใจว่าได้ผลถูกต้องวิธีที่ใช้จะต้องเชื่อถือได้และแม่นยำ ประการสุดท้ายเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องพิจารณาร่วมกันระหว่างประสิทธิภาพในการแยกกับเวลาที่เหมาะสม ประสิทธิภาพของระบบที่ใช้ในการแยกสามารถอธิบายและวัดได้ด้วยพารามิเตอร์ 3 อย่าง คือ

1) Capacity

การแยกที่มีประสิทธิภาพจะต้องใช้คอลัมน์ที่มีความสามารถที่จะจับสารไว้และแยกสารออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ “capacity factor” (k') ของคอลัมน์เป็นการวัดความสามารถของเฟสหนึ่งหรือวัสดุที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ว่าเกิด interaction กับสารตัวอย่างได้มากน้อยเพียงใด capacity factor มักขึ้นกับเฟสหนึ่งที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ถ้ามีค่าสูงแสดงว่าเฟสหนึ่งสามารถจับสารไว้ได้นาน ค่า capacity factor ที่เหมาะสมควรอยู่ระหว่าง 2-5 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมที่ทำให้การแยกสมบูรณ์และไม่ใช้เวลานาน

2) Selectivity

Selectivity (α) ของระบบในการแยกเป็นการวัดความแตกต่างของ retention time หรือ retention volume ระหว่างสาร 2 ชนิด หรือพีค 2 พีค ซึ่งจะอธิบายว่าระบบที่ใช้นั้นสามารถแยกสาร 2 ชนิดนั้นออกจากกันได้ดีเพียงใด ถ้า selectivity ประมาณ 1 แสดงว่าไม่สามารถแยกสารทั้งสองออกจากกันได้

3) Resolution

Resolution (R) เป็นเทอมที่ใช้อธิบายถึงความสามารถในการแยกสารออกจากกัน โดยวัดความแตกต่างระหว่าง retention time และความกว้างของพีคของสาร 2 ชนิด $R = 1.0$ หมายถึงสามารถแยกได้ 98% โดยมีพื้นที่ซ้อนทับกันเพียง 2%, $R = 1.25$ หมายถึงแยกได้เกือบสมบูรณ์ (99.4%) วิธีที่มี

ประสิทธิภาพมากที่สุดในการเพิ่มค่า R คือการเปลี่ยน selectivity หรือ capacity factor ของคอลัมน์

2.5.2 การแยกด้วยวิธี reversed-phase chromatography

1) วัสดุที่ใช้เป็นเฟสนิ่ง

เฟสนิ่ง ที่นิยมมากที่สุดสำหรับการแยกใน HPLC คือ octadecylsilyl (ODS) หรือ C18 ซึ่งได้มีการเปรียบเทียบ efficiency และ selectivity กับคอลัมน์อื่น ๆ แล้ว ODS ให้ผลดีที่สุดสำหรับงานหลายด้าน

2) เฟสเคลื่อนที่สำหรับการแยกแบบ reversed-phase ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่มักเป็นส่วนผสมของน้ำหรือ buffer กับตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น methanol, acetonitrile หรือ tetrahydrofuran ซึ่งการเพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ทำให้ความสามารถในการชะ (elution strength) สูงขึ้น และ retention time ลดลง ส่วนการใช้ buffer จำเป็นสำหรับการแยกสารที่แตกตัวได้ซึ่งต้องควบคุม pH ให้เหมาะสม ตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดนี้ methanol, acetonitrile และ tetrahydrofuran ไม่มีสเปกตรัมที่ดูดแสงอัลตราไวโอเล็ต จึงไม่รบกวนการตรวจวัดด้วย UV detector ตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด มี elution strength เพิ่มขึ้นตามลำดับ คือ methanol, acetonitrile และ tetrahydrofuran

2.5.3 ส่วนประกอบที่สำคัญของ HPLC (แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสมม, 2534; Dolan, 1989)

ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase Reservoir)

เป็นภาชนะชนิดแก้วใสหรือกึ่งทึบแสงที่ใช้บรรจุตัวทำละลายเฟสเคลื่อนที่ ก่อนที่จะถูกปั๊มเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟี ภายในภาชนะมีหัวกรอง (Inlet Frit) ขนาด 10 μm หรือเล็กกว่าเพื่อติดกับปลายสายของตัวทำละลายเฟสเคลื่อนที่ การใช้หัวกรองขนาดเล็กเกินไปอาจทำให้เกิดปัญหาการเกิดฟองในสายของตัวทำละลายได้ ในกรณีที่ใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่สูงๆ สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของตัวทำละลายก็มีความสำคัญมาก ในกรณีที่ต้องการตรวจวัดสารในปริมาณน้อยๆ (Trace Analysis) จำเป็นต้องใช้สารเคมีเกรด HPLC (HPLC-Grade) โดยทั่วไปการเลือกใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างและคอลัมน์ที่ใช้

ปั๊ม (Pump)

ปั๊มทำหน้าที่ขับเคลื่อนสารละลายเฟสเคลื่อนที่จากภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่สู่คอลัมน์โดยใช้ความดัน ส่วนมากปั๊มที่ใช้กับคอลัมน์ชนิด คอลัมน์วิเคราะห์ (Analytical Column) จะใช้อัตราการไหล (Flow-rate) อยู่ในช่วง 0.1-10.0 mL/min ภายใต้ความดันไม่เกิน 6000 psi ปั๊มชนิดนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด

- 1) Mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้คงที่
- 2) Pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้คงที่

ระบบฉีด (Injection)

เป็นระบบที่เก็บสารตัวอย่างก่อนที่จะพาเข้าสู่คอลัมน์ โดยจะมี Loop ปริมาตรในขนาดที่ต่างกันไป การผ่านสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีภายใต้สภาวะความดันสูงของเฟสเคลื่อนที่นั้นมีความสำคัญ เราสามารถทำได้โดยใช้ วาล์วฉีด (Injection valve) โดยมีข้อดีคือสามารถฉีดสารตัวอย่างสู่ระบบโครมาโทกราฟีได้โดยไม่ต้องหยุดการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ปัจจุบันสามารถนำมาใช้กับสารตัวอย่าง

ได้ในปริมาณน้อยๆคือ 0.5 μL จนถึงหลายมิลลิลิตร วาล์วนี๊ดที่ใช้ได้กับระบบที่มีความดันสูงถึง 6000 psi การเสื่อมของวาล์วนี๊ดอาจทำให้พีคของสารกว้าง (broadened peaked) ปริมาตรในการนี๊ดแต่ละครั้งที่เข้าสู่คอลัมน์ไม่แน่นอน ความดันของปั๊มไม่นิ่งและอาจทำให้เฟสเคลื่อนที่เร็วได้

คอลัมน์ (column)

สารที่ผ่านเข้าสู่คอลัมน์จะถูกแยกจากกันบนส่วนของคอลัมน์ โดยประสิทธิภาพของการแยกจะขึ้นอยู่กับชนิดของเฟสคงที่ (Stationary phase) และคุณสมบัติทางกายภาพของสาร คอลัมน์ที่ใช้จะมีความแตกต่างทั้งรูปร่าง บริษัทผู้แทนจำหน่ายเราอาจจำแนกชนิดของคอลัมน์และคุณสมบัติต่างๆได้ดังนี้

- 1) การแยกคอลัมน์ตามความแตกต่างของเทคนิคการวิเคราะห์ เช่น reversed-phase ใช้คอลัมน์ชนิด C_{18} ส่วน normal phase จะใช้คอลัมน์ชนิด Silica เป็นต้น
- 2) การแบ่งชนิดของคอลัมน์ตามความแตกต่างของเฟสคงที่ เช่น เฟสคงที่ชนิด Cyano, Phenyl, alkyl phase (C_8 , C_{18}) เป็นต้น
- 3) เป็นการแยกชนิดของคอลัมน์ตามความแตกต่างของ Packing Matrix ส่วนมากคอลัมน์โดยทั่วไปจะใช้ Packing Matrix เป็น porous silica อย่างไรก็ตามก็มีคอลัมน์ที่ใช้ polystyrene, polyethylene oxide เป็น Packing Matrix
- 4) เป็นการแยกชนิดของคอลัมน์ตามบริษัทผู้ผลิตแม้ว่าจะใช้ packing เหมือนกัน แต่จะให้ผลการแยกของสารแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขบวนการผลิตของแต่ละบริษัท
- 5) การจำแนกคอลัมน์ตามลักษณะของ Matrix เช่น ขนาด รูปร่าง และพื้นผิว ซึ่งลักษณะเหล่านี้จะมีผลทำให้คุณสมบัติของคอลัมน์แตกต่างไปด้วย เช่น plate-number, selectivity และ sample capacity เป็นต้น

ตัวตรวจวัด (Detector)

เป็นตัวตรวจวัดปริมาณของสารที่ออกมาจากคอลัมน์ ซึ่งชนิดของตัวตรวจวัด มีหลายประเภท ในการเลือกใช้นั้นจะพิจารณาจากคุณสมบัติของสารที่จะตรวจวัด ระดับของปริมาณสารที่ต้องการตรวจวัด โดยทั่วไปตัวตรวจวัดที่ใช้กันอย่างแพร่หลายได้แก่ UV-VIS Detector มีการเปรียบเทียบลักษณะจำเพาะของ Detector ที่ใช้กันที่น่าสนใจดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะเฉพาะที่สำคัญของตัวตรวจวัดในระบบโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูงที่ใช้กันเป็นส่วนใหญ่

Parameter (Unit)	UV (Absorbance)	RI (Ri units)	Radioactivity	Electrochemical ($\mu\text{ amp}$)
Type	Selective	General	selective	Selective
Useful with gradients	Yes	No	Yes	No
Upper limit of linear Dynamic range	2-3	10^{-3}	N.A. ^a	2×10^{-5}
Linear range (max)	10^5	10^4	Large	10^6

Parameter (Unit)	UV (Absorbance)	RI (Ri units)	Radioactivity	Electrochemical (μ amp)
Sensitivity at $\pm 1\%$ Noise, full-scale	0.002	2×10^{-6}	N.A.	2×10^{-9}
Sensitivity to favorable sample	2×10^{-10} g/ml	1×10^{-7} g/ml	50 cmp ¹⁴ C/ml	10^{-10} g/ml
Inherent flow sensitivity	No	No	No	Yes
Temperature sensitivity	Low	10-40 C	Negligible	1.5 %/°C

จากตารางที่ 1 จะสังเกตว่า detector จะมีลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ตามลักษณะงานในแต่ละงาน ในกรณีที่ต้องการความไวสูงๆ detector ที่ให้ความไวสูงคือ Electrochemical detector

เครื่องบันทึก (Integrator, Computer software)

จะเป็นเครื่องรับสัญญาณจาก Detector แล้วแปลงสัญญาณให้เป็น พิก อินทิเกรตกับ Software computer นั้นจะมีความสามารถสูงกว่า Recorder กล่าวคือ จะสามารถคำนวณและแปรผลของปริมาณตัวอย่างออกมาในรูปของความเข้มข้นได้เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน

2.5.4 องค์ประกอบอื่น ๆ ของ HPLC

1) สารละลาย (solvent) สารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่มีความจำเพาะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของ สารที่ต้องการแยก แต่ควรมีคุณสมบัติพื้นฐานที่เหมือนกันคือ มีความบริสุทธิ์สูงปราศจากสิ่งเจือปนและไม่ทำปฏิกิริยากับเฟสนิ่ง คอลัมน์ ตัวฉีต ตัวตรวจหาและสารที่ต้องการแยกจนทำให้สารที่ต้องการแยกเสื่อมสภาพไป นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงความหนืดและความปลอดภัยของสารละลายด้วยการใช้สารละลายไล่สารต่าง ๆ ออกจาก คอลัมน์อาจพบได้ใน 2 ลักษณะ คือ

1.1 Isocratic elution เป็นการใส่สารละลายเพียง 1 ชนิดไล่สารต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์

1.2 Gradient elution เป็นการใส่สารละลายมากกว่า 1 ชนิด หรือใช้สารละลายชนิดเดียวแต่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันไล่สารต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์ ซึ่งพบว่ามักมีประสิทธิภาพในการแยกสารออกจากกันได้ดีกว่า

2) สารละลายมาตรฐาน ใช้สำหรับเป็นตัวเปรียบเทียบหาปริมาณสารในสารตัวอย่าง สารละลายมาตรฐานอาจใช้งานใน 2 ลักษณะ คือ

2.1 สารมาตรฐานภายนอก (External standard) นิยมใช้สารบริสุทธิ์ชนิดเดียวกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ซึ่งเมื่อฉีดเข้าไปในคอลัมน์จะทำให้สามารถหาปริมาณของสาร

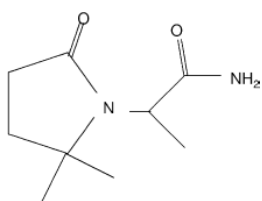
ตัวอย่างได้ ซึ่ง อาจจะอ่านค่าได้คลาดเคลื่อนไปจากความจริง ถ้าสภาพของคอลัมน์ หรือเครื่องมือในขณะทำการฟามาตรฐานและ การวิเคราะห์สารตัวอย่างแตกต่างกันมาก

2.2 สารมาตรฐานภายใน (Internal standard) เป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ ใช้เติมลงในสารมาตรฐานภายนอกและสารตัวอย่างในปริมาณที่คงที่ ก่อนทำการวิเคราะห์ ซึ่งเมื่อฉีด เข้าไปในคอลัมน์ จะปรากฏเป็นกราฟอ้างอิงในตำแหน่งที่คงที่ในเครื่องบันทึกผล ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในการ ตรวจสอบหาความผิดปกติของเครื่องมือ โดยการดูการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งหรือเวลาหน่วง (retention time) ของ สารมาตรฐานภายใน นอกจากนี้ยังสามารถคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างได้โดยการสร้างกราฟมาตรฐาน วิธีนี้มี ข้อดีตรงที่สามารถคำนวณหาปริมาณของสารตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง ถึงแม้ว่าเครื่องมือจะมีความผิดปกติในการ วิเคราะห์บ้าง เพราะเป็นการหาค่าที่เทียบสัดส่วนกับสารมาตรฐานภายใน

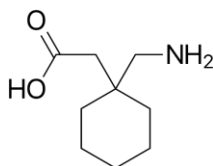
3) เฟสนิ่ง สารที่นำมาทำเป็นเฟสนิ่งมักมีขนาดที่คงที่สม่ำเสมอ อยู่ในช่วง 5-10 ไมครอน แต่เนื่องจาก เฟสนิ่งแต่ละชนิดมีพื้นที่ผิว ขนาดรู และสภาพมีขั้วต่างกันจึงจำเป็นต้องเลือกให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างแต่ละ ประเภท

2.6. ตัวอย่างสารมาตรฐานภายในที่ใช้ในการวิเคราะห์ยา Levetiracetam ด้วยวิธี HPLC

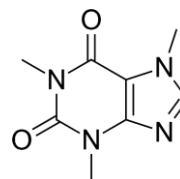
ในการวิเคราะห์ ระดับยา Levetiracetam ส่วนมากจะนิยมใช้ Internal standard คือ UCB17025 (30) ส่วนสารมาตรฐานภายในชนิดอื่นที่พบในการวิเคราะห์ ได้แก่ Gabapentin (40), Caffeine (41), Nelfinavir (42) และ Adenosine (43) ซึ่งสูตรโครงสร้างของสารมาตรฐานที่ใช้ แสดงดังรูปที่ 2 – 6



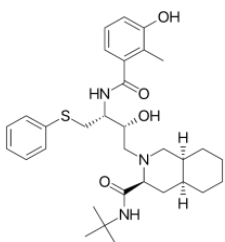
รูปที่ 2 UCB 17025 (30)



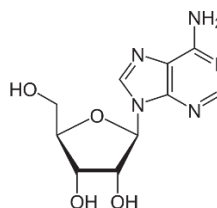
รูปที่ 3 Gabapentin (44)



รูปที่ 4 Caffeine (45)



รูปที่ 5 Nelfinavir (46)



รูปที่ 6 Adenosine (47)

2.7 ตัวอย่างวิธีการวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ด้วยวิธี HPLC

USP Pharmacopoeia ได้ทำการวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยเตรียมตัวอย่างละลายใน Acetonitrile และน้ำในอัตราส่วน 20:80 ใช้คอลัมน์ 4.6-mm x 25- cm; 4- μ m packing L1 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Isocratic Acetonitrile และ buffer ในอัตราส่วน 8:92 ซึ่ง buffer เตรียมจาก 1.4g/L ของ monobasic potassium phosphate และ 0.6g/L ของ sodium 1- heptanesulfonate แล้วปรับ pH ให้ได้ 2.8 ใช้ Flow rate 2 mL/min และ Detector 220 nm

BP Pharmacopoeia ได้ทำการวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยเตรียมตัวอย่างละลายในน้ำและ Acetonitrile ในอัตราส่วน 4:96 ใช้คอลัมน์ 4.6-mm x 25-cm; 5 μ m packing silica gel for chromatography ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Isocratic 1.96g/mL ของ sulfuric acid และ Acetonitrile ในอัตราส่วน 4:96 ใช้ Flow rate 1 mL/min และ Detector 205 nm

Martens-Lobenhoffer & Bode- Böger, 2005 ได้ทำการวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยเตรียมตัวอย่างด้วยการใช้ HClO₄ และ cyclohexane ในการตกตะกอนโปรตีน ใช้คอลัมน์ porous graphitic carbon analytical ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Gradient elution ของ 0.423% H₃PO₄ และ Acetonitrile ใช้ Flow rate 1 mL/min และ Detector 205 nm

Lancelin et al., 2007 ได้ทำการวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยเตรียมตัวอย่างด้วยการใช้ dichloromethane และเฟสเคลื่อนที่ในการตกตะกอนโปรตีน ใช้คอลัมน์ C-18 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Isocratic Methanol และ 10 mmole/L ของ ammonium buffer pH10 ในอัตราส่วน 30:70 ใช้ Flow rate 0.8 mL/min และ Detector 200 nm

Contin, Mohamed, Albani, Riva & Baruzzi, 2008 ได้ทำการวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยเตรียมตัวอย่างด้วยการใช้ Methanol ตกตะกอนโปรตีน ใช้คอลัมน์ C-18 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Isocratic 50 mM ของ Potassium dihydrogen phosphate buffer ปรับ pH 4.5 และ Acetonitrile ในอัตราส่วน 94:6 ใช้ Flow rate 1.5 mL/min และ Detector 205 nm

Antonilli, Brusadin, Filipponi, Guglielmi, & Nencini, 2011 ได้ทำการวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยเตรียมตัวอย่างด้วยการใช้ Acetonitrile และเฟสเคลื่อนที่ในการตกตะกอนโปรตีน ใช้คอลัมน์ C-18 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Isocratic ของ 30 mM potassium phosphate buffer ปรับ pH 3.7 และ Acetonitrile ในอัตราส่วน 65:35 ใช้ Flow rate 1 mL/min และ Detector 210 nm

Yeap LL & Lo YL 2014 ได้ทำการวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยเตรียมตัวอย่างด้วยการใช้ Acetonitrile ในการตกตะกอนโปรตีน ใช้คอลัมน์ C-18 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Isocratic ของ 0.1% formic acid และ Acetonitrile ในอัตราส่วน 40: 60 ใช้ Flow rate 0.5 mL/min และ Detector เป็น Mass spectrometer

Ibrahim, El-Yazbi, Barary, & Wagih, 2016 ได้ทำการวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยเตรียมตัวอย่างด้วยการใช้ Acetonitrile ในการตกตะกอนโปรตีน ใช้คอลัมน์ C-18 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น

Isocratic methanol: water: acetonitrile ในอัตราส่วน 30: 10: 60 ปรับ pH 5 ด้วย phosphoric acid ใช้ Flow rate 1.5 mL/min และ Detector 230 nm

Engelbrecht, Grobler, & Rheeders, 2017 ได้ทำการวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยเตรียมตัวอย่างด้วยการใช้ Methanol ในการตกตะกอนโปรตีน ใช้คอลัมน์ C-18 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Isocratic 50mM ของ KH_2PO_4 buffer และ Acetonitrile ในอัตราส่วน 90:10 ใช้ Flow rate 1.0 mL/min และ Detector 205 nm

Raju, Rao, Prakash, Mukkanti, & Srinivasu, 2008 ได้ทำการวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยเตรียมตัวอย่างด้วยการใช้เฟสเคลื่อนที่ในการละลาย ใช้คอลัมน์ C-18 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Isocratic Acetonitrile และ 0.03 M Potassium dihydrogen phosphate ในอัตราส่วน 15:85 ปรับ pH 3 ด้วย orthophosphoric acid ใช้ Flow rate 1.0 mL/min และ Detector 210 nm

Rao & Jahnvi, 2010 ได้ทำการวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยเตรียมตัวอย่างด้วยการใช้เฟสเคลื่อนที่ในการละลาย ใช้คอลัมน์ C-18 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Isocratic ของ 0.05 M KH_2PO_4 buffer ปรับ pH 3 ด้วย orthophosphoric acid ใช้ Flow rate 1.2 mL/min และ Detector 210 nm

Devanaboyina, Satyanarayana, & Rao, 2011 ได้ทำการวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยเตรียมตัวอย่างด้วยการใช้ Methanol ในการละลาย ใช้คอลัมน์ C-18 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Isocratic ของ Methanol: น้ำ : Triethylamine ในอัตราส่วน 75:25:5 ปรับ pH 4.6 acid ใช้ Flow rate 1.0 mL/min และ Detector 214 nm

Shah, Vidyasagar, & Barot, 2012 ได้ทำการวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยเตรียมตัวอย่างด้วยการใช้ Methanol ในการละลาย ใช้คอลัมน์ C-18 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Isocratic ของ Methanol: น้ำ: Acetonitrile ในอัตราส่วน 30:10:60 ใช้ Flow rate 1.0 mL/min และ Detector 212 nm

Ravisankar, Niharika, & Srinivasa Babu, 2015 ได้ทำการวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยเตรียมตัวอย่างด้วยการใช้เฟสเคลื่อนที่ในการละลาย ใช้คอลัมน์ C-18 ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น Isocratic ของ 10 mM Phosphate buffer ปรับ pH 3.0 ด้วย triethylamine : Acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50 ใช้ Flow rate 1.0 mL/min และ Detector 243 nm

2.8. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยาในตัวอย่างทางชีวภาพ ใช้เกณฑ์การประเมินตามประกาศ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง คำแนะนำในการจัดทำโครงการร่างการศึกษาชีวสมมูล ในมนุษย์ ประกาศ ณ วันที่ 3 สิงหาคม พ.ศ. 2549

2.8.1 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity/ Selectivity)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีการวิเคราะห์ทำได้โดยการวิเคราะห์ blank sample จำนวนอย่างน้อย 6 ตัวอย่างโดยวิธีที่พัฒนาขึ้น ผลการวิเคราะห์ต้องไม่ตรวจพบ interference ต่อยาที่ใช้ในการศึกษา รวมถึง internal standard

2.8.2 Lower limit of quantification (LLOQ)

ทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างยาในเลือด/ปัสสาวะโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ตัวอย่าง response ของตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้ควรมีค่ามากกว่า response ของ blank sample อย่าง น้อย 5 เท่า และเมื่อคำนวณ %accuracy และ %CV (coefficient of variation) ของ precision ค่า %accuracy ควรอยู่ระหว่าง 80-120 และ %CV ไม่ควรเกิน 20%

2.8.3 ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity/ Standard calibration curve)

กราฟที่เหมาะสมควรจะเป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและการตอบสนองทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างยาในเลือด/ปัสสาวะโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ระดับความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 6 ความเข้มข้น โดยความ เข้มข้นต่ำสุดของ calibration curve เป็นความเข้มข้นที่ระดับ LLOQ หาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) ระหว่าง response กับความเข้มข้นของยาที่ระดับต่าง ๆ โดยใช้ regression equation และคำนวณหาค่า coefficient of determination (r^2) ค่าที่คำนวณได้ ควรมีค่ามากกว่า 0.99 และค่า peak area ratio ที่วัดได้ของแต่ละความเข้มข้นไม่ ควรเบี่ยงเบนเกิน 15% ยกเว้น ที่ LLOQ ไม่ควรเกิน 20%

2.8.4 ความถูกต้อง (Accuracy)

ทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างในเลือด/ปัสสาวะโดยวิธีการที่พัฒนาขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ต่ำ (low concentration of quality control: LQC) กลาง (medium concentration of quality control: MQC) และสูง (high concentration of quality control: HQC) ในช่วงความเข้มข้นของ standard calibration curve ความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ตัวอย่าง คำนวณค่า % accuracy โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของยาที่วัดได้กับความเข้มข้นของ ยาที่เติมลงไป คูณด้วย 100 ค่า %accuracy ที่ได้รับควรอยู่ระหว่าง 85-115% ยกเว้นที่ LLOQ อยู่ระหว่าง 80-120%

2.8.5 ความแม่นยำ (Precision)

ทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างยาในเลือด/ปัสสาวะโดยพัฒนาขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ต่ำ (LQC) กลาง (MQC) และสูง (HQC) ในช่วงความเข้มข้นของ standard calibration curve ความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ตัวอย่าง ภายในวันเดียวกัน (within-day variation) และระหว่างวัน (between-day variation) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ค่า %CV ไม่ควรเกิน 15% ยกเว้นที่ LLOQ ไม่ควรเกิน 20%

2.8.6 Recovery of extraction

ทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างยาในเลือด/ปัสสาวะโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ต่ำ (LQC) กลาง (MQC) และสูง (HQC) ในช่วงความเข้มข้นของ standard calibration curve ความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ตัวอย่าง และวิเคราะห์ตัวอย่างยาใน mobile phase หรือ pure authentic standard โดยไม่ต้องทำการสกัดที่ระดับ ความเข้มข้นและจำนวนตัวอย่างเช่นเดียวกับตัวอย่างยาใน

พลาสมา คำนวณ %recovery การสกัดของยา และ internal standard โดยเปรียบเทียบ response ของยาหรือ internal standard ที่ผ่านกระบวนการสกัดกับ response ของยา หรือ internal standard ที่ไม่ผ่านกระบวนการสกัด คุณด้วย 100 ค่าที่คำนวณได้ควรมีค่าใกล้เคียง 100% หรือไม่น้อยกว่า 50-60% และมีความคงที่แม่นยำ

2.8.7 การทดสอบความคงตัว (Stability)

การทดสอบความคงตัวของยาในตัวอย่างทางชีวภาพ เป็นการทดสอบสภาวะการเก็บรักษา โดยพิจารณาถึง คุณสมบัติทางเคมีของยา ตัวอย่างทางชีวภาพ และระบบของการเก็บรักษา กระบวนการทดสอบความคงตัวควรทำโดย การประเมินความคงตัวของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในระหว่างการเก็บรักษา ตัวอย่าง การเก็บรักษาในระยะสั้นและระยะยาว และหลังจากผ่านกระบวนการ freeze and thaw cycles สภาวะที่ใช้ในการทดสอบความคงตัวควรเป็นสภาวะที่ ใกล้เคียงกับสภาวะจริงที่ใช้เก็บรักษาและวิเคราะห์ ตัวอย่าง อีกทั้งยังควรประเมินความคงตัวของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ในสารละลายเข้มข้น (stock solution) ด้วย

การทดสอบความคงตัวควรใช้ชุดของตัวอย่างที่มีการเตรียมขึ้นใหม่ โดยเตรียมได้จากสารละลายเข้มข้นของสาร ที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวอย่างทางชีวภาพที่ปราศจากสารที่ต้องการวิเคราะห์และสิ่งรบกวนอื่น ๆ สารละลายเข้มข้นของ สารที่ต้องการวิเคราะห์สำหรับการทดสอบความคงตัวควรเตรียมในสารละลายที่เหมาะสมในความเข้มข้นที่ทราบแน่ชัด

Freeze and Thaw Stability ทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างยาในเลือด/ปัสสาวะโดยวิธีที่พัฒนาที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับคือ ต่ำ (LQC) กลาง (MQC) และสูง (HQC) ในช่วงความเข้มข้นของ standard calibration curve ความเข้มข้นละอย่าง น้อย 3 ตัวอย่าง หลังจากเก็บตัวอย่างยาแบบ freeze-thaw ครบ 3 cycle (1 cycle คือการเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิที่ใช้ ในการเก็บรักษาตัวอย่างเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำออกมาละลายที่อุณหภูมิห้อง) คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนโดย เปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่วัดได้ของวันที่เริ่มเก็บตัวอย่างหรือความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียมขึ้นใหม่ ค่าที่ได้ควรอยู่ในช่วง $\pm 15\%$

Long-term stability ทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างยาในเลือด/ปัสสาวะโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ต่ำ (LQC) กลาง (MQC) และสูง (HQC) ในช่วงความเข้มข้นของ standard calibration curve ความเข้มข้นละอย่าง น้อย 3 ตัวอย่าง หลังจากเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานับจากวันที่เริ่มเก็บตัวอย่างจนถึง เวลาที่ทำการวิเคราะห์วันสุดท้าย (เช่น 1 เดือน, 2 เดือน เป็นต้น) คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนจากความเข้มข้นที่วัดได้ของ วันที่เริ่มเก็บตัวอย่างหรือความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียมขึ้นใหม่ ค่าที่ได้ควรอยู่ในช่วง $\pm 15\%$

Short-term stability ทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างยาในเลือด/ปัสสาวะโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ต่ำ (LQC) กลาง (MQC) และสูง (HQC) ในช่วงความเข้มข้นของ standard calibration curve ความเข้มข้นละ อย่างน้อย 3 ตัวอย่าง หลังจากนำตัวอย่างยาที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษามาละลายที่อุณหภูมิห้องที่เวลา 0, 3 และ 6 ชั่วโมง (ขึ้นกับระยะเวลาที่คาดว่าจะ

จะตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง) คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนโดยเปรียบเทียบ กับความเข้มข้นที่วัดได้ของเวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) หรือความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียมขึ้นใหม่ ค่าที่ได้ควรอยู่ในช่วง $\pm 15\%$

Post-preparative stability ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างยาในเลือด/ปัสสาวะโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ต่ำ (LQC) กลาง (MQC) และสูง (HQC) ในช่วงความเข้มข้นของ standard calibration curve ความเข้มข้นละอย่างน้อย 3 ตัวอย่าง หลังจากนำตัวอย่างยาที่ผ่านกระบวนการสกัดแล้วตั้งไว้ใน auto sampler (auto sampler stability) หรือตั้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (bench-top stability) เป็นระยะเวลาที่คาดว่าจะใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างในแต่ละ batch size ที่เตรียมสำหรับวิเคราะห์ในแต่ละครั้ง (เช่นกำหนดให้ batch size ของตัวอย่างที่เตรียมสำหรับวิเคราะห์ในหนึ่งครั้งเท่ากับ 20 ตัวอย่าง เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างเท่ากับ 20 นาที ดังนั้นเวลาที่ใช้ในการศึกษา post preparative stability ควรเท่ากับ 400 นาที หรือประมาณ 7 ชั่วโมง) ให้คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนโดยเปรียบเทียบความเข้มข้นที่วัดได้ของเวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) หรือความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียมขึ้นใหม่ ค่าที่ได้ควรอยู่ในช่วง $\pm 15\%$

Stock-solution stability ทำการวิเคราะห์หาปริมาณยาและ internal standard ของ stock solution ที่อุณหภูมิห้องเป็น เวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง แต่ถ้าทำการเก็บ stock solution ไว้ในที่เย็น ควรระบุอุณหภูมิที่ใช้เก็บและให้ทำการวิเคราะห์ เป็นระยะเวลาที่คาดว่าจะเก็บ stock solution นั้นไว้ คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนโดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ stock solution ที่เตรียมขึ้นใหม่ ค่าที่ได้ควรอยู่ในช่วง $\pm 2\%$

โดยมีผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยา Levetiracetam ในรูปแบบยาเตรียมจากรายงานการวิจัยดังนี้

Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger, 2005 ได้ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยมีค่า Linearity 1-75 $\mu\text{g/mL}$ ค่า LOD 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ค่า LOQ 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ค่า% RSD < 3% และ Accuracy > 6%

Lancelin et al., 2007 ได้ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยมีค่า Linearity 0.5-500 $\mu\text{g/mL}$ ค่า LOQ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ และค่า% RSD < 5%

Contin, Mohamed, Albani, Riva, & Baruzzi, 2008 ได้ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยมีค่า Linearity 4-80 $\mu\text{g/mL}$ ค่า LOD 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ค่า LOQ 2.0 $\mu\text{g/mL}$ ค่า% RSD 2.2-7% และ Accuracy 0.7-6.5%

Antonilli, Brusadin, Filipponi, Guglielmi, & Nencini, 2011 ได้ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยมีค่า Linearity 0-40 $\mu\text{g/mL}$ ค่า LOD 0.6 $\mu\text{g/mL}$ ค่า LOQ 1.95 $\mu\text{g/mL}$ และค่า% RSD 0.19-7.85 %

Yeap LL & Lo YL, 2014 ได้ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยมีค่า Linearity 0.5-100 $\mu\text{g/mL}$ ค่า LOD 0.25 $\mu\text{g/mL}$ ค่า LOQ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ ค่า% RSD 0.47-49.81% และ Accuracy 94.51-104.41%

Ibrahim, El-Yazbi, Barary, & Wagih, 2016 ได้ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยมีค่า Linearity 0.5-5.0 µg/mL ค่า LOD 0.25 µg/mL ค่า LOQ 0.48 µg/mL ค่า% RSD 0.95-1.48% และ Accuracy 96.58-98.89%

Engelbrecht et al., 2017 ได้ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยมีค่า Linearity 1-60 µg/mL ค่า LOD 0.5 µg/mL ค่า LOQ 1.0 µg/mL ค่า% RSD 0.17-3.33% และ Accuracy 99-110%

Raju, Rao, Prakash, Mukkanti, & Srinivasu, 2008 ได้ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยมีค่า Linearity 20-240 µg/mL ค่า LOD 0.16µg/mL ค่า LOQ 0.5 µg/mL และ Accuracy 100.024%

Rao & Jahnavi, 2010 ได้ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยมีค่า Linearity 20-120 µg/mL ค่า LOD 0.0104 µg/mL ค่า LOQ 0.0317 µg/mL ค่า% RSD <1% และ Accuracy 100.048%

Devanaboyina, Satyanarayana, & Rao, 2011 ได้ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยมีค่า Linearity 6-12 µg/mL ค่า LOD 0.06 µg/mL ค่า LOQ 0.15 µg/mL ค่า% RSD 0.75% และ Accuracy 99.49%

Shah, Vidyasagar, & Barot, 2012 ได้ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยมีค่า Linearity 0.01-1.5 µg/mL ค่า LOD 0.005 µg/mL ค่า LOQ 0.01µg/mL ค่า% RSD 1.302-1.91% และ Accuracy 0.205-0.492%

Ravisankar, Niharika, & Srinivasa Babu, 2015 ได้ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยา Levetiracetam โดยมีค่า Linearity 10-50 µg/mL ค่า LOD 0.468 µg/mL ค่า LOQ 1.421µg/mL ค่า% RSD 0.14% และ Accuracy 98.63-99.72%

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 รูปแบบงานวิจัย

เป็นการศึกษาวิจัยเชิงทดลอง (Experimental analysis)

3.2 ขอบเขตการวิจัย

เป็นการวิเคราะห์หาระดับยา Levetiracetam ในตัวอย่างพลาสมา โดยตัวแปรต้นที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ คือ สภาวะในการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC เช่น ชนิดของเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล ชนิด internal standard ตัวแปรตามที่ศึกษา คือ วิธีวิเคราะห์ระดับยา Levetiracetam ในพลาสมาที่ง่าย สะดวกและรวดเร็ว โดยศึกษาในช่วงเวลา ระหว่าง เดือนสิงหาคม พ.ศ.2560 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ.2561

3.3 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.4 กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือดที่ได้รับบริจาคจากคลังเลือดกลาง โรงพยาบาลศรีนครินทร์ โดยตัวอย่างเลือดได้ถูกขนส่งและเก็บ รักษาในสภาวะตามมาตรฐาน และสามารถใช้เป็นตัวแทนเลือดที่ได้รับมาจากผู้ป่วยที่ใช้ยา Levetiracetam ในการรักษาโรคลมชัก

3.5 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

3.5.1 เครื่องมือ

1. Agilent 1100 Series HPLC (Agilent Technologies, Product number G2175AA) coupled to Visible Wavelength Detector (Model G1314A Serial #JP33323666), Isocratic pump (Model G1310A Serial #DE40906539), and 20 μ L Manual injector volume (Model G1328B Serial #DE11403290)

2. HP core Chemstation program for LC Rev. A. 10.02 [1757] copyright Agilent Technologies 1990-2003

3. Exmire® microsyringe MS-R50

4. UV-Visible Spectrophotometer model: PharmaSpec UV-1700 (Bara Scientific Co., Ltd.- Shimadzu) serial No. A11024101019LP

5. Analytical balance model: SI-234 (Denver Instrument) Serial No. 26160567

6. Ultrasonic Cleaner Set (Sonicator) model: WUC-D22H (Daihan Scientific Co., Ltd.- Wisc) Serial No. 008330213AD002

7. Filtering apparatus

8.Centrifuge model: 6200 (Kubota corporation- Kubota) Serial No. J10360-F000

9.Vortex mixer model No. S0100-220 (National Labnet Co., Inc-Labnet) Serial No. 99061

10.Chest freezer model: SJC403 (Sharp)

3.5.2 อุปกรณ์

1.Agilent Poroshell 120 EC-C18 reversed-phase column (250 x 4.6 mm, 4 µm) Serial No.USHKC01973 Packing lot# B17343 with guard column

2.Scientific Multi-Volume Adjustable Autoclavable Micropipette 100-1000 µL and 50 µL

3.Synthetic quartz cuvette (Hellma® Analytics) Light path 10x4 mm, Art. No. 104-600-10-K-41

4.Beaker (Schott®) size 25, 100, 250, 2000 mL

5.Volumetric flask (Isolab®) size 10, 25, 50, 250, 500 mL

6.Laboratory bottle (Schott®) size 250, 500, 1000, 2000 mL

7.Cylinder (Simax®) size 100 mL; (Vitlab®) size 500, 1000 mL

8.Funnel

9.Eppendorf

10.Vial (Agilent®)

11.Centrifuge tube (Plastic) size 14 mL

12.Stirring rod

13.Dropper and Rubber bulb

14.Spoon and spatula

15.Membrane filter 0.45 µm

16.Nylon syringe filter 0.45 µm

17.Syringe (Plastic) (Nipro®) size 12 mL

18.pipet tip

3.5.3 สารเคมี

1 . Levetiracetam HPLC (Sigma-Aldrich®, Shanghai, China) L8 8 6 8 - 5 0 mg
Lot#034M4709V PCode:12015 ความบริสุทธิ์ $\geq 98\%$

2.Nelfinavir mesylate (Hetero labs Limited) Lot No. NE0060203 mfd: Feb 2003

3.Methanol HPLC grade (Honeywell | Burdick & Jackson®, Muskegon MI, USA) UN
1230 Cat. AH230-4 Matl No. 10071753 Lot No. DK304

4. Acetonitrile HPLC grade (RCI Labscan Ltd, Bangkok, Thailand) UN 1648 LC1005-G2.5L Batch No. 16 11 0016

5. Formic acid analytical reagent grade 98/100% (Fisher Chemicals) UN 1779 Code: F/1900/PB17 Batch No. 0385851

6. Industrial nitrogen (Linde, Samutprakan, Thailand) UN 1066

7. Ultrapure water (18.2 M Ω) ได้มาจากเครื่อง Purelab® Option-Q (Elga)

8. Thawed Plasma (O Rh+) Unit No. 60-06909 Collection date: 12/09/2560 09:27; Nonreactive for anti-HIV, HBsAg, anti-HCV, syphilis, NAT: HIV, HCV, HBV (คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียสก่อนทำการวิเคราะห์

3.6 ขั้นตอนการทำวิจัย

3.6.1 การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ใช้ 0.1% Formic acid: ACN อัตราส่วน 40:60 ปริมาตร 1500 mL

เตรียมโดยปิเปต 98% Formic acid 510 μ L ใส่ใน volumetric flask ขนาด 500 mL ปรับปริมาตรให้ครบ 500 mL ด้วย ultrapure water (ทำซ้ำอีกครั้งจนได้ปริมาตรของ 0.1% Formic acid เท่ากับ 1000 mL) ตวง 0.1% Formic acid 600 mL และ Acetonitrile 900 mL ผสมลงใน beaker ขนาด 2000 mL โดยเท 0.1% Formic acid ลงใน ACN แบ่งสารละลายมา 500 mL สำหรับใช้ reconstitute ในขั้นตอนการเตรียมพลาสมา และ 1000 mL สำหรับเป็น mobile phase ในการวิเคราะห์ ซึ่ง mobile phase ควรนำมากรองผ่านเมมเบรนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 μ m และนำไป sonicate นาน 15 นาที ก่อนนำไปทำการวิเคราะห์

2. สารละลายสารมาตรฐานภายใน (internal standard; IS) เตรียม Nelfinavir ความเข้มข้นเท่ากับ 1 mg/mL

เตรียมโดยชั่งสารมาตรฐาน Nelfinavir ปริมาณ 25 mg ใส่ volumetric flask ขนาด 25 mL เติม ACN 20 mL ลงไปใน volumetric flask แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปรับปริมาตรด้วย ACN จนครบ 25 mL แล้วแบ่งเก็บ ใน eppendorf ปริมาตร 1 mL จำนวน 25 eppendorf

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน stock solution

stock solution ของยา Levetiracetam ผู้วิจัยทำการเตรียม stock solution ของยา Levetiracetam ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL และเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50, 100 และ 250 μ g/mL โดยมีรายละเอียดดังนี้

- 1) การเตรียม stock solution ของ Levetiracetam ความเข้มข้น 1 mg/mL ชั่งสารมาตรฐาน Levetiracetam ปริมาณ 10 mg ใส่ volumetric flask ขนาด 10 mL เติม ACN 8 mL ลงไป

ใน volumetric flask แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปรับปริมาตรด้วย ACN จนครบ 10 mL แล้วแบ่งเก็บใน eppendorf ปริมาตร 1 mL จำนวน 10 eppendorf

- 2) เจือจาง stock solution ให้ได้ความเข้มข้น 50 µg/mL ปิเปต stock solution ของ Levetiracetam ความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 50 µL ใส่ใน eppendorf จากนั้นปิเปต ACN ปริมาตร 950 µL แล้ว vortex ให้สารละลายทั้ง 2 ผสมเข้ากันดี
- 3) เจือจาง stock solution ให้ได้ความเข้มข้น 100 µg/mL ปิเปต stock solution ของ Levetiracetam ความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 100 µL ใส่ใน eppendorf จากนั้นปิเปต ACN ปริมาตร 900 µL แล้ว vortex ให้สารละลายทั้ง 2 ผสมเข้ากันดี
- 4) เจือจาง stock solution ให้ได้ความเข้มข้น 250 µg/mL ปิเปต stock solution ของ Levetiracetam ความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 250 µL ใส่ใน eppendorf จากนั้นปิเปต ACN ปริมาตร 750 µL แล้ว vortex ให้สารละลายทั้ง 2 ผสมเข้ากันดี

3.6.2 การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างพลาสมา ผู้วิจัยเลือกใช้การตกตะกอนโปรตีนในการเตรียมตัวอย่างพลาสมา โดยใช้ ACN เป็นตัวตกตะกอนโปรตีน ปริมาตรที่ใช้ คือ 450 ไมโครลิตร และใช้พลาสมา ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ใน eppendorf ปริมาตรของ ACN, stock solution ของ Levetiracetam และ internal standard ที่ใช้ในแต่ละความเข้มข้น แสดงดังตารางที่ 9 หลังจากนั้นนำมา vortex เป็นเวลา 60 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงในอัตรา 15,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสที่อยู่ด้านบนใส่ centrifuge tube นำไปผ่านแก๊สไนโตรเจนเพื่อทำให้แห้ง reconstituted ด้วย mobile phase 1 mL แล้วนำไป vortex เป็นเวลา 30 วินาที sonicate อีก 5 นาที และปั่นเหวี่ยง อีกครั้งด้วยอัตรา 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปใส่ vial เพื่อเตรียมสำหรับการวิเคราะห์ต่อไป ตารางที่ 2 ปริมาตรของพลาสมา, ACN, stock solution ของ Levetiracetam และ Internal standard ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างพลาสมา

	ปริมาตรที่ใช้ (µL)								
	Blank	Zero	2.50	5.00	10.00	25.00	50.00	75.00	100.00
		sample	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
Plasma	50	50	50	50	50	50	50	50	50
ACN	450	400	350	300	300	150	350	100	300
IS*	0	50	50	50	50	50	50	50	50
LEV	0	0	501	1001	1002	2502	504	3003	1004
Total	500	500	500	500	500	500	500	500	500

ACN = Acetonitrile, IS = Internal standard, LEV = Levetiracetam;

* เตรียมจาก stock solution ของ Internal standard ความเข้มข้น 1 mg/mL, 1 เตรียมจากสารละลายของ Levetiracetam ความเข้มข้น 50 µg/mL, 2 เตรียมจากสารละลายของ Levetiracetam ความเข้มข้น 100 µg/mL, 3 เตรียมจากสารละลายของ Levetiracetam ความเข้มข้น 250 µg/mL, 4

3.6.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ยา Levetiracetam ที่พัฒนาขึ้น ตามประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง คำแนะนำในการจัดทำโครงการร่างการศึกษาชีวสมมูลในมนุษย์ ประกาศ ณ วันที่ 3 สิงหาคม พ.ศ. 2549 ซึ่งประกอบด้วย linearity lower limit of quantification accuracy precision recovery of extraction และ stability ยึดตามเกณฑ์ที่ระบุไว้ในภาคผนวก โดยมีรายละเอียดขั้นตอนการตรวจสอบ ความถูกต้อง ดังนี้

1. Linearity สามารถทำได้โดยการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง peak area ของ Levetiracetam หารด้วย peak area ของ internal standard หรือเรียกว่า peak area ratio (แกน y) และความเข้มข้นของ Levetiracetam (แกน x) โดยความเข้มข้นของ Levetiracetam ที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์เชิงเส้น ได้แก่ 2.50 5.00 10.00 25.00 50.00 75.00 และ 100.00 µg/mL ใช้จำนวนตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น เท่ากับ 5 ตัวอย่าง ใช้สถิติ simple linear regression และ ANOVA ในการหาสมการเชิงเส้นและค่า coefficient of determination (r^2) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel version 2013 พร้อมทั้ง คำนวณหาค่า %accuracy และ coefficient of variation (CV) เพื่อใช้ในการพิจารณาหาค่า LLOQ ต่อไป ซึ่งมีสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\%accuracy = \frac{\text{Measured concentration} \times 100}{\text{Nominal concentration}}$$

$$CV\% = \left(\frac{\text{Standard deviation}}{\text{Mean}} \right) \times 100$$

2. Lower limit of quantification สามารถทำได้โดยการพิจารณาจากค่า response ของตัวอย่างหารด้วย response ของ blank sample %accuracy และ coefficient of variation (CV) ตามสูตรคำนวณใน ข้อ 1

3. Accuracy สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 4 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นที่ LLOQ LQC MQC และ HQC (5.00 10.00 50.00 และ 100.00 µg/mL ตามลำดับ) ใช้จำนวนตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น เท่ากับ 5 ตัวอย่าง และพิจารณาจากค่า average accuracy (%) ซึ่งคำนวณได้จากค่าเฉลี่ยของ %accuracy และ coefficient of variation (CV) ตามสูตรคำนวณในข้อ 1

4. Precision สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 4 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นที่ LLOQ LQC MQC และ HQC (5.00 10.00 50.00 และ 100.00 µg/mL ตามลำดับ) ใช้จำนวนตัวอย่าง

ในแต่ละความเข้มข้น เท่ากับ 5 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ที่เวลา 10.00 น. 15.00 น. และ 20.00 น. ภายในวันเดียวกัน สำหรับ within-day assay ทำการวิเคราะห์ที่เวลา 13.00 น. ของแต่ละวัน เป็นเวลา 5 วัน สำหรับ between-day assay และพิจารณาจากค่า coefficient of variation (CV) ตามสูตรคำนวณในข้อ 1

5. Recovery of extraction สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 4 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นที่ LLOQ LQC MQC และ HQC (5.00 10.00 50.00 และ 100.00 µg/mL ตามลำดับ) ใช้จำนวนตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น เท่ากับ 5 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างในรูปแบบยาเตรียม (unextracted) และตัวอย่างในพลาสมา (extracted) จากนั้นนำมาคำนวณหา average coefficient of variation (CV) ซึ่งคำนวณได้ จากค่าเฉลี่ยของ coefficient of variation (CV) ตามสูตรคำนวณในข้อ 1 และ average recovery (%) ซึ่งคำนวณ ได้จากค่าเฉลี่ยของ %recovery ตามสูตรคำนวณด้านล่าง

$$\%recovery = \frac{\text{Extracted concentration}}{\text{Unextracted concentration}} \times 100$$

6. Stability สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 4 ความเข้มข้น ได้แก่ ความเข้มข้นที่ LLOQ LQC MQC และ HQC (5.00 10.00 50.00 และ 100.00 µg/mL ตามลำดับ) ใช้จำนวนตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น เท่ากับ 3 ตัวอย่าง การทดสอบ Freeze-thaw stability สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ Levetiracetam ที่วัดได้ของวันที่เริ่มเก็บตัวอย่างและเมื่อเก็บตัวอย่างแบบ freeze-thaw ครบ 3 cycle (1 cycle คือ การเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำออกมาละลายที่อุณหภูมิห้อง) และ คำนวณหาค่าเบี่ยงเบน (%difference) การทดสอบ Long-term stability สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ Levetiracetam ที่วัดได้ของวันที่เริ่มเก็บตัวอย่างและเมื่อเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 1 เดือน และคำนวณหาค่าเบี่ยงเบน การทดสอบ Short-term stability สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ Levetiracetam ที่วัดได้ของเวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) และเมื่อนำตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาละลายที่อุณหภูมิห้องที่เวลา 3 และ 6 ชั่วโมง และคำนวณหาค่าเบี่ยงเบน การทดสอบ Stock-solution stability สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ stock solution Levetiracetam และ Internal standard ที่เตรียมขึ้นใหม่และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่คาดว่าจะเก็บ stock solution นี้ไว้ และคำนวณหาค่าเบี่ยงเบน ซึ่งมีสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\%difference = \frac{|(\text{Freshly prepared concentration Stability concentration}) \times 100|}{\text{Freshly prepared concentration}}$$

เมื่อ Freshly prepared concentration คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของตัวอย่าง Stability concentration คือ ความเข้มข้นหลังจากเก็บตัวอย่างในสภาวะต่าง ๆ

3.6.4 สถิติที่ใช้และวิธีการวิเคราะห์

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive statistics) และสถิติอนุมาน (Inferential statistics) สถิติเชิงพรรณนาที่ใช้ ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) สัมประสิทธิ์ ความแปรปรวน (coefficient of variation) โดยใช้ในการตรวจสอบ lower limit of quantification accuracy precision recovery of extraction และ stability และใช้สถิติอนุมาน ได้แก่ simple linear regression และ ANOVA ในการตรวจสอบ linearity ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดคำนวณได้จาก โปรแกรม Microsoft Excel version 2013

บทที่ 4

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาและอภิปรายผล

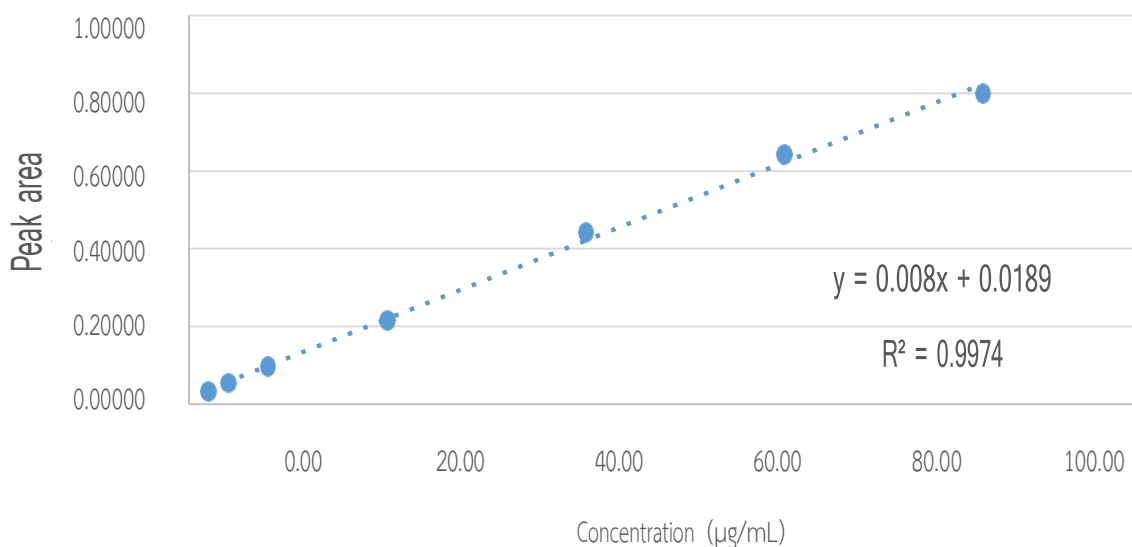
4.1.1 ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

ความเข้มข้นของ Levetiracetam ที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์เชิงเส้น ได้แก่ 2.50, 5.00, 10.00, 25.00, 50.00, 75.00 และ 100.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้จำนวนตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น เท่ากับ 5 ตัวอย่าง แล้วนำมาหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง peak area ของ Levetiracetamหารด้วย peak area ของ internal standard (peak area ratio) และความเข้มข้นของ Levetiracetam ค่าที่ได้แสดงดังตารางที่ 1 ตารางที่ 3 Peak area ratio และความเข้มข้นของ Levetiracetam

Concentration (µg/mL)	Peak area ratio (n = 5)	SD	CV (%)
2.50	0.03263	0.00	7.03
5.00	0.05509	0.00	4.76
10.00	0.09755	0.00	2.12
25.00	0.21557	0.00	0.68
50.00	0.44153	0.00	0.31
75.00	0.64270	0.00	0.38
100.00	0.79988	0.00	0.38

SD = standard deviation, CV = coefficient of variation

จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Levetiracetam และ peak area ratio ได้กราฟ ความสัมพันธ์ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยมีสมการเส้นตรง คือ $y = 0.008x + 0.0189$ และมีค่า coefficient of determination เท่ากับ 0.9974



รูปที่ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Levetiracetam และ Peak area ratio

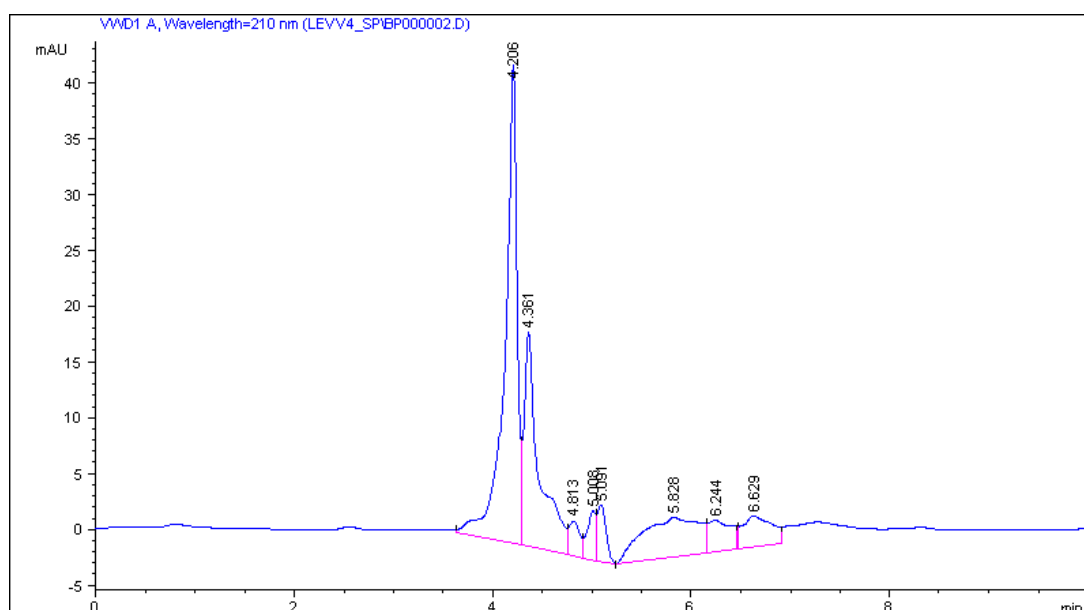
เมื่อทำการคำนวณกลับเพื่อหาความเข้มข้นที่วัดได้จริง ได้ค่าดังแสดงในตารางที่ 2 โดยมีช่วงความเข้มข้น (range) อยู่ระหว่าง 5.00 – 100.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า LLOQ เท่ากับ 5.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากมีค่า coefficient of variation และ %accuracy อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของยา Levetiracetam ที่คาดการณ์กับที่ได้จากการคำนวณ

Nominal Concentration (µg/mL)	Measured Concentration, mean ±CV (%) SD (µg/mL) (n=5)	Accuracy (%)
2.50	1.72 ± 0.29	67.32
5.00	4.52 ± 0.33	88.71
10.00	9.83 ± 0.26	96.38
25.00	24.58 ± 0.18	96.40
50.00	52.83 ± 0.17	103.59
75.00	77.97 ± 0.31	101.93
100.00	97.62 ± 0.38	95.71

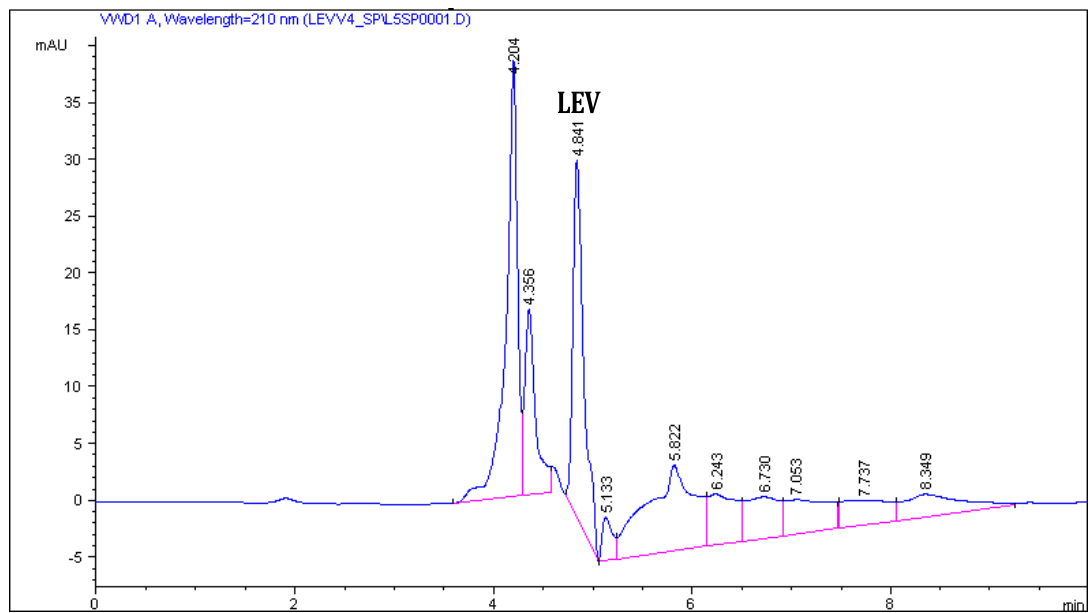
SD = standard deviation, CV = coefficient of variation

4.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

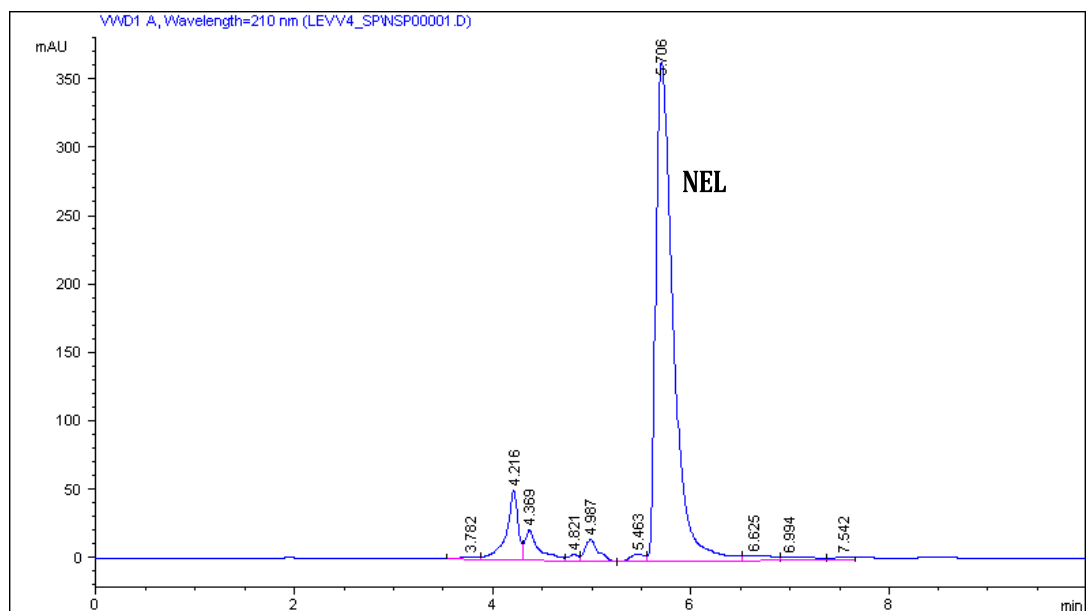
การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ พบว่า blank serum ไม่มีผลรบกวนการวิเคราะห์ไม่ว่าจะเป็นตำแหน่งของ Levetiracetam และ internal standard แสดง Chromatogram ของ Spike standard serum และจากตัวอย่างผู้ป่วย ดังรูป 8-11



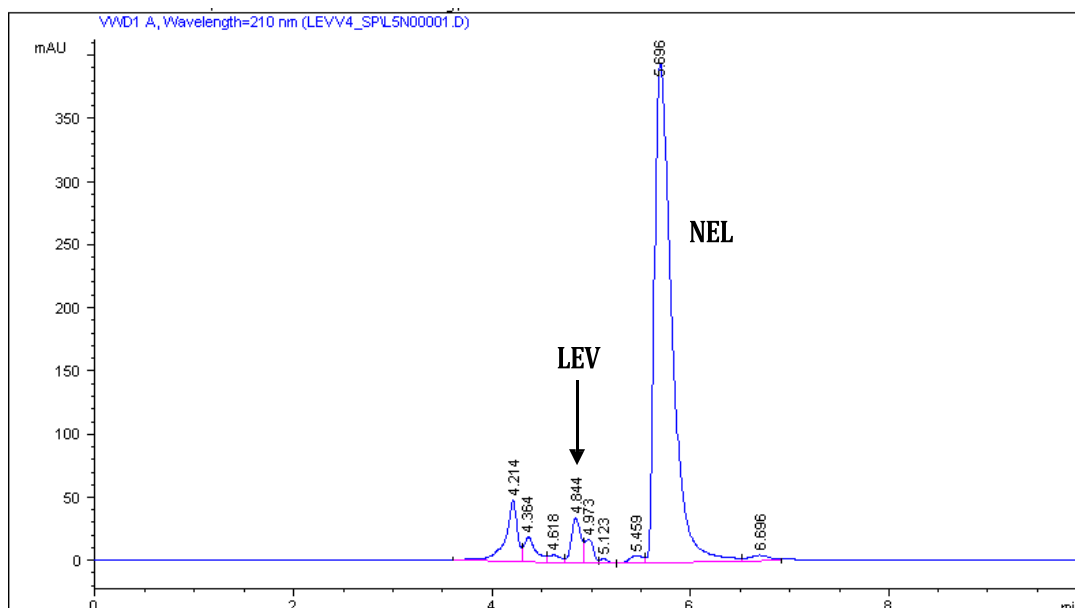
รูปที่ 8 Chromatogram ของ blank plasma



รูปที่ 9 Chromatogram ของ Levetiracetam ในพลาสมา



รูปที่ 10 Chromatogram ของ Internal standard (Nelfinavir) ในพลาสมา



รูปที่ 11 Chromatogram ของ Levetiracetam และ Internal standard ในพลาสมา

4.3 ความถูกต้อง (Accuracy)

ความเข้มข้นของ Levetiracetam ที่ใช้ในการตรวจสอบ Accuracy ได้แก่ ความเข้มข้นที่ LLOQ, LQC, MQC และ HQC (5.00, 10.00, 50.00 และ 100.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ใช้จำนวนตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น 5 ตัวอย่าง โดยมีค่า coefficient of variation อยู่ระหว่าง 0.32 – 7.25 % ค่าเฉลี่ยของ %accuracy อยู่ระหว่าง 93.09 – 111.13 % และค่าความเข้มข้นที่วัดได้จริงแสดงดังตารางที่ 5 ตารางที่ 5 Accuracy ของวิธีวิเคราะห์ Levetiracetam ในพลาสมา

Level	Nominal Concentration (mcg/ml)	Accuracy assay (n = 5)		
		Measured Concentration, mean $\pm$ SD (mcg/ml)	CV (%)	Average Accuracy (%)
LLOQ	5.00	5.55 $\pm$ 0.12	7.25	108.77
LQC	10.00	11.34 $\pm$ 0.29	2.63	111.13
MQC	50.00	47.48 $\pm$ 0.17	0.32	93.09
HQC	100.00	103.97 $\pm$ 0.44	0.39	101.93

LLOQ = LLOQ concentration sample, LQC = Low concentration QC sample, MQC = Medium concentration QC sample, HQC = High concentration QC sample, SD = standard deviation, CV = coefficient of variation

4.4 ความแม่นยำ (Precision)

ความเข้มข้นของ Levetiracetam ที่ใช้ในการตรวจสอบ Precision ได้แก่ ความเข้มข้นที่ LLOQ, LQC, MQC และ HQC (5.00, 10.00, 50.00 และ 100.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ใช้จำนวนตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น 5 ตัวอย่าง แบ่งการศึกษาเป็น Within-day assay ที่ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างภายในวันเดียวกัน มีค่า coefficient of variation อยู่ระหว่าง 3.60 – 15.41 % และ Between-day assay ที่ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างระหว่างวัน มีค่า coefficient of variation อยู่ระหว่าง 1.94 – 14.86 % และค่าความเข้มข้นที่วัดได้จริงแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 Precision (Within-day and Between-day) ของวิธีวิเคราะห์ Levetiracetam ในพลาสมา

Level	Within-day assay (n = 5)			Between-day assay (n = 5)	
	Nominal	Measured Concentration,	CV (%)	Measured	CV (%)
	Concentration (µg/mL)	mean ± SD (µg/mL)		Concentration, mean ± SD (µg/mL)	
LLOQ	5.00	4.27 ± 0.66	15.41	4.83 ± 0.72	14.86
LQC	10.00	9.53 ± 1.31	13.73	10.84 ± 1.56	14.36
MQC	50.00	48.20 ± 1.73	3.60	48.29 ± 2.55	5.28
HQC	100.00	95.44 ± 3.49	3.66	101.73 ± 1.97	1.94

LLOQ = LLOQ concentration sample, LQC = Low concentration QC sample, MQC = Medium concentration QC sample, HQC = High concentration QC sample, SD = standard deviation, CV = coefficient of variation

ความเข้มข้นของ Levetiracetam ที่ใช้ในการตรวจสอบ Precision of injection คือ 75.00 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร มีค่า coefficient of variation และค่าความเข้มข้นที่วัดได้จริงแสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 Precision of injection ของวิธีวิเคราะห์ Levetiracetam ในพลาสมา

Precision of injection (n = 10)		
Nominal	Measured Concentration,	CV (%)
Concentration (µg/mL)	mean ± SD (µg/mL)	
75.00	78.65 ± 0.28	0.36

4.5 Recovery of extraction

ความเข้มข้นของ Levetiracetam ที่ใช้ในการหา Recovery of extraction ได้แก่ ความเข้มข้นที่ LLOQ LQC MQC และ HQC (5.00 10.00 50.00 และ 100.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ใช้จำนวนตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น 5 ตัวอย่าง โดยมีค่าเฉลี่ยของ coefficient of variation อยู่ระหว่าง 0.63 – 2.73 % ค่าเฉลี่ยของ % recovery อยู่ระหว่าง 89.42 – 102.13 % และค่าความเข้มข้นที่วัดได้จริงของตัวอย่างในรูปแบบยาเตรียม (unextracted) และ ตัวอย่างในพลาสมา (extracted) แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 Recovery ของวิธีวิเคราะห์ Levetiracetam ในพลาสมา

Recovery assay (n = 5)				
Level	Unextracted Concentration, mean $\pm$ SD ($\mu\text{g/mL}$)	Extracted Concentration, mean $\pm$ SD ($\mu\text{g/mL}$)	Average CV (%)	Average recovery (%)
LLOQ	4.24 $\pm$ 0.13	4.09 $\pm$ 0.18	2.73	96.27
LQC	9.91 $\pm$ 0.05	9.90 $\pm$ 0.14	1.30	99.94
MQC	55.72 $\pm$ 0.13	49.82 $\pm$ 0.22	0.63	89.42
HQC	98.09 $\pm$ 0.25	100.25 $\pm$ 0.62	0.75	102.13

LLOQ = LLOQ concentration sample, LQC = Low concentration QC sample, MQC = Medium concentration QC sample, HQC = High concentration QC sample, SD = standard deviation, CV = coefficient of variation

4.6 การทดสอบความคงตัว (Stability)

ความเข้มข้นของ Levetiracetam ที่ใช้ในการตรวจสอบ Stability ได้แก่ ความเข้มข้นที่ LLOQ LQC MQC และ HQC (5.00 10.00 50.00 และ 100.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ใช้จำนวนตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น 3 ตัวอย่าง แบ่งการศึกษาเป็น Freeze-Thaw assay ที่ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างหลังจากเก็บตัวอย่างยาแบบ freeze-thaw ครบ 3 cycle มีค่า % difference อยู่ระหว่าง 1.15 – 8.74 % Long-term assay ที่ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างหลังจากเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 เดือน มีค่า % difference อยู่ระหว่าง 0.46 – 13.56% และ Short-term assay ที่ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างหลังจากนำตัวอย่างยาที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 3 และ 6 มีค่า % difference อยู่ระหว่าง 0.07 – 3.88 % และค่าความเข้มข้นที่วัดได้จริงแสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 Stability ของวิธีวิเคราะห์ Levetiracetam ในพลาสมา

Level	Freeze-Thaw 3 Cycles (n = 3)			Long-term (n = 3)		Short-term (n = 3)	
	Nominal	Measured	DF	Measured	DF	Measured	DF
	Concentration	Concentration, (%)		Concentration, (%)		Concentration, (%)	
	(µg/mL)	mean ± SD (µg/mL)		mean ± SD (µg/mL)		mean ± SD (µg/mL)	
LLOQ	5.00	5.39 ± 0.13	7.65	5.33 ± 0.05	13.56	5.95 ± 1.14	3.88
LQC	10.00	11.21 ± 0.09	8.74	10.49 ± 0.18	2.25	11.44 ± 0.12	1.47
MQC	50.00	49.84 ± 0.38	1.83	52.84 ± 0.05	1.88	43.99 ± 1.26	0.07
HQC	100.00	103.26 ± 0.47	1.15	100.21 ± 0.73	0.46	102.17 ± 2.14	2.67

LLOQ = LLOQ concentration sample, LQC = Low concentration QC sample, MQC = Medium concentration QC sample, HQC = High concentration QC sample, SD = standard deviation, CV = coefficient of variation, DF = % Difference

ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Levetiracetam และ Nelfinavir ที่ใช้ในการตรวจสอบ stock solution stability คือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้จำนวนตัวอย่าง เท่ากับ 3 ตัวอย่าง มีค่า %difference ของสารมาตรฐาน Levetiracetam และ Nelfinavir เท่ากับ 1.28% และ 0.90% ตามลำดับ และค่า peak area แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 Stability ของสารมาตรฐาน Levetiracetam และ Nelfinavir

Stock solution	Average peak area, (mean ± SD)		DF (%)
	Freshly-prepared	Stock solution storage	
Levetiracetam (1 µg/mL)	27082.3 ± 326.14	26736.7 ± 378.41	1.28
Nelfinavir (1 µg/mL)	86274.1 ± 362.04	85497.5 ± 2690.11	0.90

DF = % Difference

บทที่ 5

สรุปผลการวิเคราะห์และข้อเสนอแนะ

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาระดับยา Levetiracetam ในพลาสมาสามารถสรุปผลการวิเคราะห์ได้ดังนี้ วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้ คือ ใช้ Nelfinavir เป็น internal standard ใช้ 0.1% Formic acid:ACN อัตราส่วน 40:60 เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที วัดโดยใช้ UV-Spectrometer ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตรและเตรียมตัวอย่างพลาสมา ด้วยวิธีตกตะกอนโปรตีน ด้วย ACN ในขั้นตอนการเลือก internal standard ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า Nelfinavir สามารถแยกออกจากพีคของ Levetiracetam ได้ชัดเจน และมี retention time ไม่นานจนเกินไป สอดคล้องกับหลักในการเลือกชนิดของ internal standard ที่จะนำมาใช้ในงานวิเคราะห์โดยใช้ HPLC ซึ่ง internal standard ในงานวิเคราะห์ ควรเป็นสารที่มีคุณสมบัติทางเคมีที่ใกล้เคียงกับสารที่ต้องการจะวิเคราะห์ ควรมีหมู่ฟังก์ชันที่เหมือนหรือคล้ายคลึงกันเพื่อที่จะสามารถชะออกมาจากคอลัมน์ได้ในระบบการวิเคราะห์เดียวกัน แต่อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติทางเคมีและหมู่ฟังก์ชันดังกล่าวก็ไม่ควรที่จะเหมือนกันมากเกินไป เนื่องจากอาจไม่สามารถแยกพีคของสารที่ต้องการวิเคราะห์กับ internal standard ออกจากกันได้

ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Levetiracetam ผู้วิจัยไม่ได้ทำการปรับเปลี่ยนเฟสนิ่งหรือคอลัมน์ที่ใช้ในการ วิเคราะห์ และได้เลือกใช้ C-18 reverse phase column เป็นเฟสนิ่งเพียงอย่างเดียว เนื่องจากการศึกษาของ Hamdan และคณะ ในปี 2017 ที่ศึกษาเปรียบเทียบคอลัมน์ชนิดต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ Levetiracetam แสดงให้เห็นว่าการเลือกใช้ hydrophobic stationary phases หรือเฟสนิ่งที่มีความไม่มีขั้วให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีกว่าการใช้ hydrophilic stationary phases เนื่องจากจะทำให้ได้ retention time ที่เหมาะสมกว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะ Levetiracetam เป็นสารที่มีขั้ว หากใช้เฟสนิ่งที่มีความมีขั้วอาจทำให้ Levetiracetam ถูกกักอยู่ในคอลัมน์นานเกินไป ซึ่งรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ส่วนมากมักใช้ hydrophobic stationary phases หรือ reverse phase column และชนิดของคอลัมน์ที่มีการใช้มากที่สุดในการวิเคราะห์ Levetiracetam ด้วย HPLC คือ C-18 reverse phase column ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ C-18 reverse phase column เป็นเฟสนิ่งในการวิเคราะห์ Levetiracetam

ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Levetiracetam ผู้วิจัยเลือกใช้ UV-Spectrometer เป็น detector ในการวิเคราะห์ Levetiracetam เนื่องจากเป็นเครื่องมือที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการที่มีการเข้าถึงง่ายและมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่า detector ชนิดอื่น เช่น mass spectrometer สำหรับความยาวคลื่นที่ใช้วัด ผู้วิจัยเลือกวัดที่ 210 นาโนเมตร โดยผู้วิจัยได้ทำการสแกนความยาวคลื่นโดยใช้ UV-Spectrometer พบว่า ช่วงความยาวคลื่นที่ Levetiracetam และ Nelfinavir สามารถ ดูดกลืนแสงได้สูงสุด อยู่ที่ 200 – 225 นาโนเมตร และ 200 – 300 นาโนเมตร ตามลำดับ สอดคล้องกับการทบทวนวรรณกรรม โดยพบว่า รายงานการวิจัยก่อนหน้ามีการใช้ความยาวคลื่นที่ใช้วัดอยู่ที่ 205 – 230 นาโนเมตร อีกทั้ง งานวิจัยที่เลือกใช้ Nelfinavir เป็น internal standard ได้มีการใช้ความยาวคลื่นที่ใช้วัดอยู่ที่ 210 นาโนเมตร ดังนั้น ผู้วิจัยจึง

เลือกความยาวคลื่นที่ใช้วัดอยู่ที่ 210 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่อยู่ในช่วงความยาวคลื่นที่ Levetiracetam และ Nelfinavir สามารถดูดกลืนแสงได้ดี

ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพลาสมา ผู้วิจัยเลือกใช้การเตรียมตัวอย่างโดยวิธีตกตะกอนโปรตีน ซึ่งเป็นวิธีการ เตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างที่มีความจำเป็นต้องวิเคราะห์เป็นจำนวนมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย มีประสิทธิภาพและราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับการใช้ solid phase extraction ที่เป็นวิธีการเตรียมตัวอย่างที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าการตกตะกอนโปรตีน แต่มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงและไม่เหมาะสมกับตัวอย่างที่มีจำนวนมากการตกตะกอนโปรตีนในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Levetiracetam ผู้วิจัยเลือกใช้ ACN เป็นตัวตกตะกอนโปรตีน ซึ่งเหมือนกับการศึกษาของ Yeap LL และ Lo YL ที่ใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีตกตะกอนโปรตีนด้วย ACN และวิเคราะห์ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ชนิดเดียวกัน ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Pucci V และคณะ ที่พบว่า การตกตะกอนโปรตีน ด้วย methanol มีประสิทธิภาพมากกว่า ACN เนื่องจากการตกตะกอนด้วย methanol จะให้ %recovery ของยา Levetiracetam ที่สูงกว่าการใช้ ACN แต่การศึกษาดังกล่าว ใช้ C-8 reverse phase column เป็นเฟสนิ่ง ซึ่งแตกต่างจากการวิเคราะห์ของผู้วิจัยที่ใช้ C-18 reverse phase column ทำให้ผลการวิเคราะห์อาจแตกต่างกันได้

ในขั้นตอนการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ผู้วิจัยได้ใช้เกณฑ์การประเมินของประกาศสำนักงาน คณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง คำแนะนำในการจัดทำโครงการร่างการศึกษาชีวสมมูลในมนุษย์ ประกาศ ณ วันที่ 3 สิงหาคม พ.ศ. 2549 เป็นเกณฑ์ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ เนื่องจากในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Levetiracetam เป็นการวิเคราะห์ในพลาสมา ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ในตัวอย่างชีวภาพ จึงอาจมีเกณฑ์การประเมินที่ แตกต่างไปจากการวิเคราะห์ในรูปแบบยาเตรียม โดยพารามิเตอร์ที่ใช้ทำการทดสอบ ได้แก่ ความสัมพันธ์เชิงเส้น การ ทดสอบความจำเพาะเจาะจง ความถูกต้อง ความแม่นยำ recovery of extraction และ การทดสอบความคงตัว ซึ่งทุก พารามิเตอร์ที่ทำการทดสอบนั้นผ่านเกณฑ์การประเมินของประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง คำแนะนำในการจัดทำโครงการร่างการศึกษาชีวสมมูลในมนุษย์ ประกาศ ณ วันที่ 3 สิงหาคม พ.ศ. 2549 แต่ในการทดสอบความคงตัวของ stock solution ผู้วิจัยไม่ได้ทำการทดสอบโดยใช้ %difference ของความเข้มข้น เหมือนกับการ ทดสอบความคงตัวประเภทอื่น แต่ใช้ %difference ของ peak area ในการทดสอบ

ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ Levetiracetam และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี วิเคราะห์ ดังนี้ในงานประจำอาจปรับเพิ่ม flow rate หรือ อาจพิจารณาลด Run time เหลือเพียง 7 – 8 นาทีได้ เพื่อลดเวลาในการวิเคราะห์ ในการเตรียมเฟสเคลื่อนที่ควรใช้สารที่เป็น HPLC grade และเลือกใช้สารที่มีความบริสุทธิ์ 100 % แต่ ด้วยข้อจำกัดของทางห้องปฏิบัติการทำให้ผู้วิจัยใช้ 98% Formic acid Analytical grade ในการเตรียมเฟสเคลื่อนที่ใน การวิเคราะห์ Levetiracetam ซึ่งอาจมีสารอื่นมารบกวนการวิเคราะห์ได้ ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจง หาก เป็นไปได้ให้ทำการทดสอบกับพลาสมาที่มาจากแหล่งที่มาที่แตกต่างกันอย่างน้อย 6 ตัวอย่าง แต่ด้วยข้อจำกัดบางประการทำให้ผู้วิจัยทำการทดสอบกับพลาสมาจากแหล่งตัวอย่างเดียว และในการทดสอบความคงตัวของ stock solution ควรทดสอบโดยใช้ %difference ของความเข้มข้น โดยอาจเจือจาง stock solution ให้ได้เป็นความเข้มข้น

ต่าง ๆ แล้วทำ standard curve ไม่ควรใช้ %difference ของ peak area ในการทดสอบ เพราะอาจทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้

บรรณานุกรม

- Adams ME, Chung AM, Eiland LS. Pharmacotherapy of Epilepsy: Focus on Levetiracetam. Clin Med Insights Ther. 2009 Aug 5;2009(1):935–52.
- Antonilli L, Brusadin V, Filipponi F, Guglielmi R, Nencini P. Development and validation of an analytical method based on high performance thin layer chromatography for the simultaneous determination of lamotrigine, zonisamide and levetiracetam in human plasma. J Pharm Biomed Anal. 2011;56(4):763–770.
- Alsaadi TM, Shatzel A, Marquez AV, Jorgensen J, Farias S. Clinical experience of levetiracetam monotherapy for adults with epilepsy: 1-year follow-up study. Seizure. 2005 Mar;14(2):139–42.
- British Pharmacopoeia. London: Stationery Office; 2015. 1-5 p.
- Brodie MJ, Perucca E, Ryvlin P, Ben-Menachem E, Meencke H-J, Levetiracetam Monotherapy Study Group. Comparison of levetiracetam and controlled-release carbamazepine in newly diagnosed epilepsy. Neurology. 2007 Feb 6;68(6):402–8.
- Can NO, Arli G. Reversed-phase HPLC analysis of levetiracetam in tablets using monolithic and conventional C18 silica columns. J AOAC Int. 2010 Aug;93(4):1077–85.
- Contin M, Mohamed S, Albani F, Riva R, Baruzzi A. Simple and validated HPLC-UV analysis of levetiracetam in deproteinized plasma of patients with epilepsy. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2008 Sep 15;873(1):129–32.
- Devanaboyina N, Satyanarayana T, Rao BG. A novel RP-HPLC method for the analysis of levetiracetam in formulations. Pharma Chem. 2011;3(6):112–117.
- Engelbrecht L, Grobler CJ, Rheeders M. A simple and cost-effective HPLC-UV method for the detection of levetiracetam in plasma/serum of patients with epilepsy. Biomed Chromatogr BMC. 2017 Mar 10;
- Engelbrecht L, Grobler CJ, Rheeders M. A simple and cost-effective HPLC-UV method for the detection of levetiracetam in plasma/serum of patients with epilepsy. Biomed Chromatogr BMC. 2017 Mar 10;
- Farooq MU, Bhatt A, Majid A, Gupta R, Khasnis A, Kassab MY. Levetiracetam for managing neurologic and psychiatric disorders. Am J Health-Syst Pharm AJHP Off J Am Soc Health-Syst Pharm. 2009 Mar 15;66(6):541–61.
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. Epilepsia. 2014 Apr;55(4):475–82.

- Giroux PC, Salas-Prato M, Théorêt Y, Carmant L. Levetiracetam in children with refractory epilepsy: lack of correlation between plasma concentration and efficacy. *Seizure*. 2009 Oct;18(8):559–63.
- Ibrahim FA, El-Yazbi AF, Barary MA, Wagih MM. Sensitive inexpensive HPLC determination of four antiepileptic drugs in human plasma: application to PK studies. *Bioanalysis*. 2016 Nov;8(21):2219– 34.
- Imad I. Hamdan, Mervat Alsous, Amira Taher Masri. Chromatographic Characterization and Method Development for Determination of Levetiracetam in Saliva: Application to Correlation with Plasma Levels. *J Anal Methods Chem*. 2017 Aug;2017.
- Iwasaki T, Toki T, Nonoda Y, Ishii M. The efficacy of levetiracetam for focal seizures and its blood levels in children. *Brain Dev*. 2015 Sep;37(8):773–9.
- Kandikondasaikrishna , New rp-hplc method for the determination of levetiracetam in bulk and prepared tablets, *Asian journal of biochemical and pharmaceutical research* issue 3 (vol. 1), 2011.
- Krasowski MD. Therapeutic drug monitoring of the newer anti-epilepsy medications. *Pharmaceuticals*. 2010;3(6):1909–1935.
- Krumholz A, Wiebe S, Gronseth GS, Gloss DS, Sanchez AM, Kabir AA, et al. Evidence-based guideline: Management of an unprovoked first seizure in adults: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Neurology*. 2015 Apr 21;84(16):1705–13.
- Lancelin F, Franchon E, Kraoul L, Garciau I, Brovedani S, Tabaouti K, et al. Therapeutic drug monitoring of levetiracetam by high-performance liquid chromatography with photodiode array ultraviolet detection: preliminary observations on correlation between plasma concentration and clinical response in patients with refractory epilepsy. *Ther Drug Monit*. 2007 Oct;29(5):576–83.
- Liu X, Carney PR, Bussing R, Segal R, Cottler LB, Winterstein AG. Trends in Antiepileptic Drug Use in Children and Adolescents With Epilepsy. *Pediatr Neurol*. 2017 Sep;74:32–40.
- Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Determination of levetiracetam in human plasma with minimal sample pretreatment. *J Chromatogr B*. 2005;819(1):197–200.
- Meehan AL, Yang X, McAdams BD, Yuan L, Rothman SM. A new mechanism for antiepileptic drug action: vesicular entry may mediate the effects of levetiracetam. *J Neurophysiol*. 2011;106(3):1227–1239.

- Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, editors. Levetiracetam. In: Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 4th ed. Gurnee, USA: Pharmaceutical Press; 2011. p. 1562–3.
- Neels HM, Sierens AC, Naelaerts K, Scharpé SL, Hatfield GM, Lambert WE. Therapeutic drug monitoring of old and newer anti-epileptic drugs. Clin Chem Lab Med. 2004;42(11):1228–55.
- Nguyen V-HV, Baca CB, Chen JJ, Rogers SJ. Epilepsy. In: DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM, editors. Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, 10e [Internet]. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017 [cited 2017 Sep 6]. Available from: accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?aid=1145810444
- Pubchem. Levetiracetam [Internet]. [Cited 2017 Oct 7]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284583>
- Pubchem. gabapentin [Internet]. [Cited 2017 Oct 7]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3446>
- Pubchem. caffeine [Internet]. [Cited 2017 Oct 7]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2519>
- Pubchem. Nelfinavir mesylate [Internet]. [Cited 2017 Oct 7]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64142>
- Pubchem. adenosine [Internet]. [Cited 2017 Oct 7]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60961>
- Pucci V, Bugamelli F, Mandrioli R, Ferranti A, Kenndler E, Raggi MA. High-performance liquid chromatographic determination of Levetiracetam in human plasma: comparison of different sample clean-up procedures. Biomed Chromatogr. 2004;18(1):37–44.
- Raju NA, Rao JV, Prakash KV, Mukkanti K, Srinivasu K. Estimation of levetiracetam in tablet dosage form by RP-HPLC. J Chem. 2008;5(S2):1098–1102.
- Rao AL, Jahnavi VN. A Validated RP-HPLC Method for the Estimation of Levetiracetam in Bulk and Pharmaceutical Formulations [Internet]. Journal of Chemistry. 2010 [cited 2017 Sep 10]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2010/741417/abs/>
- Ravisankar P, Niharika A, Srinivasa Babu P. An improved RP-HPLC method for the quantitative determination and validation of Levetiracetam in bulk and pharmaceutical formulation. Int Res J Pharm. 2015;6(8):537–543.

- Shah JS, Vidyasagar G, Barot H. Stability indicating RP-HPLC method for estimation of levetiracetam in pharmaceutical formulation and application to pharmacokinetic study. *Pharm Sin.* 2012;3(5):576–589.
- Shakirullah, Ali N, Khan A, Nabi M. The Prevalence, Incidence and Etiology of Epilepsy. *Int J Clin Exp Neurol* 2014 Jan 23;2(2):29–39.
- Sheinberg R, Heyman E, Dagan Z, Youngster I, Kohn E, Gandelman-Marton R, et al. Correlation Between Efficacy of Levetiracetam and Serum Levels Among Children With Refractory Epilepsy. *Pediatr Neurol.* 2015 Jun 1;52(6):624–8.
- Steinhoff BJ, Somerville ER, Van Paesschen W, Ryvlin P, Schelstraete I. The SKATETM study: An open-label community-based study of levetiracetam as add-on therapy for adults with uncontrolled partial epilepsy. *Epilepsy Res.* 2007 Aug 1;76(1):6–14.
- Stepanova D, Beran RG. Measurement of levetiracetam drug levels to assist with seizure control and monitoring of drug interactions with other anti-epileptic medications (AEMs). *Seizure.* 2014;23(5):371–376.
- The new ILAE classification - Shinnar - 2010 - *Epilepsia* - Wiley Online Library [Internet]. [Cited 2017 Oct 7]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1167.2010.02542.x/full>
- U.S. Pharmacopoeia-National Formulary [USP 39 NF 34]. Vols. 1–4. Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, Inc; 2015.
- Wright C, Downing J, Mungall D, Khan O, Williams A, Fonkem E, et al. Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics of Levetiracetam. *Front Neurol* [Internet]. 2013 Dec 4;4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3850169/>
- Yeap L-L, Lo Y-L. Rapid and Simultaneous Quantification of Levetiracetam and Its Carboxylic Metabolite in Human Plasma by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Nov 6;9(11). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4223074/>
- กองยุทธศาสตร์ สำนักงานอธิการบดี ฝ่ายบริหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2562. แผนยุทธศาสตร์การบริหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2563 – 2566. โรงพิมพ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 123 หมู่ที่ 16 ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002
- กองยุทธศาสตร์ สำนักงานอธิการบดี ฝ่ายบริหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2566. แผนยุทธศาสตร์การบริหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2566 – 2570 STRATEGIC PLANNING KKU 2024 - 2027 . โรงพิมพ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 123 หมู่ที่ 16 ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

- คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2566. แผนยุทธศาสตร์การบริหาร คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ. 2563 – 2566
- ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง คำแนะนำในการจัดทำโครงการร่างการศึกษาชีวสม
มูลใน มนุษย์ ประกาศ ณ วันที่ 3 สิงหาคม พ.ศ. 2549.
- ญานิคม คัชรินทร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, editors. แนวทางการรักษาโรคลมชักสำหรับแพทย์เวชปฏิบัติ
ทั่วไปและ ทีมสหสาขาวิชาชีพ. ขอนแก่น: กลุ่มวิจัยโรคลมชักแบบบูรณาการ คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น ; 2555. 144 p.
- ลิมปิติ ดวงสมร. HPLC : ทฤษฎี เครื่องมือ และการประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์ยา. เชียงใหม่: คณะเภสัช
ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2545.
- อันวงศ์ กาญจน. แนวทางเวชปฏิบัติโรคลมชัก สำหรับแพทย์ Clinical Practice Guidelines for
Epilepsy. 1st ed. กรุงเทพฯ: บริษัท ธนาเพรส จำกัด; 2559.

ประวัติผู้วิเคราะห์
นางนันทน์ภัส ธิติศักดิ์สกุล

ประวัติส่วนตัว

เกิดวันที่ 16 เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2528 ปัจจุบันอายุ 39 ปี

การศึกษาระดับอุดมศึกษา

วุฒิการศึกษา	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษา
1.3.1 ปริญญาตรีเภสัชศาสตรบัณฑิต (ภ.บ.)	2550	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

ประวัติการปฏิบัติงาน

ปัจจุบันดำรงตำแหน่ง นักวิชาการวิทยาศาสตร์ ระดับปฏิบัติการ ได้รับการแต่งตั้งเมื่อวันที่ 10 ตุลาคม พ.ศ. 2556

ประสบการณ์

1. ปิงบประมาณ 2561 เรื่อง การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ระดับยา Posaconazole ในพลาสมา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ที่ปรึกษาโครงการวิจัย)
2. ปิงบประมาณ 2563 เรื่อง การพัฒนาและทดสอบประเมินวิธีวิเคราะห์ระดับยา Itraconazole ในพลาสมาโดยวิธี HPLC (ที่ปรึกษาโครงการวิจัย)
3. ปิงบประมาณ 2564 เรื่อง การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดมือที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบจากจังหวัดขอนแก่น (ผู้ร่วมโครงการ)

รวมเวลารับราชการ 10 ปี 4 เดือน