

นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจวัดปริมาณโคโอะซีแอมในซีรัมด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection*

เกศินี ศรีสุภกรกุล**, ภัทรวดี พงษ์ระวีวงศ์**, วีระวรรณ เรืองยุทธิกการณ***†

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: ทดสอบวิธี High performance liquid chromatography photodiode array detection (HPLC-DAD) ในการวิเคราะห์ระดับโคโอะซีแอมในซีรัม เพื่อนำมาใช้วัดระดับโคโอะซีแอมในผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจากการใช้ยาเกินขนาด

ตัวอย่างทดสอบ: ซีรัมผู้ป่วยจำนวน 8 ราย และผู้เสียชีวิตจำนวน 3 ราย ที่มีประวัติการใช้โคโอะซีแอมเกินขนาด เก็บที่อุณหภูมิ -10°C . ก่อนการวิเคราะห์

วิธีการ: ใช้ Mobile phase เป็น Acetonitrile ค่อน้ำในอัตราส่วน 50 ต่อ 50 ผ่านคอลัมน์ C_{18} ด้วยอัตราการไหล 1 mL/นาที เป็นเวลานาน 10 นาที ที่ความยาวคลื่น 229 nm และตกตะกอนโปรตีนในซีรัมด้วยเมทานอล ก่อนการวิเคราะห์ด้วย HPLC-DAD

ผลการทดสอบ: ความเข้มข้นต่ำสุดที่วัดได้ = $0.20 \mu\text{g/mL}$ ได้ % recovery ของโคโอะซีแอม = 100.90 และ 98.87% ที่ความเข้มข้น 5 และ $40 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ และสามารถตรวจวัดระดับโคโอะซีแอมในซีรัมของผู้ป่วยได้เพียง 3 ราย ผู้เสียชีวิตจำนวน 1 ราย โดยค่าที่วัดได้อยู่ระหว่าง $0.23\text{--}1.66 \mu\text{g/mL}$

สรุป: HPLC-DAD มีความไวในการวัดระดับโคโอะซีแอมต่ำกว่าที่คาดหมายไว้ การปรับปรุงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง การปรับ Mobile phase และการใช้ซีรัมใหม่ อาจช่วยให้มีความไวสูงขึ้น อย่างไรก็ตามวิธีวิเคราะห์นี้เหมาะสำหรับกรณีที่ใช้ยาเกินขนาดและต้องการได้ผลเร็ว วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2542; 32: 150-9.

คำรหัส : โคโอะซีแอม, HPLC-DAD

* เป็นส่วนหนึ่งของภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2541-2542

** ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

† ผู้รับผิดชอบบทความ

Abstract: Quantification of Diazepam in Serum by High Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection*

Srisupronkronkul K, Pongraveevongsa P**, Ruangyuttikarn W**†**

Objective: High performance liquid chromatography photodiode array detection (HPLC-DAD) was developed to quantify diazepam in serum in order to measure diazepam level in overdose cases.

Samples: Eleven serum samples were collected from eight patients and three cadavers whose reported as diazepam abusers.

Method: Acetonitrile and water in the ratio of 50:50 was used as a mobile phase with a reverse phase C₁₈ column at a flow rate of 1.0 mL/min in 10 minutes and reading absorbance at a wavelength of 229 nm. Proteins in serum were precipitated with methanol before analysis.

Results: Diazepam concentration of 0.20 µg/mL was the lowest concentration that could be detected. The concentrations of diazepam at 5 and 40 µg/mL added to pooled serum showed percent recovery at 100.90 and 98.87%, respectively. This method could detect diazepam in serum of only three patients and one cadaver. The measurable diazepam concentrations are in the range of 0.23 – 1.66 µg/mL.

Conclusion: The sensitivity of HPLC-DAD was lower than expected. Improving of sample preparation, changing solvents used in mobile phase and using fresh serum probably will help to increase the sensitivity. However, this method is not time consuming, suitable for serum analysis of the overdose cases which need a speedy result. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 1999; 32: 150-9.

Key words : Diazepam, HPLC-DAD

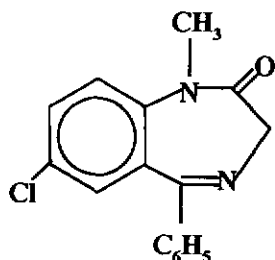
* Term paper in partial fulfillment of the requirements for the degree of Bachelor of Science in Medical Technology (1997-1998), Chiang Mai University.

** Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

† Corresponding author

บทนำ

ไดอะซีแพม (Diazepam) ^{1,2} เป็นยาในกลุ่ม Benzodiazepines มีสูตรทางเคมีเป็น 7-chloro-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one. และมีสูตรโครงสร้างทั่วไป ดังนี้



ไดอะซีแพม มีน้ำหนักโมเลกุล 284.7 มีจุดเดือดอยู่ที่ 131-135°C. ลักษณะเป็นผลึกแข็ง สีขาวถึงเหลือง ไม่มีกลิ่น ไม่ละลายในน้ำ แต่สามารถละลายในเอทานอล และละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม จัดอยู่ในกลุ่มยาที่มีคุณสมบัติเป็นต่าง สามารถแยกได้โดยใช้สารละลายอินทรีย์ที่อยู่ในภาวะต่าง ไดอะซีแพมจะออกฤทธิ์อยู่ในร่างกายได้เป็นเวลานาน มีเมตาบอลิซึมส่วนใหญ่อยู่ที่ตับ 70% ของไดอะซีแพมที่เข้าไปในร่างกายจะถูกขับออกทางปัสสาวะในรูปของ Oxazepam glucuronide และ Conjugated temazepam และปริมาณ 10% จะถูกกำจัดออกทางอุจจาระ

ไดอะซีแพมมีขายในรูปของยาเม็ดและยาน้ำที่รู้จักกันทั่วไป เช่น Alupram, Apozepam, D-Tran, Ducene, Evacalm, Monozide10, Norodipam, Paxel, Tensium และ Valium ซึ่งถูกจัดเป็นยาควบคุมไม่สามารถซื้อได้เองตามท้องตลาด ในปัจจุบันไดอะซีแพมถูกนำไปใช้เป็นยาระงับประสาทช่วยลดภาวะตื่นตัว มีฤทธิ์ต่าง ๆ ดังนี้คือ ลดความวิตกกังวล หย่อนคลายกล้ามเนื้อ ทำให้เกิดภาวะสูญเสียความจำ ป้องกันการชัก ระวัง

ประสาท สะกดจิตทำให้หลับ ซึ่งจะมีประโยชน์มากในทางการแพทย์ ปริมาณความเข้มข้นของไดอะซีแพมในภาวะต่างๆ มีดังนี้ ^{3,4}

- ระดับปกติ/ระดับการรักษา : 0.5-2.5 µg/mL
- ระดับการเกิดพิษ : 5-20 µg/mL
- ระดับที่ทำให้ตาย : >50 µg/mL

ในปัจจุบันไดอะซีแพมเป็นยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรคต่าง ๆ และมีคนจำนวนมากหันมาใช้ยาประเภทนี้ โดยเฉพาะผู้ที่ใช้แรงงานนิยมหันมาใช้ยาประเภทนี้เพื่อระงับอาการปวดเมื่อย ทำให้จิตใจสบายมีแรงต่อสู้กับวันใหม่ต่อไปได้ การใช้ยาประเภทนี้เพียงครั้งละ 2 เม็ด ก็มากพอจะเห็นผลการออกฤทธิ์ได้ ดังนั้นเมื่อใช้ได้ผลก็จะไม่เปลี่ยนยา บางครั้งความเจ็บปวดอาจไม่รุนแรงก็มีความต้องการยา ในรายที่มีแนวโน้มที่จะติดยาได้ง่าย การใช้ยาประเภทนี้เสี่ยงอันตรายมาก ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณไดอะซีแพมจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการรักษาผู้ป่วยเหล่านี้ เพื่อให้แพทย์สามารถวินิจฉัยหาสาเหตุได้ถูกต้อง และทำการรักษาได้ทันทั่วถึง

การตรวจวัดระดับไดอะซีแพมสามารถใช้วิธี Spectrophotometry, Thin layer chromatography (TLC) หรือวิธี Immunoassay ซึ่งทั้ง 3 วิธีนี้ นิยมใช้เป็นการตรวจเบื้องต้น และตามด้วยการตรวจยืนยันผล ซึ่งอาจใช้วิธี Chromatography ได้แก่ High performance liquid chromatography (HPLC) หรือ Gas chromatography / Mass spectrometry (GC/MS) ทั้ง 2 วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงมาก วิธี GC/MS มีขั้นตอนในการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างยุ่งยากมากกว่า สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการควบคุมเครื่อง ดังนั้นวิธี HPLC จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้แพร่หลายกว่า โดยอาจใช้ MS เข้าร่วมวิเคราะห์ในการยืนยันผลสำหรับตัวอย่างในบางกรณี

ต้องการผลชัดเจน เช่น ตัวอย่างคดี เป็นต้น

การใช้ HPLC ในการวิเคราะห์ไดอะซีแพม ได้มีผู้ศึกษามาก่อนค่อนข้างมาก⁶⁻¹² โดยใช้ Mobile phase คอลัมน์ หรือเครื่องวัดที่ต่างกัน ส่วนใหญ่จะใช้ เมทานอล^{6,8-9,11-12} หรือ Acetonitrile^{7,10} กับ Phosphate buffer เป็น Mobile phase และใช้ Reverse phase HPLC โดยคอลัมน์เป็น C₁₈^{7,10-12} หรือ C₈^{6,8-9} และใช้เครื่องวัดเป็น UV ที่ความยาวคลื่นแสง 254 nm สามารถวัดไดอะซีแพมได้ต่ำถึงระดับ ng/mL โดยมี % recovery อยู่ในช่วง 80-90% ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทดลองวัดระดับไดอะซีแพมในซีรัมด้วยเครื่อง HPLC ที่เรามีอยู่ซึ่งเป็นเครื่องวัดแบบ Diode array detector (DAD) เพื่อศึกษาถึงความไวในการวิเคราะห์ไดอะซีแพม ในการนำมาใช้ประกอบหรือยืนยันผลการตรวจวัดระดับไดอะซีแพม ด้วย Spectrophotometer ดังนั้นจึงมุ่งพัฒนาการใช้ HPLC-DAD แบบง่าย ๆ พร้อมการเตรียมตัวอย่างแบบรวดเร็ว ไม่ใช้เวลานานเหมือนการสกัดที่เคยมีการทำมาก่อน⁶⁻¹² เพื่อนำวิธีนี้มาตรวจวัดปริมาณไดอะซีแพมในซีรัมของผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตที่ใช้ไดอะซีแพมเกินขนาด

Photodiode array detector เป็นเครื่องวัดแสงที่ต่อเชื่อมเข้ากับ HPLC อาศัยคุณสมบัติของหลอดรับแสงที่ประกอบด้วย Photodiode และตัวเก็บประจุ (Capacitor) ต่อกันเข้าเป็นแถว มีความสามารถในการวัดสเปกตรัมของสารที่ถูกแยกออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ความจำเพาะของการวิเคราะห์แต่ละครั้งสูงขึ้น และคลื่นแสงมี Reproducibility ดีกว่าหลอดรับแสง (Photomultiplier) ปกติที่มีในเครื่อง Spectrophotometer ทำให้การใช้งานง่ายและสะดวกขึ้น¹³⁻¹⁴

วัสดุและวิธีการ เครื่องมือ

เครื่อง HPLC (Varian) solvent delivery system model 9012Q, Detector model 9065 Polychrome, Recorder model ALR optima series 3, คอลัมน์ Bondapak C₁₈ เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 μ m ยาว 4.6 ซม. กว้าง 16 มม.

ตัวอย่างวิเคราะห์

เป็นซีรัมผู้ป่วยจำนวน 8 ราย และผู้เสียชีวิตจำนวน 3 ราย ที่มีประวัติชัดเจนว่ามีการใช้ไดอะซีแพมเกินขนาด เก็บซีรัมที่อุณหภูมิ -10°C. ก่อนการวิเคราะห์

วิธีการวิเคราะห์ความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสม ของไดอะซีแพม

ใช้ไดอะซีแพมมาตรฐานซึ่งเตรียมจากยาเม็ดของบริษัท Hoffman-La Roche Ltd. (Switzerland) ความเข้มข้น 5 mg/tab โดยการสกัดด้วย Acetonitrile (ACN) และระเหยแห้งก่อนนำ Residue ที่ได้เก็บในที่มืดค้างคืนในตู้ดูดความชื้น ละลาย Residue ที่ได้ในสารละลาย ACN และน้ำ ในอัตราส่วน 50:50 นำมา Scan ด้วย UV-VIS spectrophotometer เพื่อหาความยาวคลื่นของไดอะซีแพมที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงที่สุด

การหา HPLC condition ที่เหมาะสม

ในการตรวจหาสภาวะที่เหมาะสมของ Mobile phase ใช้ Isocratic elution โดยมี Mobile phase เป็นส่วนผสมของ ACN:H₂O ที่ความยาวคลื่นที่เลือกได้จากการทดลองข้างต้น และปรับอัตราส่วน

ของ Mobile phase, Flow rate และเวลาที่ใช้ในการวัดโดอะซีแอม ทั้งนี้เพื่อให้ได้ Retention time ของโดอะซีแอมที่แสดงค่าของโดอะซีแอม (Peak) ชัดเจนที่สุด

ในการตรวจหาความไวของการวิเคราะห์ หรือความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจวัดได้ ทำโดย ละลายผงโดอะซีแอมที่สกัดได้ใน ACN:H₂O ในอัตราส่วน 50:50 หรือ 20:80 ให้มีความเข้มข้น 100 µg/mL จากนั้นเจือจางต่อจนได้โดอะซีแอม ความเข้มข้น 50.00, 25.00, 12.50, 6.25, 3.12 และ 1.56 µg/mL ตามลำดับ หรือเจือจางต่ออีกเป็น Two fold dilution แล้วนำสารละลายแต่ละความเข้มข้น ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยเริ่มจากความเข้มข้นต่ำ ไปหาความเข้มข้นที่สูงขึ้น พร้อมกับบันทึกผลเพื่อเลือกสารละลาย และทดสอบความไวของการวิเคราะห์สารนี้

Calibration curve ของโดอะซีแอม

เตรียมสารละลายโดอะซีแอมมาตรฐานความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 µg/ml ในสารละลายที่เลือกไว้จากการทดลองข้างต้น นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ด้วยปริมาตร 20 µL /injection โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งต่อหนึ่งความเข้มข้น คำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Peak area ในแต่ละความเข้มข้น นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโดอะซีแอมกับ Peak area ที่วัดได้

การเตรียมตัวอย่างซีรัมเพื่อการวิเคราะห์

เติมสารละลายมาตรฐานโดอะซีแอมลงไปใน Pooled serum ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 หรือ 20 µg/mL พร้อมกับเติม K₂CO₃ ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 100 µL ลงไปด้วย จากนั้นทดลองสกัดโดอะซีแอมจากซีรัมโดยใช้ Diethyl ether หรือ

คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 1:3 หรือตกตะกอนโปรตีนในซีรัมก่อนด้วยเมทานอล หรือ ACN อัตราส่วน 1:1

ละลาย Residue ที่ได้จากการสกัดด้วย ACN:H₂O อัตราส่วน 50:50 ปริมาตร 100 µL และนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC 20 µL ส่วนตัวอย่างที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยเมทานอล หรือ ACN นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 rpm ก่อนนำส่วนใส 20 µL ฉีดเข้าเครื่อง HPLC

การหา % recovery ของโดอะซีแอม

นำ Pooled serum ผสมกับโดอะซีแอมมาตรฐานให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 และ 40 µg/mL ตามลำดับ จากนั้นดูดมา 500 µL แล้วสกัดโดอะซีแอมจากซีรัมโดยวิธีที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองข้างต้น แล้ววิเคราะห์ปริมาณโดอะซีแอมด้วยเครื่อง HPLC นำค่าที่ได้คำนวณหา % recovery จากสูตร

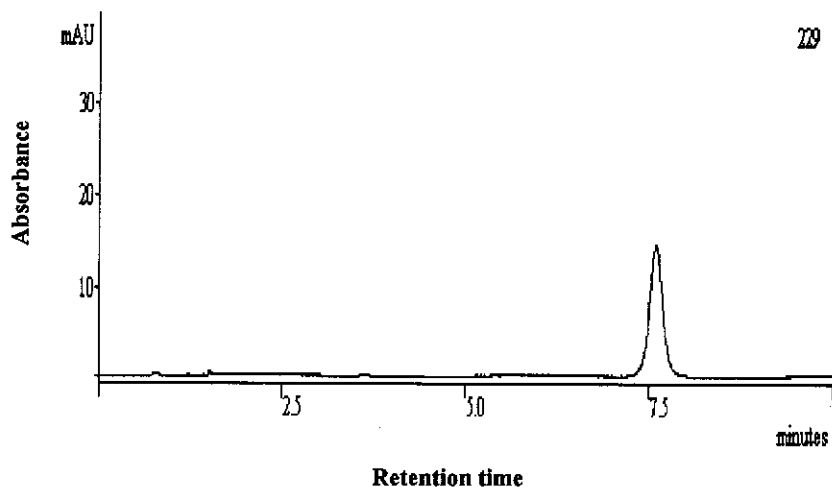
$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{ปริมาณโดอะซีแอมหลังจากสกัดโดยอ่านจาก Calibration curve} \times 100}{\text{ปริมาณโดอะซีแอมที่เติมเข้าไปเป็นความเข้มข้นสุดท้าย}}$$

ผลการทดลอง

จากการ Scan หาความยาวคลื่นแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer พบว่าโดอะซีแอมสามารถดูดกลืนแสงมากที่สุดที่ความยาวคลื่น 229 nm ดังนั้นจึงเลือกใช้ความยาวคลื่น 229 nm ในการตรวจวิเคราะห์โดอะซีแอมตลอดงานวิจัยครั้งนี้

พบว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่เห็น Peak ของโดอะซีแอมชัดเจน โดยมี Retention time ที่ 7.5 นาที (รูปที่ 1) และไม่มี Peak ของสารอื่นใดปรากฏ หลังจากนั้นคือการตั้ง Condition ของเครื่อง HPLC ดังต่อไปนี้

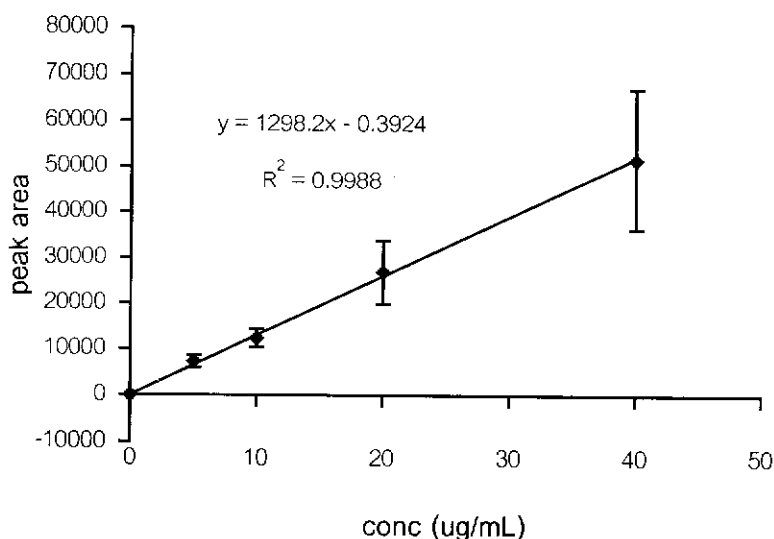
Mobile phase = ACN:H₂O ในอัตราส่วน 50:50
 Wavelength = 229 nm
 Flow rate = 1.0 mL/min
 Total time = 10 min



รูปที่ 1 HPLC chromatogram ของไดอะซีแพมมาตรฐานความเข้มข้น 2 µg/mL ที่แยกได้โดย Mobile phase เป็น ACN:H₂O ในอัตราส่วน 50:50 มีอัตราการไหล 1.0 mL/min นาน 10 นาที ความยาวคลื่น 229 nm สามารถแยกไดอะซีแพมได้ที่ Retention time 7.5 นาที

ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายมาตรฐานไดอะซีแพมที่สามารถตรวจวัดได้คือ 0.20 µg/mL

รูปที่ 2 แสดง Calibration curve ของสารละลายมาตรฐานไดอะซีแพม ซึ่งเป็นเส้นตรง ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) = 0.9994

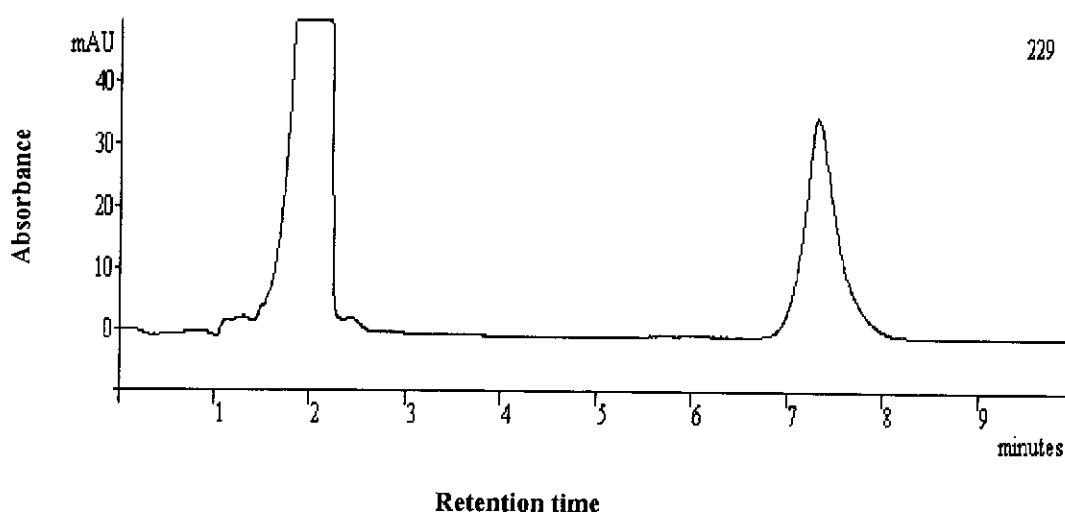


รูปที่ 2 Calibration curve ของไดอะซีแพมมาตรฐานความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 µg/mL จากการทดลอง 3 ครั้ง ได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์, $r = 0.9994$

เมื่อทำการสกัดไดอะซีแพมจากซีรัมด้วย Diethyl ether ผลปรากฏว่าสารละลายที่สกัดได้มีความขุ่น และสารละลายที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีลักษณะเป็นผลึกไม่ละลายใน Mobile phase solution ในอัตราส่วน 50:50 จึงไม่สามารถนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ได้ แต่ตัวอย่างที่ตกตะกอนโปรตีนก่อนด้วยเมทานอล สามารถวิเคราะห์ปริมาณไดอะซีแพมได้มากกว่าการตกตะกอนโปรตีนด้วย ACN ในความเข้มข้นเดียวกัน จึงได้เลือกใช้เมทานอล

ในการเตรียมตัวอย่างซีรัม

ไดอะซีแพมเมื่อเติมลงไปซีรัมและผ่านการเตรียมตัวอย่างโดยตกตะกอนโปรตีนแล้ว สามารถแยกออกได้ชัดเจนจากสารปนเปื้อนต่าง ๆ ในซีรัม ทั้งนี้ได้แสดง HPLC chromatogram ไว้ในรูปที่ 3 ซึ่งมีลักษณะ Chromatogram เช่นเดียวกับตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยหรือผู้เสียชีวิตที่ตรวจวัดไดอะซีแพมได้



รูปที่ 3 HPLC chromatogram ของ Pooled serum ที่เติมไดอะซีแพมมาตรฐานความเข้มข้น 10 µg/mL และผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วยเมทานอล วิเคราะห์ด้วย HPLC-DAD

ตารางที่ 1 แสดง % recovery ของไดอะซีแพม พบว่าจำเป็นต้องเติม K_2CO_3 ความเข้มข้น 1 M ปริมาตร 100 µL ลงไปด้วยในขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนออกจากซีรัม จึงจะทำให้ % recovery ของไดอะซีแพมสูงขึ้น ในตารางที่ 2 แสดงรายละเอียดของปริมาณไดอะซีแพมที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างผู้ป่วยและผู้เสียชีวิต เนื่องจากการใช้ไดอะซีแพมเกินขนาดจำนวน 11 ราย โดยสามารถตรวจวัดได้เพียง 4 ราย มีค่าอยู่ระหว่าง 0.23–1.66 µg/mL

วิจารณ์

ความยาวคลื่นที่เหมาะสมสำหรับไดอะซีแพมที่ละลายใน ACN:H₂O อัตราส่วน 50:50 คือ 229 nm ตรงกับผลการทดลองของ Rolf และ Boqus¹³ ซึ่งต่างจากงานวิจัยของผู้อื่น^{7-9,12} ที่ใช้ 254 nm

ผลการทดลองหาความไวของการตรวจหาไดอะซีแพม (sensitivity) พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้เท่ากับ 0.20 µg/mL ซึ่งเป็นค่าที่สูง ถือว่ามีความไวต่ำ มีรายงานของ Lambert และคณะ⁶ แสดงการตรวจวัดไดอะซีแพมได้ต่ำสุดที่ความ

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ Recovery ของไดอะซีแพม (DZP) ความเข้มข้น 5 และ 40 $\mu\text{g/mL}$ ที่เติมในซีรัม และเติม K_2CO_3 ความเข้มข้น 1 mol/L ปริมาตร 100 μL ก่อนการตกตะกอนโปรตีนด้วยเมทานอล และวิเคราะห์ด้วย HPLC-DAD

ความเข้มข้นของยาไดอะซีแพม ($\mu\text{g/mL}$)	% recovery			Mean $\pm$ SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
Serum	0.00	0.00	0.00	-
Serum+ K_2CO_3	0.00	0.00	0.00	-
Serum+DZP 5 $\mu\text{g/mL}$	18.20	19.00	19.80	19.00 $\pm$ 0.80
Serum+DZP 5 $\mu\text{g/mL}$ + K_2CO_3	97.80	105.60	99.40	100.90 $\pm$ 4.12
Serum+DZP 40 $\mu\text{g/mL}$ + K_2CO_3	99.98	99.78	96.85	98.87 $\pm$ 1.74

ตารางที่ 2 ปริมาณไดอะซีแพมในซีรัมของผู้ป่วยจำนวน 8 ราย และผู้เสียชีวิตจำนวน 3 ราย (รายที่ 9 ถึง 11) เนื่องจากได้รับไดอะซีแพมเกินขนาด วิเคราะห์ด้วย HPLC-DAD

Sample No.	ปริมาณไดอะซีแพม ในซีรัม ($\mu\text{g/ml}$) โดย HPLC
1	1.66
2	ND*
3	ND*
4	0.69
5	0.23
6	ND*
7	ND*
8	ND*
9	0.78
10	ND*
11	ND*

* ND = Non-detected

เข้มข้น 10 ng/mL หรือไวกว่าการทดลองครั้งนี้ 20 เท่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากสาเหตุหลายประการเป็นต้นว่า การวิเคราะห์ด้วย HPLC-DAD มีความไวต่ำกว่า UV detector¹⁴ ถึงแม้ว่าจะมีความจำเพาะสูงกว่าเพราะสามารถตรวจดู Spectrum ของสารที่วิเคราะห์ได้ หรือเนื่องจากการเตรียมตัวอย่างในงานวิจัยนี้ใช้เพียงการตกตะกอนโปรตีน ไม่ได้ทำตัวอย่างให้เข้มข้นขึ้นก่อนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับของ Lambert และคณะ⁵ แต่มีข้อดีกว่าในแง่การเตรียมตัวอย่างที่เร็วใช้เวลาสั้นมาก เหมาะสำหรับรายฉุกเฉินและต้องการผลวิเคราะห์ด่วน หากต้องการวัดระดับไดอะซีแพมที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 0.2 µg/mL ควรต้องทำการสกัดซีรัมและทำให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้น ก่อนการวิเคราะห์¹⁵ นอกจากนี้ยังพบว่า ไดอะซีแพมมีการสลายตัวง่าย ดังนั้นตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ต้องเป็นซีรัมใหม่

การเติม K_2CO_3 ลงไปด้วยในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างจะช่วยให้ได้ผลการวิเคราะห์ดีขึ้น เนื่องจากไดอะซีแพมเป็นยาในกลุ่ม Basic drugs ดังนั้นการเปลี่ยนสภาพสารละลายให้มีฤทธิ์เป็นด่างทำให้ไดอะซีแพมสามารถละลายได้ดีขึ้น

ปริมาณไดอะซีแพมในซีรัมผู้ป่วยและผู้เสียชีวิต เนื่องจากได้รับไดอะซีแพมเกินขนาด จำนวน 11 ราย มีระดับไดอะซีแพมอยู่ในช่วงระดับการรักษาไม่น่าจะทำให้เสียชีวิตได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการสลายตัวของไดอะซีแพมเพราะซีรัมที่ใช้วิเคราะห์เป็นซีรัมของผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตที่ได้เก็บไว้ประมาณ 2-10 เดือน ก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ในงานวิจัยครั้งนี้ นอกจากนี้การที่ตรวจไม่พบไดอะซีแพมในซีรัมของผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตในรายที่มีประวัติการใช้ไดอะซีแพมเกินขนาดมา อาจเนื่องจากการสลายตัวของไดอะซีแพม หรือมีการใช้ไดอะซีแพมร่วมกับยาหรือสารตัวอื่น เช่น แอลกอฮอล์ หรือ มอร์ฟิน มีผลทำให้เกิดการ

เสริมฤทธิ์กดระบบประสาท สามารถกดการหายใจ ทำให้เจ็บป่วยและเสียชีวิตได้

สรุป

วิธี HPLC-DAD ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มีความไวในการตรวจวัดปริมาณไดอะซีแพมที่ผ่านการสกัดโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเมทานอล เท่ากับ 0.20 µg/mL โดยใช้ Mobile phase เป็น ACN:H₂O ในอัตราส่วน 50:50 ผ่าน Stationary phase ที่เป็น C₁₈ ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 1 mL/min เป็นเวลา 10 นาที ที่ความยาวคลื่น 229 nm สามารถแยก Peak ไดอะซีแพม ออกมาได้ชัดเจนที่ Retention time เท่ากับ 7.5 นาที % Recovery ของไดอะซีแพมจากซีรัมเท่ากับ 100.90 และ 98.87% ที่ความเข้มข้น 5 และ 40 µg/mL ตามลำดับ ระดับไดอะซีแพมในซีรัมผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตเนื่องจากได้รับ ไดอะซีแพมเกินขนาดพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.23-1.66 µg/mL ซึ่งอาจเป็นระดับที่ต่ำกว่าระดับที่เป็นจริง เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่ได้เก็บไว้นานเกินกว่า 6 เดือน และความไวในการตรวจวัดด้วย HPLC-DAD ต่ำกว่าที่คาดหมายไว้มาก แต่หากทำการสกัดตัวอย่างเพื่อทำให้สารเข้มข้นมากขึ้น ก่อนการวิเคราะห์ อาจช่วยทำให้สามารถวิเคราะห์ได้แม้ว่าจะมีไดอะซีแพมในระดับที่ต่ำ ๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Arthur O. Diazepam. Remington's Pharmaceutical Sciences. Easton: Pennsylvania, 1980, 1007.
2. Mandelli M, Tognoni G, Garattini S. Clinical pharmacokinetic of diazepam. Clin Pharmacokinet. 1978; 3: 72-91.
3. Caraco Y, Tateishi T. Interethnic difference in omeprazole's inhibition of

- diazepam metabolism. Clin Phar&Ther 1995; 1: 62-72.
- สงว นามประสิทธิ์. Benzodiazepines. โครงการฝึกอบรมระยะสั้น หลักสูตรการตรวจพิสูจน์สารเสพติดในคน วิธีตรวจยืนยัน. โรงพยาบาลธัญญารักษ์ 2539, 1-9.
- จุฑามาศ สัตยวิวัฒน์. ปัญหาของ dipyrone และ diazepam. The Pharmacology 1979; 1: 51-4.
- Lambert WE, Meyer E, Xue-Ping Y, De Leenheer AP. Screening, identification, and quantitation of benzodiazepines in post-mortem samples by HPLC with photodiode array detection. J Anal Toxicol 1995; 19: 35-40.
- Vidmantas AR, Patrick NF, Patricia RG, Kent EO, Alan JW. High-performance liquid chromatographic and gas-liquid chromatographic determination of diazepam and nordiazepam in plasma. J chromatography 1980; 183: 441-8.
3. Tada K, Moroji T, Sekiguch R, Motomura H, Noguchi T. Liquid-chromatographic assay of diazepam and its major metabolites in serum, and application to pharmacokinetic study of high doses of diazepam in schizophrenics (technical note). Clin Chem 1985; 31: 1712-15.
9. อรุณี อวนสกุล, ทวีพร พันธุ์พาณิชย์. การศึกษาเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ปริมาณยาไดอาซีแพมในพลาสมา. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2529; 30: 997-1005.
10. Koenigbauer MJ, Assenza SP, Willough RC, Curtis MA. Trace analysis of diazepam in serum using microbore high-performance liquid-chromatography and online preconcentration. J Chrom-Bio 1987; 413: 161-9.
11. Lau CE, Dolan S, Tang M. Microsample determination of diazepam and its 3 metabolites in serum by reversed phase high-performance liquid-chromatography (Technical note). J Chrom-Bio 1987; 416: 212-8.
12. St Pierre MV, Pang KS. Determination of diazepam and its metabolites by high-performance liquid-chromatography and thin-layer chromatography. J Chrom-Bio 1987; 421: 291-307.
13. Rolf M, Bogusz M. Identification power of a standardized HPLC-DAD system for systematic toxicological analysis. J Anal Toxicol 1995; 19: 79-83.
14. แม้น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม. Principles and techniques of instrumental analysis. พิมพ์ครั้งที่ 2 โรงพิมพ์ชวนพิมพ์, กรุงเทพฯ 2539, 90-5.
15. Hall MA, Robinson CA, Brissie RM. High performance liquid chromatography of alprazolam in postmortem blood using solid phase extraction. J Anal Toxicol 1995; 19: 511-3.