

วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงอย่างง่าย

สำหรับการวิเคราะห์เซฟาโซลินในกระดูก

A Simple High Performance Liquid Chromatography for the Analysis of Cefazolin in Bone

วราวุธ ตียพงศ์พัฒนา* และกฤติกาญจน์ สุวรรณสรโรช

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ชยานิน อ่างทอง

ภาควิชาศัลยศาสตร์ออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Warawut Tiyaongpattana* and Kittigan Suwannasaroj

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Chayanin Angthong

Department of Orthopaedics, Faculty of Medicine, Thammasat University

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่มีการตรวจวัดแบบโพโตไดโอดอาร์เรย์ได้ถูกพัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณเซฟาโซลินในกระดูกมนุษย์ โดยในการแยกจะใช้คอลัมน์ชนิด C18 ร่วมกับการใช้เฟสเคลื่อนที่ผสมระหว่างอะซิโตนไตริลและกรดฟอร์มิกเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร สัดส่วน 20:80 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม การประเมินความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่าวิธีนี้มีความไว ความเที่ยง และความแม่นยำ โดยกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของเซฟาโซลินและกรดซาลิไซลิก (สารมาตรฐานภายใน) มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของเซฟาโซลิน 0.05-70 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค่าสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรง มากกว่า 0.9995) ขีดจำกัดของการตรวจวัดและการหาปริมาณ มีค่าเท่ากับ 0.03 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ วิธีนี้มีความเที่ยงเป็นที่น่าพอใจ ทั้งการทำซ้ำแบบภายในวันเดียวกันและแบบระหว่างวัน โดยมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ร้อยละ 1.82 และ 3.11 ($n = 10$) ตามลำดับ การประเมินความแม่นยำของวิธีอาศัยค่าร้อยละการกลับคืนของปริมาณสารที่เติมเทียบกับปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 97-101 วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ ได้นำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณเซฟาโซลินในยาเซฟาโซลินสำหรับฉีดในกระดูกแข็งและกระดูกต้นขาของมนุษย์

*ผู้รับผิดชอบบทความ : twarawut@gmail.com

คำสำคัญ : เซฟาโซลิน; โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง; กระดุก; กระดุกแข็ง; กระดุกต้นขา; ยาเซฟาโซลิน สำหรับฉีด

Abstract

A simple reverse phase – high performance liquid chromatography-photodiode array detection (RP-HPLC-DAD) method for quantitative analysis of cefazolin in human bone was developed. For component separation, the method utilized a C18 column with isocratic elution of an aqueous mobile phase of acetonitrile and 0.1 % (v/v) formic acid (80 : 20) at a flow rate of 1 mL/min. Under the optimal condition, validation of the method demonstrated a good sensitivity, precision and accuracy. The calibration curve was linear for a plot between the peak area ratio of cefazolin and salicylic acid (internal standard), ranging from 0.05-70 mg/L ($R^2 > 0.9995$). The limits of detection and quantitation were 0.03 and 0.05 mg/L, respectively. The developed method gave satisfactory precision in terms of intraday and interday with RSD of 1.82 and 3.11 (n = 10), respectively. The accuracy of the method was reported as the recovery of nominal spiked amounts versus measured component concentrations. The recoveries were in the range of 97-101 %. The developed method has been applied to determine cefazolin content in cefazolin for injection and the human bone such as tibia and femur.

Keywords: cefazolin; high performance liquid chromatography; bone; tibia; femur; cefazolin for injection

1. บทนำ

ปัญหาการติดเชื้อหลังการผ่าตัดนับเป็นปัญหาที่มีความสำคัญต่อสุขภาพของผู้ป่วยเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่า ซึ่งการติดเชื้อหลังการผ่าตัดจะส่งผลเสียในระยะยาว เช่น อายุการใช้งานของข้อเข่าเทียมสั้นลง ซึ่งอาจต้องผ่าตัดซ้ำอีกหลายครั้งเพื่อกำจัดการติดเชื้อ นอกจากนี้ ผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่ามักเป็นกลุ่มผู้สูงอายุ ซึ่งมีโรคประจำตัว เช่น โรคเบาหวาน จึงมีความเสี่ยงสูงกว่าปกติที่จะมีการติดเชื้อหลังการผ่าตัด การป้องกันการติดเชื้อหลังการผ่าตัดจึงมีความสำคัญมากในผู้ป่วยกลุ่มนี้ จากการศึกษาเกี่ยวกับการป้องกันการติดเชื้อหลังผ่าตัดนั้น [1-3] เป็นที่

ยอมรับกันว่าการให้ยาปฏิชีวนะก่อนการผ่าตัด (antibiotic prophylaxis) เป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่สามารถลดโอกาสการติดเชื้อหลังการผ่าตัดได้อย่างมีนัยสำคัญ

เซฟาโซลิน (cefazolin) เป็นสารปฏิชีวนะที่ทำหน้าที่ยับยั้ง ฆ่า และ/หรือ ต้านทานจุลชีพ ซึ่งมักเป็นแบคทีเรีย แต่ยังสามารถครอบคลุมถึงไวรัสบางชนิดและราบางชนิดได้อีกด้วย [4-6] จึงนิยมใช้เป็นยาฆ่าเชื้อสำหรับการผ่าตัด โดยตามข้อแนะนำในปัจจุบัน [5-6] ในการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่า ควรให้เซฟาโซลิน 1-2 กรัม โดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำบริเวณแขนก่อนลงมือผ่าตัดไม่เกิน 1 ชั่วโมง และให้ซ้ำทุก 2-5 ชั่วโมงระหว่างการผ่าตัด และควรหยุดให้ยาภายใน 24 ชั่วโมง

หลังการผ่าตัด อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันการให้ยาปฏิชีวนะโดยส่วนใหญ่จะอาศัยความชำนาญและวิจารณญาณของแพทย์ผู้ผ่าตัด เนื่องจากยังไม่มีงานวิจัยรองรับที่ชัดเจนถึงขนาดของยาปฏิชีวนะที่ต้องใช้ รวมทั้งยังไม่มีงานวิจัยอย่างชัดเจนที่ระบุถึงระดับยาปฏิชีวนะในกระดูกบริเวณที่ผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม

โดยปกติ การที่ยาปฏิชีวนะจะสามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ จะต้องมีความเข้มข้นที่เนื้อเยื่อนั้นเกินค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ (minimal inhibitory concentration, MIC) แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาถึงค่าความเข้มข้นของยาเซฟาโซลินในตำแหน่งกระดูกแข้ง (tibia) กระดูกต้นขา (femur) และในเนื้อเยื่อข้อเข่า (synovial tissue) เลย อีกทั้งยังไม่เคยมีการศึกษาใดที่สามารถยืนยันได้ว่าเซฟาโซลินในกระดูกและเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าว จะสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ได้จริง ดังนั้นข้อสงสัยนี้จึงควรมีการศึกษาวิจัยเป็นอย่างยิ่ง เพื่อได้ทราบถึงปริมาณยาต่ำสุดที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการติดเชื้อขณะผ่าตัด ซึ่งอุปสรรคที่สำคัญ คือ การขาดวิธีวิเคราะห์ที่สามารถติดตามปริมาณเซฟาโซลินในกระดูกมนุษย์ ซึ่งทำให้การศึกษาวิจัยทางการแพทย์นี้ยังขาดความสมบูรณ์และชัดเจน

งานวิจัยที่ผ่านมา ได้มีการพัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) [7-14] วิธีแคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (capillary electrophoresis, CE) [15] วิธีไหล (flow injection analysis, FIA) [16] และวิธีจุลชีววิทยา (microbiological method) [17, 18] เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซฟาโซลินในตัวอย่างประเภทต่างๆ โดยมีรายงานวิจัยเพียงชิ้นเดียวที่เกี่ยวข้องกับการวัดปริมาณเซฟาโซลินในกระดูกมนุษย์ [7] อย่างไรก็ตาม การวิจัยยังขาดความสมบูรณ์ของการรายงานสภาวะการทดลองและการประเมินความใช้ได้

ของวิธี (method validation) นอกจากนี้ ยังมีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดเซฟาโซลินในตัวอย่างเนื้อเยื่อ [17] พลาสมา [8] ซีรัม [9-10] ปัสสาวะ [11], รวมไปถึงตัวอย่างอาหาร [12-14, 18] อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างกระดูกนั้นมีลักษณะเป็นของแข็ง และมีองค์ประกอบอื่น ๆ (matrix) ที่แตกต่างจากตัวอย่างข้างต้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดและวิธีการเตรียมตัวอย่างให้สะอาดสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างกระดูกโดยเฉพาะ

เนื่องจากเซฟาโซลินเป็นยาที่ละลายน้ำได้ดี และสามารถดูดซึมเข้าสู่กระดูกและข้อออกทางปัสสาวะ เป็นยาที่มีความเสถียรสูงและออกฤทธิ์ในรูปเดิมเหมือนสารตั้งต้น [4] ดังนั้นในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อติดตามปริมาณเซฟาโซลินในกระดูกส่วนต่าง ๆ ทั้งกระดูกแข้งและกระดูกต้นขา ซึ่งน่าจะจะมีเมทริกซ์ เช่น เลือด เนื้อเยื่อ ไขมัน ฯลฯ ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง การวิจัยนี้จึงพัฒนาวิธีวิเคราะห์ใหม่ที่มีความสามารถในการแยกสูง โดยอาศัยเทคนิคเรversed-phaseโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง เนื่องจากเทคนิคนี้ใช้น้ำเป็นองค์ประกอบหลักในเฟสเคลื่อนที่ ทำให้เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและมีค่าใช้จ่ายที่ต่ำ อีกทั้งเทคนิคดังกล่าว เป็นเทคนิคที่ได้รับการยอมรับกันอย่างกว้างขวางถึงความถูกต้องและแม่นยำที่สูง โดยการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นพัฒนาวิธีสำหรับการหาปริมาณเซฟาโซลินในกระดูกแข้งและกระดูกต้นขา เพื่อจะได้นำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ ไปศึกษาต่อยอดถึงระดับปริมาณยาต่ำสุดที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อเพื่อป้องกันการติดเชื้อขณะผ่าตัด รวมถึงสามารถนำไปใช้เพื่อศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาที่กระดูกได้อีกด้วย

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สารเคมี

เซฟาโซลิน (Cefazolin sodium, DMSC

Reference standard, ประเทศไทย) กรดซาลิไซลิก (สารมาตรฐานภายใน) กรดฟอร์มิก และสารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นเกรดสำหรับวิเคราะห์ (Analytical grade) และตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เมทานอล อะซิโตน ไตรคลอโรเอทิล เป็นเกรดสำหรับโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC grade, MERCK) น้ำที่ใช้ตลอดการทดลองเป็นเกรด ASTM Type I

2.2 เครื่องมือ

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง รุ่น Nexera LC-30A ยี่ห้อ Shimadzu ที่มีเครื่องฉีดสารตัวอย่างอัตโนมัติ รุ่น SIL-30AC ปัมพ์รุ่น LC-30AD และเครื่องตรวจวัดรุ่น SPD-M20A คอลัมน์ชนิด Eclipse XDB-C18 (Agilent) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 มิลลิเมตร ยาว 150 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร โดยควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 40 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมระหว่างอะซิโตน ไตรคลอโรเอทิล และกรดฟอร์มิก เข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร ที่สัดส่วน 20:80 โดยมีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดเซฟาลินและกรดซาลิไซลิก (สารมาตรฐานภายใน) ที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร

2.3 ตัวอย่างยาเซฟาลินสำหรับฉีดและตัวอย่างกระดูก

ตัวอย่างยาเซฟาลินสำหรับฉีด และตัวอย่างกระดูกแข็งและกระดูกต้นขาจากการผ่าตัดข้อเข่า ซึ่งได้รับยาเซฟาลินปริมาณ 1 หรือ 2 กรัม โดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำบริเวณแขน จากนั้นเก็บตัวอย่างกระดูกหลังการให้ยาประมาณ 20-45 นาที จากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

2.4 วิธีการทดลอง

นำตัวอย่างกระดูกแข็งและกระดูกต้นขาขนาดประมาณ 2.5×2.5 มิลลิเมตร มาบดให้ละเอียด

จากนั้นนำตัวอย่างกระดูกหนัก 2 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร เติมน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline pH 7.4) ปริมาตร 4.80 มิลลิลิตร และกรดซาลิไซลิกเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปสกัดด้วยเครื่องเขย่า (ยี่ห้อ GFL รุ่น 3006) ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยเยื่อเลือกผ่านชนิดไนลอนที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วบรรจุลงในขวดตัวอย่างเพื่อฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงต่อไป

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การสกัดเซฟาลินจากกระดูก

3.1.1 วิธีการสกัด

การศึกษาวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการสกัดยาเซฟาลินจากกระดูกแข็งและกระดูกต้นขามนุษย์ ($n = 6$) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 โดยเปรียบเทียบวิธีการเขย่า (shaker) กับวิธีการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic bath, ยี่ห้อ Bandelin Sonorex รุ่น RK156) โดยอาศัยค่าร้อยละการกลับคืน (recovery) ผลการทดลองพบว่า การสกัดโดยการเขย่าให้ค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 90-97 ซึ่งสูงกว่าการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงที่มีค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 87-94 โดยเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติด้วยวิธี paired t -test พบว่าวิธีทั้งสองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 % ดังนั้นการวิจัยนี้จึงเลือกวิธีการเขย่าสำหรับการสกัดเซฟาลินจากกระดูก

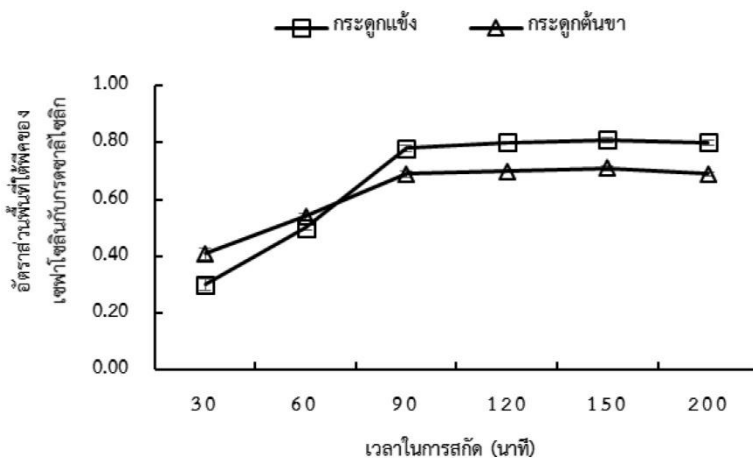
3.1.2 เวลาที่ใช้การสกัด

การศึกษาเพื่อหาเวลาที่ใช้ในการสกัดเซฟาลินจากกระดูกมนุษย์ด้วยเครื่องเขย่า คือ ตั้งแต่

30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที จะได้ผลการวิเคราะห์ดังรูปที่ 1

การทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มเวลาที่ใช้ในการสกัดจะได้ปริมาณเซฟาโซลินเพิ่มมากขึ้น จนกระทั่ง

ถึงเวลาที่ 90 นาที ปริมาณเซฟาโซลินจะเริ่มคงที่ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงเลือกเวลา 120 นาที ในการสกัดเซฟาโซลินจากกระดูกแข็งและกระดูกต้นขา



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการสกัด (นาที) กับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของเซฟาโซลินกับกรดซาลิไซลิก

3.1.3 จำนวนครั้งในการสกัด (การสกัดซ้ำ)

เพื่อให้ได้ปริมาณยาที่สกัดได้มากที่สุด และประสิทธิภาพการสกัดที่ดีที่สุด การวิจัยนี้ได้ศึกษาจำนวนการสกัดซ้ำ ตั้งแต่ 1-4 ครั้ง ด้วยการเขย่านาน 120 นาที พบว่าการสกัด 1, 2, 3 และ 4 ครั้ง ได้ร้อยละของปริมาณเซฟาโซลินเท่ากับ 99.50, 99.80, 99.91, 100 (เทียบกับปริมาณทั้งหมดที่สกัดได้ทั้ง 4 ครั้ง) ตามลำดับ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงเลือกการสกัดเพียงครั้งเดียว เนื่องจากได้ปริมาณเซฟาโซลินที่มากกว่า 99% และยังใช้เวลาในการสกัดสั้นที่สุด ซึ่งจะทำให้ระยะเวลาทั้งหมดในการวิเคราะห์ไม่ยาวนานเกินไป

3.2 สถานะที่เหมาะสมของวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

เนื่องจากเซฟาโซลินเป็นสารที่ละลายได้ดีในน้ำ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจใช้เทคนิค RP-HPLC เพราะ

สามารถใช้น้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ได้ ทำให้ลดค่าใช้จ่ายโดยการทดลองจะใช้คอลัมน์ชนิด C18 คือ Agilent Eclipse XDB-C18 (4.6 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร x 5 ไมโครเมตร) ซึ่งสามารถแยกสารที่สนใจออกจากเมทริกซ์ได้

3.2.1 ความยาวคลื่น (wavelength)

เนื่องจากในการวิจัยนี้ใช้เครื่องตรวจวัดแบบโฟโตไดโอดอาร์เรย์ (photodiode array detector) เพราะฉะนั้นจึงสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารได้ทุกความยาวคลื่นพร้อมกัน และสามารถตรวจดูสเปกตรัมของสารเพื่อยืนยันความถูกต้องได้ ผลการทดลองพบว่าเซฟาโซลินและกรดซาลิไซลิกมีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 270 และ 302 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งจะใช้ความยาวคลื่นนี้ในการตรวจวัดเพื่อการวิเคราะห์เชิงปริมาณ และจะใช้ช่วง

ความยาวคลื่นตั้งแต่ 200 ถึง 360 นาโนเมตร สำหรับ การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ เพื่อยืนยันชนิดของสารต่อไป

3.2.2 เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

การวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาชนิดของเฟสเคลื่อนที่ที่จะทำให้เกิดการแยกดีและรวดเร็วที่สุด โดย ศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล และอะซิโตน ไตรเอทิล แอมโมเนียมเพอร์ฟลูออโรบอเรต (TAPB) พบว่าการใช้สารละลายผสมระหว่างอะซิโตน ไตรเอทิล แอมโมเนียมเพอร์ฟลูออโรบอเรต 0.1 โดยปริมาตร เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะให้ประสิทธิภาพการแยกและให้รูปร่างพีคของเซฟาโซลินกับกรดซาลิไซลิกที่ดีที่สุด จากนั้นได้ศึกษาหาสัดส่วนของเฟสเคลื่อนที่ระหว่างอะซิโตน ไตรเอทิล แอมโมเนียมเพอร์ฟลูออโรบอเรต 0.1 โดยปริมาตร ตั้งแต่ 5:95 ถึง 40:60 ผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของอะซิโตน ไตรเอทิล แอมโมเนียมเพอร์ฟลูออโรบอเรต จะทำให้พีคของเซฟาโซลิน และกรดซาลิไซลิกเคลื่อนที่ออกมาเร็วขึ้น (t_R ลดลง) โดยสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุด คือ อะซิโตน ไตรเอทิล แอมโมเนียมเพอร์ฟลูออโรบอเรต 20:80 ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งเซฟาโซลิน จะสามารถแยกออกจากกรดซาลิไซลิกได้ดี รวมถึงสามารถแยกออกจากพีคของเมทริกซ์ในกระดุกแข็ง และกระดุกต้นขาได้ดี และสภาวะนี้ ยังให้รูปร่างพีคที่ดี และมีเวลาในการวิเคราะห์ที่สั้นประมาณ 8 นาที (รวมเวลาที่รอให้เมทริกซ์ต่าง ๆ เคลื่อนที่ออกมาจนหมด)

3.2.3 ปริมาตรการฉีด (injection volume)

การทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาตรการฉีดให้มากขึ้น พื้นที่ใต้พีคของเซฟาโซลินจะเพิ่มขึ้นด้วย โดยมีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง การวิจัยนี้จึงเลือก ปริมาตรการฉีดสูงสุดที่ 50 ไมโครลิตร เนื่องจากวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ จะใช้ติดตามปริมาณเซฟาโซลินในกระดุก ส่วนต่าง ๆ ที่ต้องอาศัยการสกัดออกมา ซึ่งสารละลายที่ได้จากการสกัดจากกระดุกมนุษย์บางตัวอย่างอาจมี ปริมาณเซฟาโซลินค่อนข้างต่ำ เพื่อให้ได้สภาพไวสูงสุด

จึงเลือกใช้ปริมาตรการฉีดเท่ากับ 50 ไมโครลิตร โดย ปริมาตรการฉีดที่มากกว่านี้ พบว่ารูปร่างพีคที่ได้เริ่มมี ลักษณะไม่สมมาตรและเริ่มจะกว้าง (broadening peak)

3.3 การประเมินความใช้ได้ของวิธี (method validation)

3.3.1. ช่วงความเป็นเส้นตรง (range)

การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของวิธีที่พัฒนาขึ้น ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.01 ถึง 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซฟาโซลินกับอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของเซฟาโซลินกับกรดซาลิไซลิก (สารมาตรฐานภายใน) มีความเป็นเส้นตรงตั้งแต่ 0.05 ถึง 70 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าสัมประสิทธิ์ความเป็นเส้นตรง (R^2) เท่ากับ 0.9995 ซึ่งถือว่ามีความเป็นเส้นตรงสูงและมีช่วงความเข้มข้นที่กว้าง สามารถนำไปใช้หาปริมาณเซฟาโซลินในกระดุก

3.3.2 ขีดจำกัดการตรวจวัดและการหาปริมาณ [limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ)]

ขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดของการหาปริมาณ คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเซฟาโซลินที่มีความสูงของพีคเป็น 3 และ 10 เท่าของสัญญาณของ noise ตามลำดับ โดยผลการทดลองพบว่า ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดและขีดจำกัดของการหาปริมาณของวิธีนี้ เท่ากับ 0.03 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีสภาพไวเพียงพอที่จะใช้ติดตามปริมาณเซฟาโซลินในกระดุกได้

3.3.3 ความเที่ยง (precision)

การวิจัยนี้มีการใช้สารมาตรฐานภายใน เพื่อช่วยเพิ่มความเที่ยงในการวิเคราะห์ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ เป็นวิธีที่มีความเที่ยงสูงทั้ง ในส่วนของเวลาในการเคลื่อนที่ของเซฟาโซลินเทียบกับเวลาในการเคลื่อนที่ของกรดซาลิไซลิก (relative

retention time) และอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของเซฟาโซลินกับกรดซาลิไซลิก (peak area ratio) ในตัวอย่างกระดูกแข็งและกระดูกต้นขา โดยมีค่าส่วน

เบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ได้น้อยกว่าร้อยละ 4 (ตารางที่ 1) ทั้งในการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intraday) และการวิเคราะห์ระหว่างวัน (interday)

ตารางที่ 1 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์

กระดูก	พารามิเตอร์	ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD, n = 10)	
		วันเดียวกัน (intraday)	ระหว่างวัน (interday)
กระดูกแข็ง (tibia)	เวลาในการเคลื่อนที่	0.05	0.06
	อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค	0.91	3.11
กระดูกต้นขา (femur)	เวลาในการเคลื่อนที่	0.02	0.07
	อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค	1.82	2.56

ตารางที่ 2 ค่าร้อยละการกลับคืนในยาสำหรับฉีดและในกระดูกมนุษย์

ตัวอย่าง	ร้อยละการกลับคืน (% recovery) (mean $\pm$ SD; n = 3)
ยาสำหรับฉีด Lot. 1	100.85 $\pm$ 0.19
ยาสำหรับฉีด Lot. 2	99.11 $\pm$ 0.25
ยาสำหรับฉีด Lot. 3	99.92 $\pm$ 0.02
กระดูกแข็ง (Tibia) A	99.94 $\pm$ 0.07
กระดูกแข็ง (Tibia) B	97.88 $\pm$ 0.77
กระดูกแข็ง (Tibia) C	98.94 $\pm$ 0.23
กระดูกต้นขา (Femur) A	99.85 $\pm$ 0.39
กระดูกต้นขา (Femur) B	97.11 $\pm$ 0.26
กระดูกต้นขา (Femur) C	100.12 $\pm$ 0.90

3.3.4 ความแม่นยำ (accuracy)

การแสดงความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์จะใช้ค่าร้อยละการกลับคืน (recovery) เพื่อประเมินความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้น การศึกษาค่าร้อยละการกลับคืนเป็นการเติมสารละลายมาตรฐานเซฟาโซลินที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ไปในตัวอย่างกระดูก

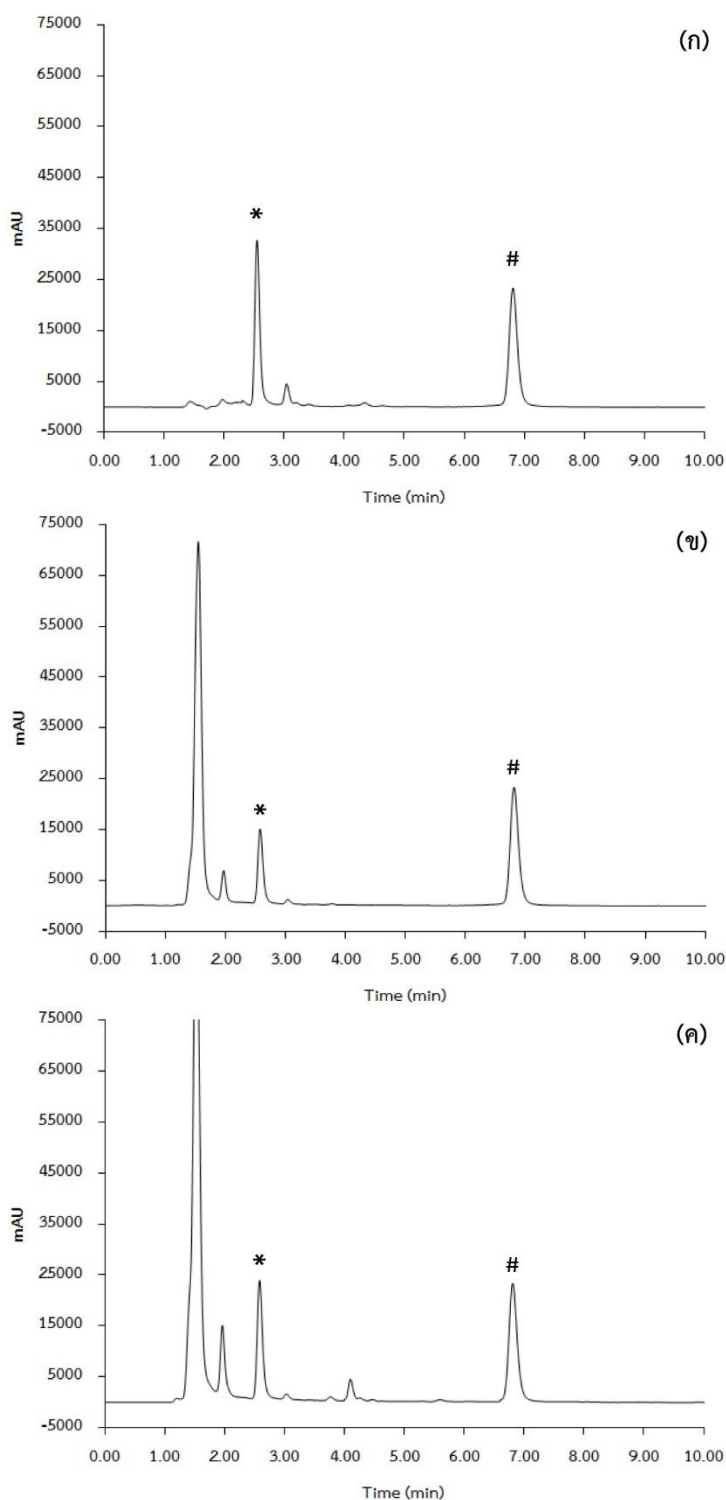
แข็งและกระดูกต้นขามนุษย์ รวมถึงตัวอย่างยาเซฟาโซลินสำหรับฉีดที่ทราบปริมาณของเซฟาโซลินแล้ว จากนั้นวิเคราะห์กลับเพื่อหาความแม่นยำของวิธี

ผลการทดลองทั้งหมดพบว่าค่าร้อยละการกลับคืนในตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด คือ ยาสำหรับฉีดกระดูกหน้าแข้ง และกระดูกต้นขา อยู่ในช่วง 97 ถึง 100 % (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำสูงมาก ไม่ถูกรบกวนจากเมทริกซ์ในตัวอย่าง และสามารถนำไปวิเคราะห์ตัวอย่างได้ดี

3.4 การประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริง

การทดลองที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์สูงจึงได้นำไปประยุกต์ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง ซึ่งได้รับจากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ เพื่อติดตามระดับยาที่ได้รับที่บริเวณกระดูกเป้าหมาย เพื่อหาความสัมพันธ์ของระดับความเข้มข้นและความสามารถในการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อของผู้ป่วยผ่าตัดกระดูกหัวเข่า โดยจะนำข้อมูลไปพิจารณาถึงปริมาณยาที่เหมาะสมที่ผู้ป่วยควรได้รับต่อไป หรือไปใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชศาสตร์ของยาต่อไป [19]

การศึกษารั้งนี้ มีตัวอย่างทั้งยาที่ใช้สำหรับ



รูปที่ 1 โครมาโทแกรมของตัวอย่าง (ก) ยาสำหรับฉีด (ข) กระดูกแข็ง และ (ค) กระดูกต้นขา โดย [*] คือ เซฟา-โซลิน และ [#] คือ กรดซาลิไซลิก

ฉีด จำนวน 7 ตัวอย่าง (จำนวน 3 วันผลิต) กระดูกแข้ง (tibia) จำนวน 20 ตัวอย่าง และกระดูกต้นขา (femur) จำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่งไม่ทราบข้อมูลการรักษาหรือปริมาณการให้ยา (blind test) ผลการทดลองพบว่า การวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ของยาเซฟาโซลินสำหรับ ฉีด ทั้ง 7 ตัวอย่าง พบว่าอยู่ในช่วง 98.02 ถึง 100.35 % ซึ่งผ่านมาตรฐานความบริสุทธิ์ตามข้อกำหนดของ British Pharmacopoeia (BP) และ United State Pharmacopoeia (USP)

สำหรับตัวอย่างกระดูกแข้ง จำนวน 20 ตัวอย่าง และกระดูกหน้าขา จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณเซฟาโซลินในช่วงความเข้มข้น 7.71 ถึง 78.66 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยตัวอย่างโครมาโทแกรมของตัวอย่างแต่ละประเภท แสดงดังรูปที่ 1ก - 1ค ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพีคของเซฟาโซลินและกรดซาลิไซลิกมีรูปร่างพีคที่ดีและแยกออกจากพีคอื่น ๆ ในตัวอย่างได้เป็นอย่างดี

4. สรุป

การวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์เซฟาโซลิน ในกระดูกแข้งและกระดูกต้นขา ซึ่งมีการพัฒนาทั้ง วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อสกัดเซฟาโซลินจากกระดูก และการตรวจวัดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูงที่มีการตรวจวัดแบบโพโตไดโอดอาร์เรย์ วิธี ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่มีความแม่นยำและความเที่ยงสูง อีกทั้งยังง่าย สะดวก และรวดเร็วอีกด้วย การวิเคราะห์ อาศัยเทคนิครีเวสเฟส-โครมาโทกราฟีของเหลว สมรรถนะสูง ซึ่งใช้น้ำเป็นองค์ประกอบหลักในเฟส เคลื่อนที่ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายและเป็นมิตรกับ สิ่งแวดล้อม และเมื่อตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัด ชนิดโพโตไดโอดอาร์เรย์ ซึ่งนอกจากจะวัดค่าการดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่นที่ต้องการแล้ว ยังให้ข้อมูล สเปกตรัมของสารอีกด้วย ทำให้เพิ่มความน่าเชื่อถือ

ของวิธีวิเคราะห์ยิ่งขึ้น นอกจากนี้วิธีนี้ยังมีการใช้สาร มาตรฐานภายในร่วมด้วย ทำให้ช่วยเพิ่มความแม่นยำและ ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถนำไปใช้หาปริมาณเซฟาโซลินในกระดูกแข้ง และกระดูกต้นขา รวมถึงการตรวจสอบความบริสุทธิ์ ของยาเซฟาโซลินที่จะให้กับผู้ป่วยได้อีกด้วย วิธีนี้จะ สามารถใช้เป็นเครื่องมือเพื่อการศึกษาขนาดของยาที่ เหมาะสมที่จะให้ผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดข้อเข่าและ การศึกษาด้านเภสัชจลนศาสตร์ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี งบประมาณ 2558 สัญญาเลขที่ 006/2558 และทุน วิจัยบางส่วนจากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Holtom, P., 2006, Antibiotic prophylaxis: Current recommendation, J. Am. Acad. Orthop. Surg. 14: S98-S100.
- [2] Ridgeway, S., Wilson, J., Charlet, A., Kafatos, G., Pearson, A. and Coello, R., 2005, Infection of the surgical site after arthroplasty of the hip, J. Bone Joint Surg. Br. 87: 844-850.
- [3] Fletcher, N., Sofianos, D., Berkes, M.B. and Obremskey, W.T., 2007, Prevention of perioperative infection, J. Bone Joint Surg. Am. 89: 1605-1618.
- [4] อภัย ราษฎร์วิจิตร, เซฟาโซลิน หรือเซฟาโซลิน (Cefazolin or Cefazoline or Cephazolin), แหล่งที่มา: <http://haamor.com/th>, 1 เมษายน

- 2559.
- [5] Prokuski, L., 2008, Prophylactic antibiotic in orthopedic surgery, *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 16: 283-293.
- [6] American Academy of Orthopedic Surgeons Advisory Statement: Recommendations for the use of intravenous antibiotic prophylaxis in primary total joint arthroplasty, Available Source: <http://www.aaos.org/about/papers/advismt/1027.asp>, February 27, 2016.
- [7] Chang, Y., Shih, H.N., Chen, D.W., Lee M.S., Ueng, S.W.N. and Hsieh P.H., 2010, The concentration of antibiotic fresh-frozen bone graft, *J. Bone Joint Surg. Br.* 92B 10: 1471-1474.
- [8] Al-Rawithi, S., Hussein, R., Raines, D.A., Al-Showaier, I. and Kurdi, W., 2000, Sensitive assay for the determination of cefazolin or ceftriaxone in plasma utilizing LC, *J. Pharma. Biomed. Anal.* 22: 281-286.
- [9] Ohmori, T., Suzuk, A., Niwa, T.I., Ushikoshi, H.I., Shirai, K., Yoshida, S., Ogura, S. and Itoh Y., 2011, Simultaneous determination of eight β -lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 879: 1038-1042.
- [10] Kunicki, P.K. and Waś, J., 2012, Simple HPLC method for cefazolin determination in human serum: Validation and stability testing, *J. Chromatogr. B.* 911: 133-139.
- [11] Baranowska, I., Markowski, P. and Baranowski, J., 2006, Simultaneous determination of 11 drugs belonging to four different groups in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography method, *Anal. Chim. Acta.* 570: 46-58.
- [12] Sørensen, L.K. and Snor, L.K., 2000, Determination of cephalosporins in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 882: 145-151.
- [13] Kantiani, L., Farré, M., Freixedas, J.M.G.I. and Barceló, D., 2010, Development and validation of a pressurised liquid extraction liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for β -lactams and sulfonamides in animal feed, *J. Chromatogr. A.* 1217: 4247-4254.
- [14] Zhang, Y., Liu, H., Zhang, X., Lei, H., Bai, L. and Yang, G., 2013, On-line solid phase extraction using organic: Inorganic hybrid monolithic columns for the determination of trace β -lactam antibiotics in milk and water samples, *Talanta* 104: 17-21.
- [15] Lin, C.E., Chen, H.W., Lin, E.C., Lin, K.S. and Huang, H.C., 2000, Optimization of separation and migration behavior of cephalosporins in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 879: 197-210.
- [16] Thongpoon, C., Liawruangrath, B., Liawruangrath, S., Wheatley, R.A. and Townshend, A., 2005, Flow injection chemiluminescence determination of

- cephalosporins in pharmaceutical preparations using tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II)-potassium permanganate system, Anal. Chim. Acta. 553: 123-133.
- [17] Dekel, A., Elan, I., Gibor, Y. and Goldman, J.A., 1980, Pharmacokinetics and endometrial and tubal tissue penetration of cefalotin and cefazolin, J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. 10: 303-307.
- [18] Gilbertson, T.J., Mejeur, R.L., Yein, F.S. and Jaglan, P.S., 1995, Modified microbiological method for the screening of antibiotics in milk, J. Dairy Sci. 78: 1032-1038.
- [19] Angthong, C., Krajubngern, P., Tiyaongpattana, W., Pongcharoen, B., Pinsornsak, P., Tammachote, N., and Kittisupaluck, W., 2015, Intraosseous concentration and inhibitory effect of different intravenous cefazolin doses used in preoperative prophylaxis of total knee arthroplasty, J. Orthopaed. Traumatol. 16: 331-334.