บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 พลาสมาของคน

การวิจัยครั้งนี้ใช้พลาสมาของคนโดยได้รับความอนุเคราะห์จากสภากาชาดไทย (หมายเลข TB 47405007, หมู่โลหิตบี B) เก็บเข้าตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะถูกนำออกมาใช้

3.1.2 สารเคมี

1. นอร์มอลออกตาโคเซน (n-octacosane) Analytical grade บริษัท SIGMA ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เฮกเซน (hexanne) HPLC grade บริษัท J.T.Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. เอทิลอะซีเตต (ethylacetate) Analytical grade บริษัท ITALMAR ประเทศฝรั่งเศส
4. แอซีโตไนไตรล์ (acetonitrile) HPLC grade บริษัท Mallinckrodt ประเทศฝรั่งเศส
5. เมทานอล (absolute methanol) บริษัท Mallinckrodt ประเทศฝรั่งเศส
6. เอทานอล (absolute ethanol) บริษัท ITALMAR ประเทศฝรั่งเศส

3.1.3 อุปกรณ์

1. เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รุ่น 6890N บริษัท Agilent ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. คอลัมน์ (gas chromatography column) ชนิด HP-1 รุ่น 19091Z-012 บริษัท Agilent ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) รุ่น RE 52 บริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น
4. เครื่องชั่งแบบละเอียด (electronic balance) รุ่น fx-180 บริษัท A & D ประเทศญี่ปุ่น
5. เครื่องเขย่าผสม (vortex-mixer) รุ่น Vortex-Genie No.2 บริษัท Scientific Industry ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Z 230 บริษัท Hermle ประเทศเยอรมัน
7. ตู้แช่แข็ง –70 องศาเซลเซียส รุ่น MDF 790 AT บริษัท Sanyo ประเทศญี่ปุ่น

8. Auto pipette รุ่น pipetman บริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส
9. Sep-pak C18 cartridge รุ่น WAT091139 บริษัท Waters ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2 การดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนการศึกษาเพื่อให้ได้มาซึ่งวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเปลาโนทอลในพลาสมาโดยอาศัยเทคนิคทางแก๊สโครมาโทกราฟีในครั้งนี้ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 3.2.1 การหาภาวะการทดลองทางแก๊สโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอล

ขั้นตอนที่ 3.2.2 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเปลาโนทอลในพลาสมาโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง

ขั้นตอนที่ 3.2.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์เปลาโนทอลในพลาสมาที่ได้พัฒนาขึ้น

3.3 ขั้นตอนการวิจัย

3.3.1 การหาภาวะการทดลองทางแก๊สโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอล

เริ่มจากการเตรียมสารละลายเปลาโนทอลในเฮกเซนที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตลอดจนการเตรียมสารละลายเปลาโนทอลโดยการเติม (spiked) ลงในพลาสมา เพื่อนำไปใช้สำหรับการทดลองในขั้นตอนอื่น ๆ ต่อไป โดยมีรายละเอียดของการเตรียมสารดังต่อไปนี้

3.3.1.1 การเตรียมสารละลายอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (internal standard) ในเฮกเซน

ชั่งนอร์มอลออกตาโคเซนจำนวน 0.05 กรัม อย่างแม่นยำ ละลายและปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนครบ 50 มิลลิลิตร ในฟลาสค์ปรับปริมาตร ปิเปตสารละลายที่ได้จำนวน 0.25 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยเฮกเซนจนครบ 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายนอร์มอลออกตาโคเซนความเข้มข้น 2.5 ppm

3.3.1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลในเฮกเซน

1. ชั่งหลอดทดลองที่ผ่านการล้างและนำไปอบแห้งแล้วที่ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงอย่างแม่นยำ
2. ปิเปตสารสกัดจากใบเปล้าน้อยซึ่งมีเปลาโนทอลคิดเป็น 81.76 % โดยน้ำหนัก ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ข้อ 1.
3. นำหลอดทดลองที่มีสารสกัดดังกล่าวไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบ/นาที นำไปอบที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักหลอดทดลองที่ได้แล้วนำมาลบกับน้ำหนักของหลอดทดลองที่ได้ในข้อ 1. น้ำหนักของสารสกัดที่ได้คิดเป็นเปลาโนทอลเท่ากับ 0.1580 กรัม
4. นำสารสกัดเปลาโนทอลที่ได้นี้มาละลายด้วยเฮกเซนปริมาตร 10.00 มิลลิลิตรได้สารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลความเข้มข้น 15,800 ppm
5. แบ่งสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลความเข้มข้น 15,800 ppm นี้มา 5.00 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองใหม่อีกหลอดหนึ่งนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบ/นาที จนกระทั่งเฮกเซนระเหยออกไปหมดเพื่อนำไปผสมกับพลาสมาสำหรับการสกัดโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งต่อไป
6. เตรียมสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลความเข้มข้น 100.0 ppm โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลความเข้มข้น 15,800 ppm ของหลอดที่เหลือ ปริมาตร 63.30 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเฮกเซนลงไป จนมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10.00 มิลลิลิตร
7. เตรียมสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลความเข้มข้น 20.0, 15.0, 12.5, 10.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.0 และ 1.0 ppm โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลความเข้มข้น 100.0 ppm ปริมาตร 1,000, 750, 625, 500, 250, 200, 150, 100 และ 50 ไมโครลิตร ตามลำดับ
8. นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนที่ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบ/นาที จนกระทั่งเฮกเซนระเหยออกไปหมด เติมเฮกเซนที่ประกอบด้วยนอร์มอลออกตาโคเซน 2.5 ppm ลงไปจนมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5.00 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณต่อด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

3.3.1.3 การหาภาวะการทดลองทางแก๊สโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอล

จากการค้นคว้ารายงานจากวารสารต่าง ๆ ทั้งในและต่างประเทศ ยังไม่มีผู้ใดรายงานถึงภาวะการทดลองสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอลในพลาสมา ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาเพื่อหาภาวะการทดลอง สำหรับวิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอลในเฮกเซน ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ดีสำหรับเปลาโนทอล โดยใช้เทคนิค multi - linear temperature program ซึ่งก็คือการควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์แบบ isothermal และ linear temperature สลับกัน โดยใช้แคปปิลารีคอลัมน์ ปรับเปลี่ยนตัวแปรต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิคอลัมน์, อัตราเร็วของแก๊สฮีเลียมที่เป็นแก๊สตัวพา เป็นต้น โดยใช้นอร์มอลออกตาโคเซนเป็นสารละลายอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด

3.3.2 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเปลาโนทอลในพลาสมาโดยใช้เทคนิค การสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง

การพัฒนาวิธีการแยกเปลาโนทอลออกจากพลาสมาในครั้งนี้ได้ทำการสกัดโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของในที่นี้ใช้ Sep-pak C18 reverse phase ซึ่งเป็นคอลัมน์ขนาดเล็กภายในบรรจุด้วย C-18 เป็นเฟสที่อยู่กับที่ชนิดดั้งเดิม (classical Sep-pak)

3.3.2.1 การเตรียมสารละลายเปลาโนทอลโดยการเติมลงในพลาสมา

เตรียมสารละลายเปลาโนทอลความเข้มข้น 20.0, 15.0, 12.5, 10.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.0 และ 1.0 ppm ในพลาสมา ใช้วิธีการเดียวกับหัวข้อ 3.3.1.2 ข้อ 5-7 เติมเฮกเซนลงไปจนมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5.00 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายเปลาโนทอลในแต่ละความเข้มข้นมาหลอดละ 0.50 มิลลิลิตร นำไประเหยให้แห้ง ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนที่ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบ/นาที จนกระทั่งเฮกเซนระเหยออกไปหมด เติมพลาสมาปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลองของแต่ละความเข้มข้น เพื่อนำไปใช้สำหรับการสกัดเปลาโนทอลจากพลาสมาด้วย Sep-pak C18 (reverse phase) cartridge ต่อไป

3.3.2.2 การสกัดเปลาโนทอลในพลาสมาด้วย Sep-pak C18 (reverse phase) cartridge

1. นำพลาสมาปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ที่มีเปลาโนทอลในแต่ละความเข้มข้น เติมแอซีโตรไนไตรล์ ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนโปรตีนและไขมันที่มีอยู่ในพลาสมา
2. ปิเปตสารละลายส่วนบน (supernatant) ที่ได้ในกระบอกฉีดยาขนาด 5.00 มิลลิลิตร ที่ต่อเข้ากับ Sep-pak C18 cartridge ซึ่งได้ pre-equilibrate ไว้ก่อนแล้วด้วยแอซีโตรไนไตรล์ 40% ในน้ำ

3. ปิเปตน้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ลงในกระบอกฉีดยาในข้อ 2. จากนั้นปิเปตสารละลายเอทานอล 10 % ในน้ำ ปริมาตร 3.00 มิลลิลิตร ลงในกระบอกฉีดยาดังกล่าวเพื่อกำจัด (washing step) สารรบกวนโดยเฉพาะสารจำพวกเกลืออินทรีย์และเกลือ อนินทรีย์ที่มีอยู่ในพลาสมาออกไป
4. ปิเปตตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิดคือเฮกเซน , เอทิลอะซีเตต : เฮกเซน (3:2) และ เอทานอลสัมบูรณ์ โดยแต่ละชนิด ปิเปตมาปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ลงไปในกระบอกฉีดยาเพื่อชะ (elution step) เปลาโนทอลในแต่ละความเข้มข้นออกจากพลาสมา
5. นำเปลาโนทอลที่ผ่านการสกัดด้วย Sep-pak C18 cartridge แล้วไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบ/นาที
6. ปิเปตเฮกเซนที่ประกอบด้วยนอร์มอลออกตาโคเซน 2.5 ppm ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองข้อ 5. จากนั้นนำไปผสมจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่า
7. วิเคราะห์ปริมาณหลังการสกัดตลอดจนความถูกต้อง ความเที่ยง ฯลฯ ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีต่อไป

3.3.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์เปลาโนทอลในพลาสมาที่ได้พัฒนาขึ้น

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์เปลาโนทอลในพลาสมาที่ได้พัฒนาขึ้นจะเรียงตามลำดับหัวข้อต่างๆ ดังนี้

3.3.3.1 ขีดจำกัดของการวัดได้ (LOD) และขีดจำกัดของการหาปริมาณ (LOQ)

วิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลในเฮกเซน และสารละลายเปลาโนทอลที่เติมลงในพลาสมาซึ่งผ่านการสกัดมาแล้วตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น ที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณของเปลาโนทอลต่อสัญญาณรบกวน (S/N) เป็น 3:1 เพื่อหาค่า LOD และอัตราส่วน 10:1 เพื่อหาค่า LOQ หาค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± SD) ตลอดจนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD %)

3.3.3.2 ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์

พิจารณาจากลักษณะโครมาโทแกรมของพลาสมาเมื่อไม่มีเปลาโนทอลอยู่เลย (plasma blank) เปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของพลาสมาเมื่อมีการเติมเปลาโนทอลลงไป เพื่อพิจารณาถึง

การรบกวนของ endogenous substances หรือสารอื่นๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณเปลาโนทอลในพลาสมา

3.3.3.3 ช่วงของความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง

เตรียมกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอล 5 ความเข้มข้นในเฮกเซน ในแต่ละวันที่ทำการทดลองทั้งสิ้น 5 วัน ช่วงที่ทำการศึกษาคือ 5.0 – 20.0 ppm และเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายเปลาโนทอลที่ความเข้มข้นในช่วงเดียวกัน ซึ่งเติมลงในพลาสมา ทำการสกัดตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น เพื่อหาความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนที่ใต้พีกของเปลาโนทอล/นอร์มอลออกตาโคเซน กับความเข้มข้นของเปลาโนทอล 5 ความเข้มข้น ผลที่ได้นำมาเขียนกราฟระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกของเปลาโนทอล/นอร์มอลออกตาโคเซน (แกน x) กับ ความเข้มข้นของเปลาโนทอลในพลาสมา (แกน y) ได้ความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรง โดยมีสมการเส้นตรง ($y = mx + c$) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ทำซ้ำในแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ซ้ำ ($n = 3$)

3.3.3.4 ความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์

วิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารละลายเปลาโนทอลในพลาสมาทั้ง 5 ความเข้มข้น ศึกษาถึงความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ใน 1 วัน (intra-day precision) โดยการทำซ้ำในแต่ละความเข้มข้นจำนวน 5 ซ้ำ ($n = 5$) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารให้เสร็จภายในวันเดียวกัน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลในเฮกเซนในแต่ละวันที่ทำการทดลอง ได้ค่าความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ซึ่งแสดงในรูปของค่าเปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับ และเปรียบเทียบค่ารีเทนชันไทม์ของเปลาโนทอลและนอร์มอลออกตาโคเซน ที่ได้จากการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน หาค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตลอดจนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

และศึกษาความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ระหว่างวัน (inter-day precision) โดยทำการทดลองจำนวน 5 วัน ($n = 5$) คำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลายเปลาโนทอลในพลาสมาซึ่งผ่านการสกัดมาแล้วตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลในเฮกเซนในแต่ละวันที่ทำการทดลอง ได้ค่าความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ซึ่งแสดงในรูปค่าเปอร์เซ็นต์ของการคืนกลับ และเปรียบเทียบค่ารีเทนชันไทม์ของเปลาโนทอลและนอร์มอลออกตาโคเซนที่ได้จากการวิเคราะห์ระหว่างวัน หาค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตลอดจนค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์