บทที่ 3

ผลและการวิจารณ์ผล

ส่วนที่ 1 การเตรียมสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน

จากการสังเคราะห์สารโดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์ระหว่าง 2-ไฮดรอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน จำนวน 10 กรัม กับเมทานอลโดยมีกรดเป็นตัวเร่ง ได้สารมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อน มีจุดหลอมเหลวที่ 182.5-183.0°ซ. จำนวน 6.51 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์สารที่ได้ประมาณ 65.10% คุณสมบัติทางสเปกโทรสโกปีของสารที่ได้จากการสังเคราะห์เปรียบเทียบกับที่สกัดจากใบเทียนบ้าน เป็นดังนี้

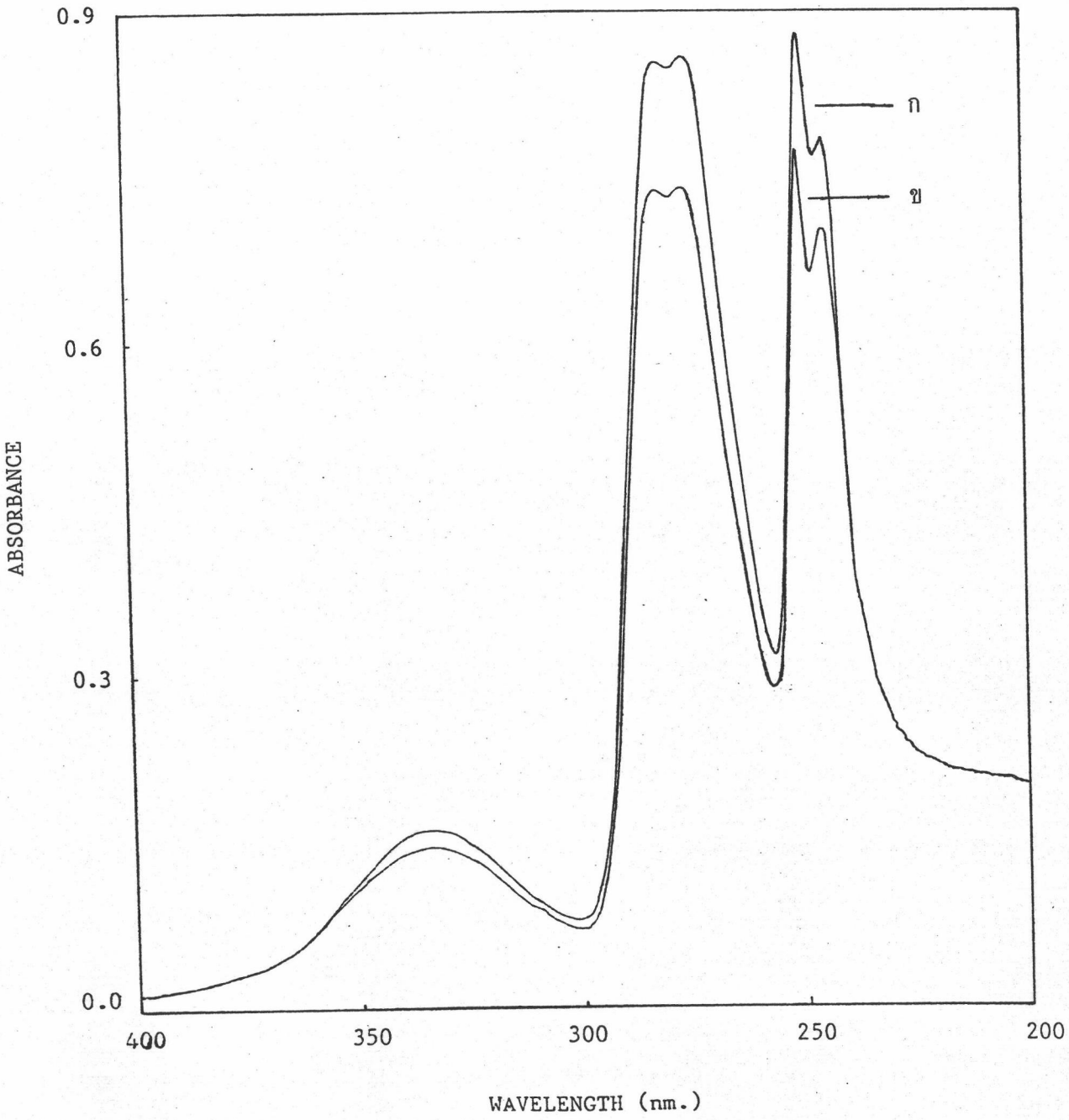
UV สเปกตรัมของสารที่ได้จากการสังเคราะห์และที่สกัดจากใบเทียนบ้าน (ในคลอโรฟอร์ม) แสดงในรูปที่ 1ก และ 1ข ตามลำดับ จะเห็นว่าสเปกตรัมของสารทั้งสองนี้ให้ค่า λ max ตรงกันคือปรากฏที่ความยาวคลื่น 243, 248, 274, 280 และ 333 นาโนเมตร

UV สเปกตรัมของสารที่ได้จากการสังเคราะห์และที่สกัดจากใบเทียนบ้าน (ในเอทานอล) แสดงในรูปที่ 2ก และ 2ข ตามลำดับ จะเห็นว่าสเปกตรัมของสารทั้งสองนี้ ให้ค่า λ max ตรงกันคือปรากฏที่ความยาวคลื่น 246, 252, 275 และ 333 นาโนเมตร

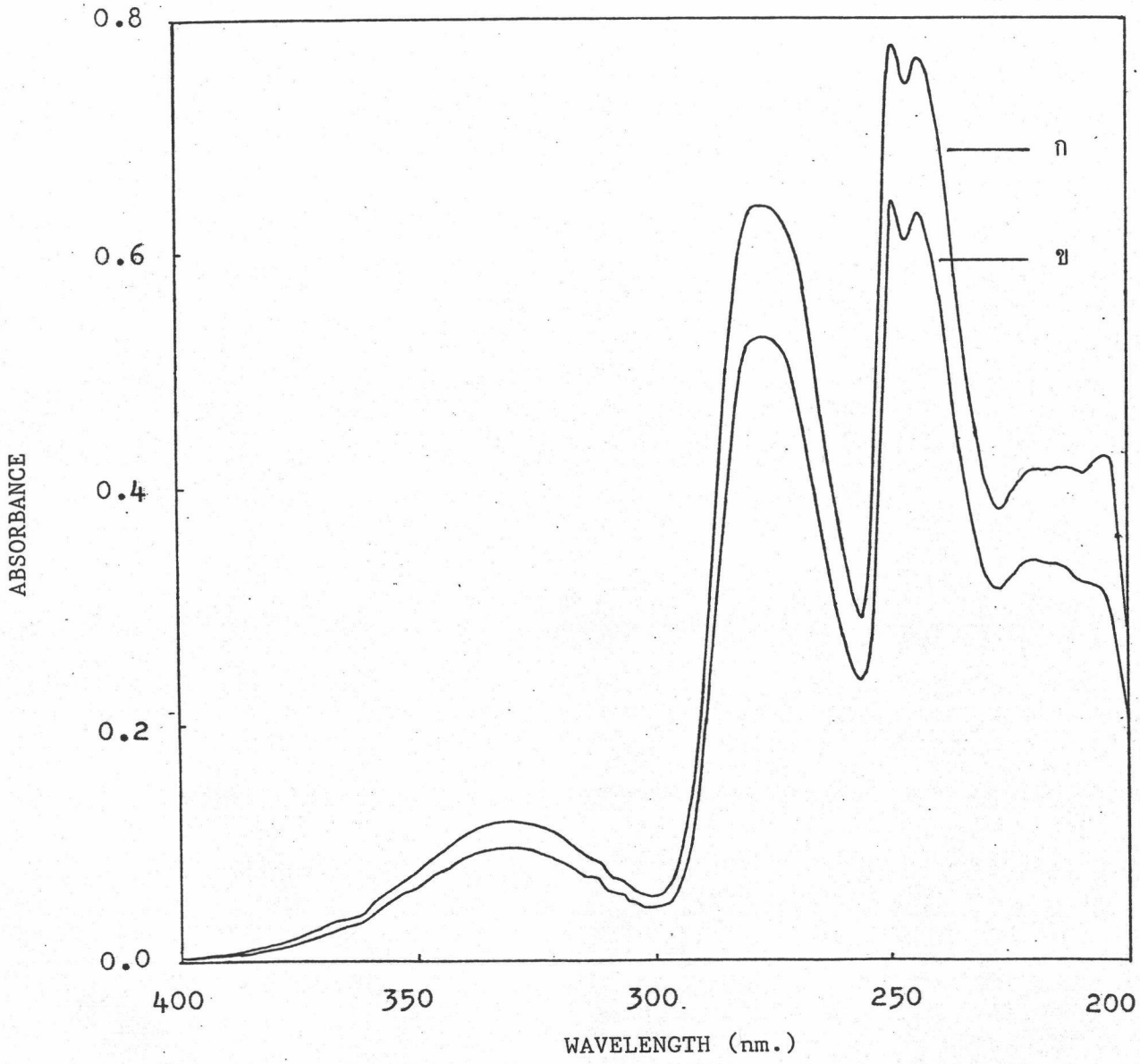
IR สเปกตรัม (โปแตสเซียมโบรไมด์) ของสารที่ได้จากการสังเคราะห์และที่สกัดจากใบเทียนบ้าน แสดงในรูปที่ 3ก และ 3ข ตามลำดับ จะเห็นว่า IR สเปกตรัมของสารทั้งสองนี้เหมือนกัน โดยให้พีคที่แสดงวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ที่ 3400 cm^{-1} (C-H stretching) และ 1600 cm^{-1} (C=C stretching) หมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) ที่ 1680 cm^{-1}, หมู่ฟังก์ชันนัลอีเทอร์ (ether functional group) ที่ 1240 cm^{-1} และ C=C stretching ใน quinonoid ring ที่ 1645 cm^{-1}

NMR สเปกตรัมของสารที่ได้จากการสังเคราะห์และที่สกัดจากใบเทียนบ้าน แสดงในรูปที่ 4ก และ 4ข ตามลำดับ จะเห็นว่า NMR สเปกตรัมของสารทั้งสองนี้เหมือนกันโดย ให้พีคที่แสดง disubstituted aromatic ring ที่ δ 8.10 และ 7.76, methoxy group ที่ δ 3.91 และ olefinic proton ที่ δ 6.18 ส่วนพีคที่ δ 7.30 เป็นพีคของโปรตอนใน $CHCl_3$ ซึ่งปนอยู่ใน $CDCl_3$

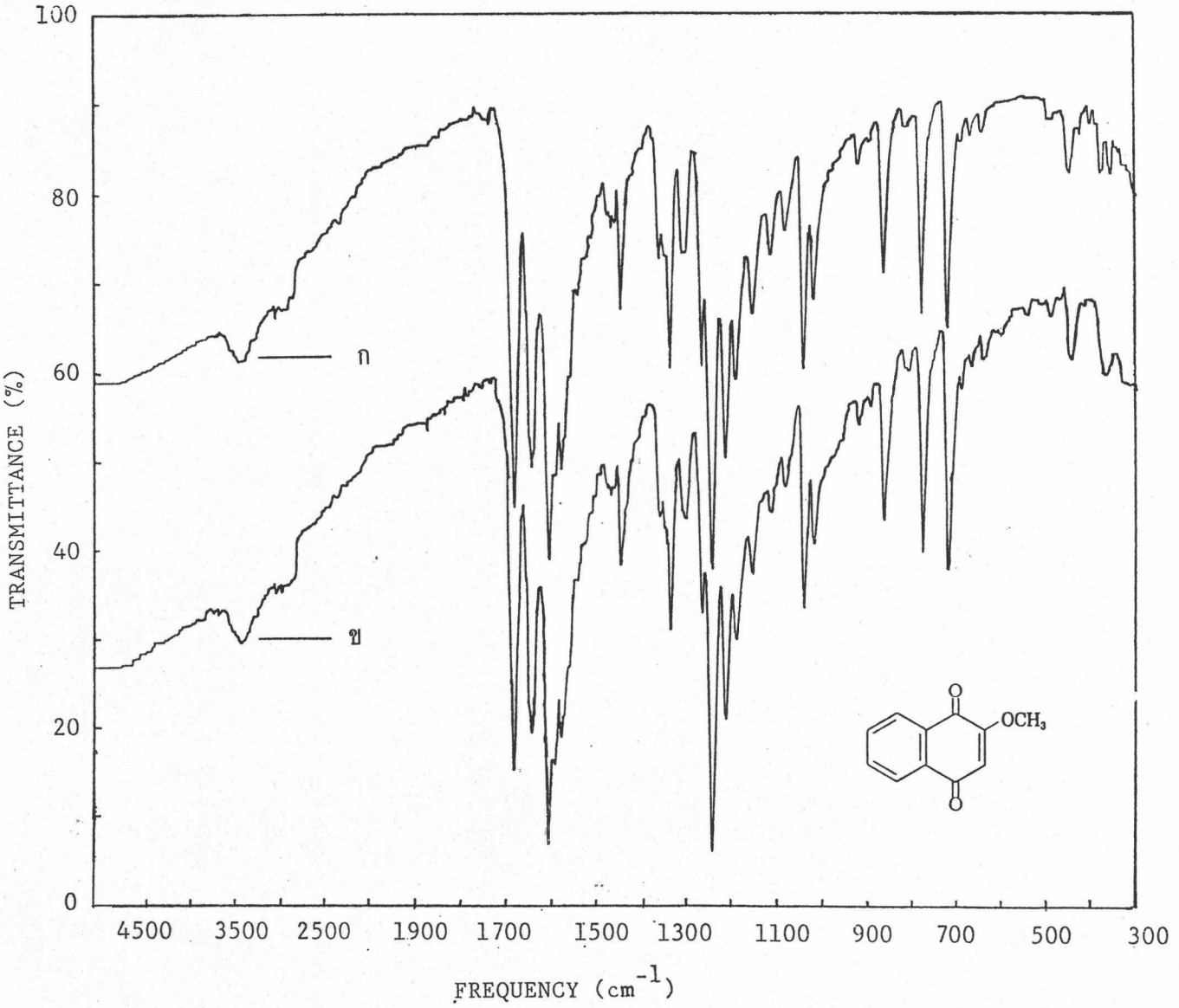
จากการศึกษาข้อมูลคุณสมบัติทางสเปกโทรสโกปีของสารและเปรียบเทียบกับที่มีรายงานไว้ (2, 3, 9, 10) สรุปได้ว่าสารที่ได้จากการสังเคราะห์ครั้งนี้คือ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และสารที่ได้จากการสังเคราะห์นี้มีคุณสมบัติทางสเปกโทรสโกปีรวมทั้งจุดหลอมเหลวตรงกันกับสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ที่สกัดจากใบเทียนบ้านทุกประการ ดังแสดงเปรียบเทียบในรูปที่ 1,2,3,4 และตารางที่ 3 ดังนั้นตลอดการศึกษาครั้งนี้ จึงใช้สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ที่ได้สังเคราะห์ขึ้น



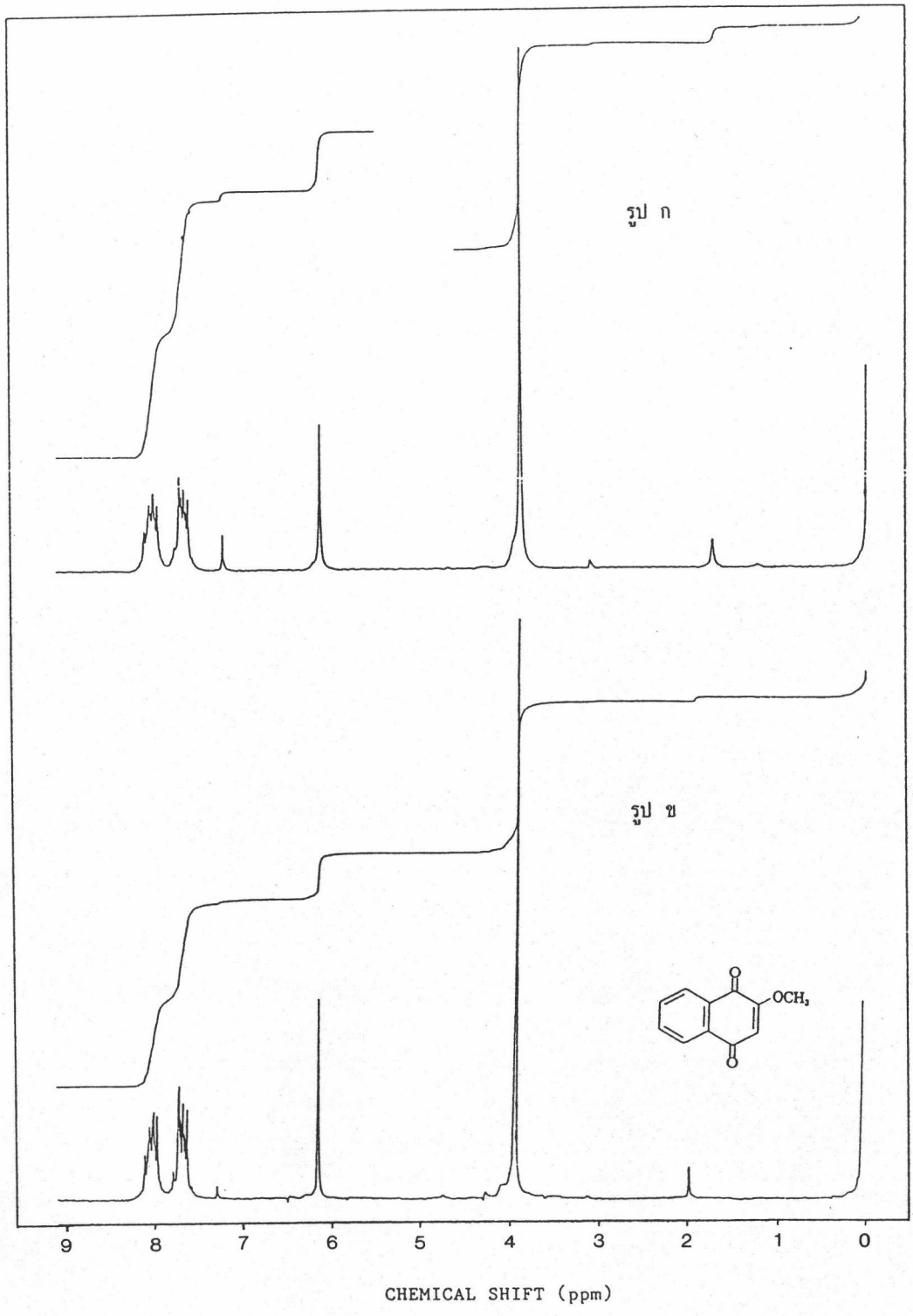
รูปที่ 1 UV สเปกตรัมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในคลอโรฟอร์ม
เส้น ก. เป็นสารที่ได้จากการสังเคราะห์ (ความเข้มข้น 8.8 มคก./มล.)
เส้น ข. เป็นสารที่สกัดจากใบเทียนบ้าน (ความเข้มข้น 7.7 มคก./มล.)



รูปที่ 2 UV สเปกตรัมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเอทานอล
เส้น ก. เป็นสารที่ได้จากการสังเคราะห์ (ความเข้มข้น 8.3 มคก./มล.)
เส้น ข. เป็นสารที่สกัดจากใบเทียนบ้าน (ความเข้มข้น 6.9 มคก./มล.)



รูปที่ 3 IR สเปกตรัมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนที่ได้จากการสังเคราะห์ (ก) และที่แยกจากใบเทียนบ้าน (ข)



รูปที่ 4 NMR สเปกตรัม ของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ที่ได้จากการสังเคราะห์ (ก) และที่แยกได้จากต้นเทียนบ้าน (ข)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบปริมาณสารที่ได้และคุณสมบัติทางกายภาพของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนที่ได้จากการสังเคราะห์และที่สกัดจากใบเทียนบ้าน

เรื่อง	สารสังเคราะห์	สารจากใบเทียนบ้าน
เปอร์เซ็นต์สารที่ได้ (%)	65.10	0.07*
ระยะเวลาในการเตรียม	ประมาณ 3 ชั่วโมง	ประมาณ 7 วัน*
จุดหลอมเหลว (°ซ.)	182.5-183	183
UV สเปกตรัมในคลอโรฟอร์ม, λ max (นาโนเมตร)	243,248,274,280 และ 333	243,248,274,280 และ 333
UV สเปกตรัมในเอทานอล, λ max (นาโนเมตร)	246,252,275 และ 333	246,252,275 และ 333
IR สเปกตรัม νmax, cm^{-1} (โปแตสเซียมโบรไมด์)	3400,1680,1645 และ 1240	3400,1680,1645 และ 1240
NMR สเปกตรัม δ ($CDCl_3$)	8.10,7.76,6.18 และ 3.91	8.10,7.76,6.19 และ 3.91

*เอกสารอ้างอิงหมายเลข 3

ส่วนที่ 2 การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน

คุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีที่สำคัญที่จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณที่ศึกษาได้แก่ การละลาย, การดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลต (ในเมทานอล) และคุณสมบัติการกระจายตัวของสารระหว่างชั้นตัวทำละลายอินทรีย์กับชั้นบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆ

2.1 การละลาย

ค่าการละลายของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ แสดงในตาราง 4 จะเห็นว่าสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม, ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ และไดคลอโรมีเทน ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีโพลาริตีปานกลาง นอกจากนี้ยังละลายได้ในตัวทำละลายอื่น ๆ ที่มีโพลาริตีปานกลาง แต่จะละลายได้น้อยมากหรือไม่ละลายในตัวทำละลายที่มีโพลาริตีสูงเช่น น้ำ และตัวทำละลายที่มีโพลาริตีต่ำ เช่น ไซโคลเฮกเซน เฮกเซน เป็นต้น สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนไม่ละลายในสารละลาย 0.1 โมลาร์ HCl แต่ละลายในสารละลาย 0.1 โมลาร์ NaOH เกิดเป็นสารละลายที่มีสีแดงเข้ม ข้อมูลค่าการละลายของสารนี้จะมีประโยชน์อย่างมากในการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารออกจากพลาสมา

2.2 คุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลต (ในเมทานอล)

อัลตราไวโอเลตสเปกตรัมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอล แสดงในรูปที่ 5 ค่าความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนแสงได้สูงสุด (max) อยู่ที่ 243 ($A^{1\%}_{1cm}$ = 947), 248 ($A^{1\%}_{1cm}$ = 986), 277 ($A^{1\%}_{1cm}$ = 833) และ 330 นาโนเมตร ($A^{1\%}_{1cm}$ = 167)

จากข้อมูลอัลตราไวโอเลตสเปกตรัมของสารนี้ในเมทานอล ทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยวัดการดูดกลืนแสงในช่วง UV ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสม

2.3 <u>การกระจายตัวของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนระหว่างชั้นออกทานอลกับชั้นบัฟเฟอร์ที่ pH 1-7 และระหว่างชั้นเฮกเซนกับชั้นบัฟเฟอร์ที่ pH 1-7 ที่อุณหภูมิห้อง</u>

จากการทดลองหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนระหว่างชั้นออกทานอลกับชั้นบัฟเฟอร์ที่ pH 1-7 แสดงในตารางที่ 5 จะเห็นว่าค่า P ในช่วง pH 1-7 นี้มีค่าใกล้เคียงกันมาก และมีค่าสูง โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 27.99

ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนระหว่างชั้นเฮกเซนกับชั้นบัฟเฟอร์ที่ pH 1-7 แสดงในตารางที่ 6 จะเห็นว่าค่า P ในช่วง pH 1-7 นี้มีค่าใกล้เคียงกันเช่นเดียวกับค่า P ระหว่างชั้นออกทานอลกับชั้นบัฟเฟอร์ในช่วง pH นี้ แต่มีค่าต่ำกว่า โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.12

จากตารางที่ 5 และตารางที่ 6 จะเห็นว่าในช่วง pH 1-7 สารส่วนใหญ่จะเข้าไปอยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ โดยที่จะเข้าไปอยู่ในออกทานอลมากกว่าเฮกเซน ซึ่งจะเห็นได้จากค่า P ในช่วง pH 1-7 เมื่อใช้ออกทานอลจะมีค่าสูงถึง 27.99 แต่เมื่อใช้เฮกเซนมีค่าเพียง 2.12 เท่านั้น เมื่อพิจารณาจากโพลาริตีของตัวทำละลายอินทรีย์จะเห็นว่าออกทานอลเป็นตัวทำละลายที่มีโพลาริตีปานกลางส่วนเฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่มีโพลาริตีต่ำ (ค่า polarity index, P' ของออกทานอล = 3.4 และเฮกเซน = 0.1) (29) และจากคุณสมบัติการละลายของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในข้อ 2.1 ซึ่งละลายได้ในตัวทำละลายที่มีโพลาริตีปานกลาง แต่จะละลายได้น้อยมากจนถือว่าไม่ละลายในตัวทำละลายที่มีโพลาริตีต่ำ ดังนั้นสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน จึงชอบที่จะเข้าไปอยู่ในออกทานอลมากกว่าเฮกเซน นอกจากนี้ค่า P ในช่วง pH 1-7 มีค่าใกล้เคียงกันมาก น่าจะเป็นไปได้ว่าสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนไม่แตกตัว (Unionized) ในช่วง pH นี้ จึงกระจายตัวเข้าไปอยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มากกว่าชั้นน้ำ

จากผลการศึกษานี้อาจคาดคะเนไปถึงการซึมผ่านของสารผ่านผิวหนังได้ โดยที่ค่า P ระหว่างชั้นออกทานอลกับชั้นบัฟเฟอร์ที่ pH 7 มีค่าสูง แสดงว่า สาร 2-

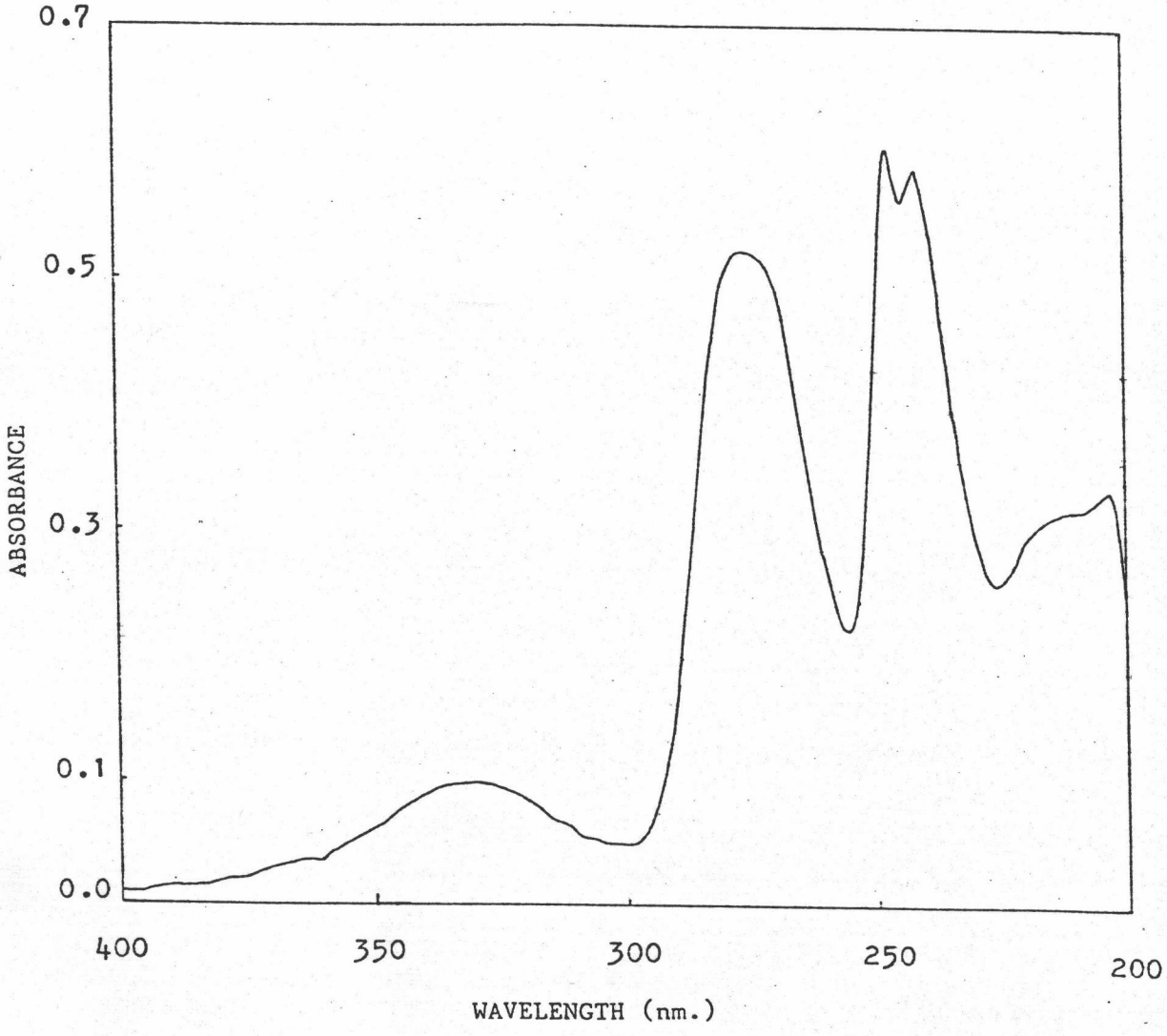
เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน อาจจะดูดซึมผ่านผิวหนังได้ดี [pH ของเซลล์โดยทั่วไปมีค่าประมาณ 7.0 (30)]

เนื่องจากสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนถูกไฮโดรไลซ์ในสารละลายด่างเจือจางเกิดเป็นสาร 2-ไฮดรอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน (8) จึงไม่สามารถหาค่า P ของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในภาวะด่างได้

ตารางที่ 4 ค่าการละลายของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ค่าการละลาย*	ตัวทำละลาย
Freely soluble	คลอโรฟอร์ม
Soluble	ไดเมทิลฟอร์มาไมด์, ไดคลอโรมีเทน
Sparingly soluble	แอซีโตไนไตรล์, เบนซีน, อะซีโทน, เอทิลอะซีเตท
Slightly soluble	โทลูอีน, เมทานอล, บิวทานอล, เอทานอล, ไอโซโพรพานอล, อีเทอร์, 0.1 โมลาร์ NaOH
very slightly soluble	ไซโคลเฮกเซน, เฮกเซน
Practically insoluble or insoluble	0.1 โมลาร์ HCl, น้ำ

*ค่าการละลายของสารกำหนดตาม USP XXI (13)



รูปที่ 5 UV สเปกตรัมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน (ในเมทานอล)
ความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน = 6.0 มคก./มล.

ตารางที่ 5 ผลการทดลองหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (P) ที่อุณหภูมิห้องของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนระหว่างชั้นออกทานอลกับชั้นบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆ

pH	ความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน[n] (มคก./มล.)		P[*]
	ชั้นออกทานอล	ชั้นบัฟเฟอร์	
1.6	5.87	0.21	27.95
4.0	5.86	0.22	26.64
5.0	5.87	0.21	27.95
7.0	5.88	0.20	29.40

[n] ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ครั้ง (n = 2)

[*] $P = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารในชั้นออกทานอล}}{\text{ความเข้มข้นของสารในชั้นบัฟเฟอร์}}$

ตารางที่ 6 ผลการทดลองหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (P) ที่อุณหภูมิห้องของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนระหว่างชั้นเฮกเซนกับชั้นบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆ

pH	ความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน[n] (มคก./มล.)		p[*]
	ชั้นเฮกเซน	ชั้นบัฟเฟอร์	
1.6	4.12	1.96	2.10
4.0	4.12	1.96	2.10
5.0	4.16	1.92	2.17
7.0	4.12	1.96	2.10

[n] ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ครั้ง (n = 2)

[*] $P = \frac{\text{ความเข้มข้นของสารในชั้นเฮกเซน}}{\text{ความเข้มข้นของสารในชั้นบัฟเฟอร์}}$

ส่วนที่ 3 การหาสภาวะการทดลองทางโครมาโทกราฟีของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอล

3.1 การเลือกโมบายเฟสที่เหมาะสม

ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอล (ความเข้มข้น 0.40 มคก./มล.) เมื่อใช้โมบายเฟสเป็นสารผสมของเมทานอลกับน้ำ, เมทานอลกับอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 1×10^{-2} โมลาร์ และเมทานอลกับอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในอัตราส่วน 75:25 (ปริมาตร/ปริมาตร) มีรูปร่างที่ใกล้เคียงกันมากและมีลักษณะโครมาโทแกรมที่ดีคือ ให้พีคของสารที่มีความสมมาตร, แคบ (sharp) และไม่เกิดพีคเทลลิง (peak tailing) เนื่องจากสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนจะถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่ายในสารละลายด่างเจือจาง (8) ดังนั้นโมบายเฟสที่ใช้จึงต้องควบคุม pH ให้อยู่ในช่วงกรดเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาของสาร จากผลการทดลองเมื่อควบคุม pH โดยใช้อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ในความเข้มข้นต่างกันไม่มีผลต่อรูปร่างของโครมาโทแกรมและคุณสมบัติการรีเทนของสาร ดังนั้นเพื่อเป็นการยืดระยะเวลาการใช้งานของคอลัมน์ จึงเลือกใช้โมบายเฟสที่เป็นสารผสมของเมทานอลกับอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนต่อไป

3.2 การศึกษาทดลองเพื่อเลือกอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (IS) ที่เหมาะสม

การศึกษาทดลองเพื่อเลือกสารที่อยู่ในข่ายที่จะใช้เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ซึ่งได้แก่ 2-เมทิล-1,4-เนฟโทควิโนน (IS_1), 2-ไฮดรอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน (IS_2) และ 1,4-เนฟโทควิโนน (IS_3) โดยพิจารณาจากค่า capacity factor (k') และค่า selectivity (α) ของสารเหล่านี้เทียบกับ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน เมื่อใช้อัตราส่วนโมบายเฟส (เมทานอล : อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์) ต่าง ๆ กัน โดยคำนวณค่า capacity factor และ selectivity จากค่า retention time ซึ่งได้จากการทดลอง ดังแสดงในตาราง 7, ตาราง 8 และ ตาราง 9 (ในตาราง 9 ไม่ได้แสดงค่า selectivity เนื่องจากค่า retention time ของสาร IS_3 และ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน มีค่าใกล้เคียงกันมากในทุกอัตราส่วนของโมบายเฟสคือ มีค่าต่างกันน้อยกว่า 0.3 นาที ดังนั้นใน

การทดลองครั้งนี้จึงไม่ได้ทำการทดลองฉีดสารผสมของ IS_3 กับ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนเข้า HPLC โดยทำการฉีดเฉพาะสารละลายของ IS_3 หรือ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอลเดี่ยว ๆ เท่านั้น)

ค่า k' เป็นค่าที่แสดงถึงคุณสมบัติการรีเทนอยู่ในคอลัมน์ของสาร ซึ่งค่านี้สามารถเปลี่ยนแปลงได้ง่ายโดยการเปลี่ยน solvent strength ของโมบายเฟส ซึ่งทำได้โดยการปรับอัตราส่วนของโมบายเฟสที่ใช้ตามทฤษฎี ค่า k' ที่ดีควรอยู่ระหว่าง 1-10 (31)

ค่า α เป็นค่าที่สามารถแสดงถึงการแยกของพีคของสารสองชนิดที่อยู่ติดกัน ซึ่งส่วนประกอบของโมบายเฟสจะมีผลต่อค่า α มากกว่าอัตราส่วนของโมบายเฟส อย่างไรก็ตามในการปรับอัตราส่วนของโมบายเฟสจะทำให้ค่า k' ของสารเปลี่ยนแปลง ซึ่งจะมีผลทำให้ค่า α เปลี่ยนแปลงด้วย การแยกของสารจะเกิดขึ้นได้ในเวลาที่เหมาะสม ค่า α ต้องมีค่ามากกว่า 1 แต่ไม่เกิน 3 (32)

จากตารางที่ 7, ตารางที่ 8 และตารางที่ 9 จะเห็นว่าในอัตราส่วนโมบายเฟส 75:25 เมทานอล : อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ สาร IS_1 มีค่า k' และ α ที่เหมาะสมที่สุดในการใช้เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด ในขณะที่สาร IS_2 มีค่า k'ต่ำมากใกล้เคียงศูนย์ (0.03) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร IS_2 ไม่มีคุณสมบัติการรีเทนอยู่ในคอลัมน์เมื่อใช้การแยกแบบรีเวิรสเฟสนี้ นอกจากนี้ค่า α ก็มีค่าสูงเกินไป ส่วนสาร IS_3 มีค่า k' ใกล้เคียงกับสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนมาก การแยกของสาร ทั้งสองจึงไม่เกิดขึ้น ดังนั้นสาร IS_2 และ IS_3 จึงไม่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการใช้เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาที่อัตราส่วนโมบายเฟสอื่น ๆ คือ 70:30, 65:35 และ 60:40 ก็เป็นการยืนยันที่แน่นอนว่าสาร IS_1 เป็นสารที่เหมาะสมที่สุดในการใช้เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดสำหรับการวิเคราะห์ครั้งนี้ โดยที่ค่า k' และ α ของ IS_1 อยู่ในช่วงที่เหมาะสมในทุกอัตราส่วนของโมบายเฟส (ตารางที่ 7) ในขณะที่สาร IS_2 มีค่า k' เท่ากันในทุกอัตราส่วนของโมบายเฟส และมีค่าต่ำมาก (ตาราง 8) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร IS_2 ไม่มีคุณสมบัติการรีเทนอยู่ในคอลัมน์ชนิดนี้ ลักษณะโครมาโทแกรมของสารผสม IS_2 และ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน แสดงในรูปที่ 7 ส่วนสาร IS_3 มีค่า k' ใกล้เคียงกับสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในทุกอัตราส่วนของโมบายเฟส (ตาราง 9) การแยกของสารทั้งสองจึงไม่เกิดขึ้น ดังนั้น

สาร IS_2 และ IS_3 จึงไม่สามารถใช้เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดสำหรับการวิเคราะห์ครั้งนี้ได้

การแยกของสาร IS_1 และ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน เกิดขึ้นได้สมบูรณ์เมื่อใช้อัตราส่วนโมบายเฟสเป็น 65:35 หรือ 60:40 แต่เพื่อประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ โมบายเฟสที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอลคือ เมทานอล : อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในอัตราส่วน 65:35 ลักษณะโครมาโทแกรมของสาร IS_1 และ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนเมื่อใช้อัตราส่วนโมบายเฟสต่างๆ แสดงในรูปที่ 6

3.3 ช่วงความเข้มข้นของการวิเคราะห์ที่เป็นไปตามกฎของเบียร์

จากการทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอลกับการตอบสนองของดีเทกเตอร์ โดยการวัดอัตราส่วนพื้นที่พีคของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนต่อพื้นที่พีคของ IS_1 ตามสภาวะการทดลองในข้อ 3.3 หน้า 20 ได้ความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงซึ่งเป็นไปตามกฎของเบียร์ในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษาคือ 0.08-1.60 มคก./มล. ดังแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งจากการหาความสัมพันธ์โดยใช้ Linear regression สมการของเส้นตรงที่ได้คือ $y = 0.6792x + 0.0678$ เมื่อ y เป็นอัตราส่วนพื้นที่พีคของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนต่อ IS_1 และ x เป็นความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอล ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) เป็น 0.9982

ตารางที่ 7 Retention times, Capacity factors และ Selectivity ของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ในเมทานอลความเข้มข้น 0.40 และ 0.80 มคก./มล. ตามลำดับ เมื่อใช้โมบายเฟสเป็นสารผสมของเมทานอลกับอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในอัตราส่วนต่าง ๆ

อัตราส่วนเมทานอล: อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0	Retention times (min)		Capacity factors (k')		Selectivity (α)
	2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน	IS_1	2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน	IS_1	
75:25	4.12	4.93	1.29	1.74	1.35
70:30	4.51	5.65	1.50	2.14	1.43
65:35	4.99	6.59	1.77	2.66	1.50
60:40	5.78	8.52	2.21	3.73	1.69

IS_1 = 2-เมทิล-1,4-เนฟโทควิโนน

Capacity factor (k') = $(t_R - t_0)/t_0$

Selectivity (α) = k'_2 / k'_1

t_R = retention time ของสาร

t_0 = retention time ของ unretained solute สำหรับสภาวะการทดลองนี้ มีค่า = 1.80 นาที

สภาวะการทดลองดูหน้า 18-19

ตารางที่ 8 Retention times, Capacity factors และ Selectivity ของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_2 ในเมทานอลความเข้มข้น 0.40 และ 1.60 มคก./มล. ตามลำดับ เมื่อใช้โมบายเฟสเป็นสารผสมของเมทานอลกับอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในอัตราส่วนต่าง ๆ

อัตราส่วนเมทานอล: อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0	Retention times (min)		Capacity factors (k')		Selectivity (α)
	2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน	IS_2	2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน	IS_2	
75:25	4.12	1.85	1.29	0.03	43.00
70:30	4.51	1.85	1.50	0.03	50.00
65:35	4.99	1.86	1.77	0.03	59.00
60:40	5.78	1.86	2.21	0.03	73.67

IS_2 = 2-ไฮดรอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน

t_0 สำหรับสภาวะการทดลองนี้ = 1.80 นาที

สภาวะการทดลองเหมือนตาราง 7

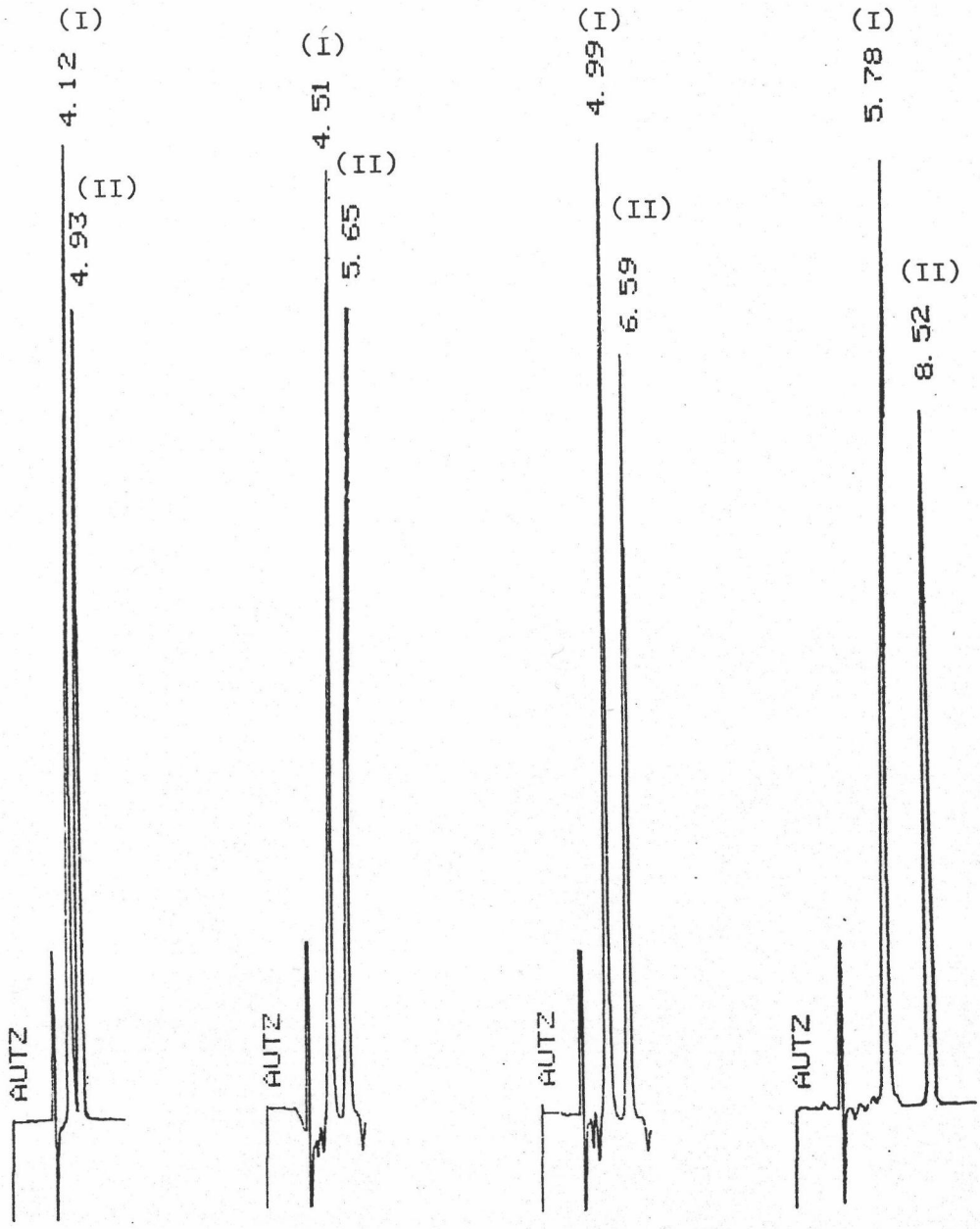
ตารางที่ 9 Retention times และ Capacity factors ของสาร 2-เมทอกซี-1, 4-เนฟโทควิโนน (0.40 มคก./มล. ในเมทานอล) และ IS (0.80 มคก./มล. ในเมทานอล) เมื่อใช้โมบายเฟสเป็นสารผสมของเมทานอลกับอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในอัตราส่วนต่าง ๆ

อัตราส่วนเมทานอล: อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0	2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน		IS_s	
	retention times (min)	capacity factors (α)	retention times (min)	capacity factors (α)
75:25	4.12	1.29	4.17	1.32
70:30	4.51	1.50	4.64	1.58
65:35	4.99	1.77	5.12	1.84
60:40	5.78	2.21	5.92	2.29

IS_s = 1,4-เนฟโทควิโนน

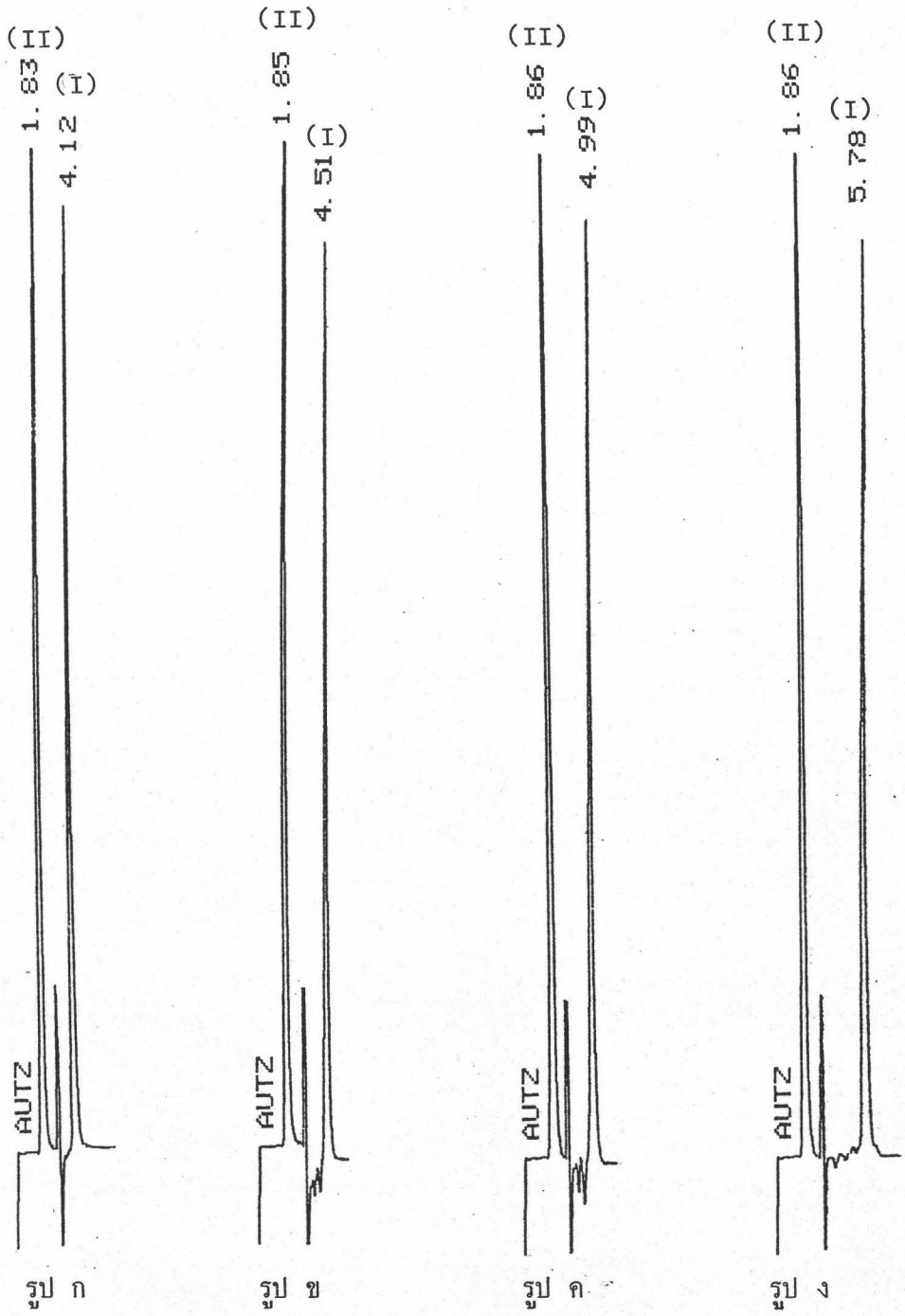
t_0 สำหรับสภาวะการทดลองนี้ = 1.80 นาที

สภาวะการทดลองเหมือน ตาราง 7

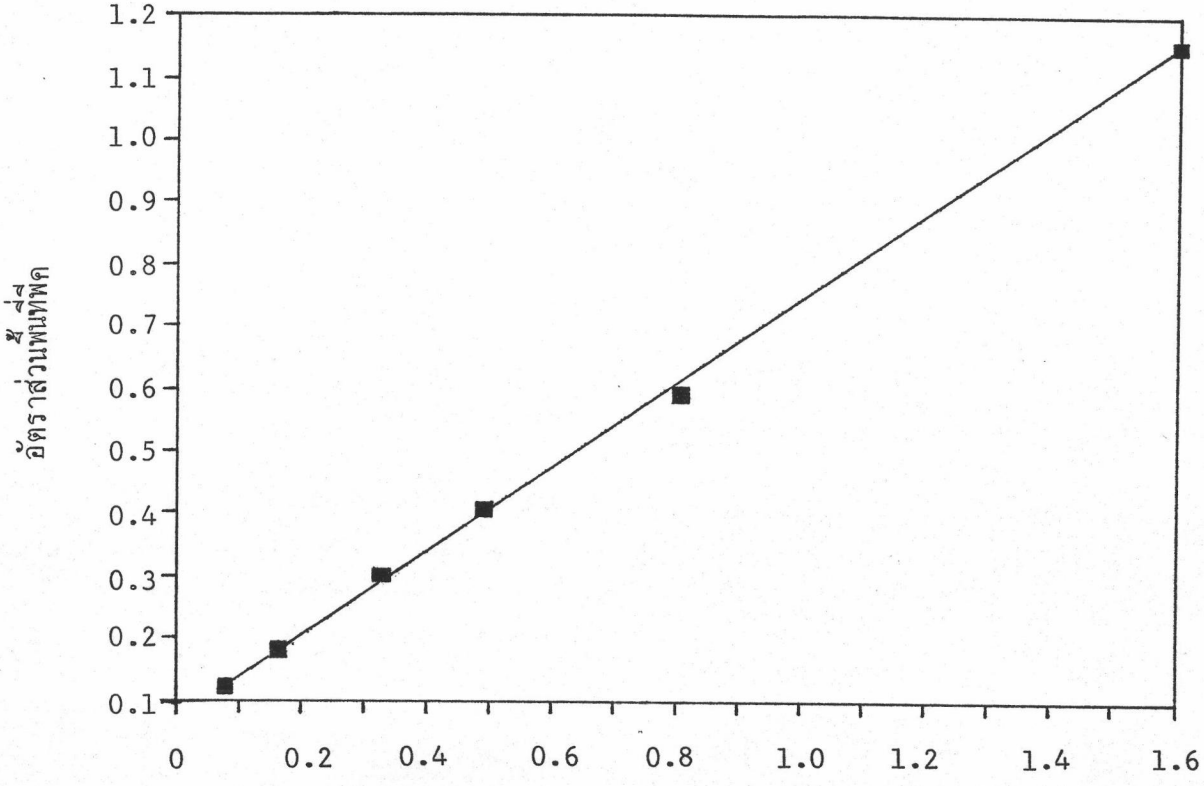


รูป ก รูป ข รูป ค รูป ง

รูปที่ 6 โครมาโทแกรมของสารผสม 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ในเมทานอล เมื่อใช้โมบายเฟสเป็นสารผสมของเมทานอลกับอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในอัตราส่วน 75:25 (ก), 70:30 (ข), 65:35 (ค) และ 60:40 (ง)
ความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 เป็น 0.40 และ 0.80 มคก./มล. ตามลำดับ สภาวะการทดลองอื่น ๆ แสดงในหน้า 18-19
พีค I = 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน, พีค II = IS_1



รูปที่ 7 โครมาโทแกรมของสารผสม 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ในเมทานอล เมื่อใช้โมบายเฟสเป็นสารผสมของเมทานอลกับอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในอัตราส่วน 75:25 (ก), 70:30 (ข), 65:35 (ค) และ 60:40 (ง)
ความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_2 เป็น 0.40 และ 1.60 มคก./มล. ตามลำดับ สภาวะการทดลองอื่น ๆ เหมือนรูปที่ 6
พีค I = 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน, พีค II = IS_2



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่พีคของสาร 2-เมทอกซี-1, 4-เนฟโทควิโนน ต่อ IS_1 กับความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1, 4-เนฟโทควิโนน ในเมทานอล

สมการของเส้นตรงคือ $y = 0.6792x + 0.0678$

$r^2 = 0.9982$

ส่วนที่ 4 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา

4.1 การพัฒนาวิธีการแยก 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนออกจากพลาสมา

4.1.1 การแยกสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนและ IS_1 ออกจากพลาสมาโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย

ผลการทดลองเปรียบเทียบการใช้คลอโรฟอร์มและเอทิลอะซีเตทเป็นตัวทำละลายในการสกัดสารออกจากพลาสมา แสดงในตาราง 10 และลักษณะของโครมาโทแกรมที่ได้แสดงในรูปที่ 9 จะเห็นว่าลักษณะโครมาโทแกรมของสารไม่มีการรบกวนของ endogenous substance ไม่ว่าจะทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มหรือเอทิลอะซีเตท แต่เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสารเมื่อทำการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทมีค่าสูงกว่าเมื่อสกัดด้วยคลอโรฟอร์มมาก โดยค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน เมื่อทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม มีค่าเฉลี่ยเพียง 79.20 ± 2.77 $(n = 4)$ ในขณะที่เมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทจะมีค่าเฉลี่ยสูงถึง 89.37 ± 0.44 $(n = 4)$ และเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร IS_1 เมื่อทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีค่าเฉลี่ยเพียง 14.54 ± 0.66 $(n = 4)$ แต่เมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทจะมีค่าเฉลี่ยถึง 46.48 ± 0.49 $(n = 4)$ ดังนั้นเอทิลอะซีเตทจึงเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมกว่าคลอโรฟอร์มในการสกัดสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนและ IS_1 ออกจากพลาสมา นอกจากนี้เมื่อพิจารณาจากขั้นตอนการทำและระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดต่อหนึ่งตัวอย่าง การสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทยังสามารถทำได้ง่ายและเสียเวลาน้อยกว่าการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มมาก

4.1.2 การแยกสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ออกจากพลาสมาโดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีน

ผลการทดลองเปรียบเทียบการแยกสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนและ IS_1 ออกจากพลาสมาโดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลและเมทานอลร่วมกับ ซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ แสดงในตารางที่ 11 และลักษณะของโครมาโทแกรมที่ได้แสดงในรูปที่ 10 จะเห็นว่าลักษณะโครมาโทแกรมของสารเมื่อทำการแยกโดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลเพียงอย่างเดียวและเมื่อทำการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลร่วมกับ ซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ

โครมาโทแกรมของสารที่ได้ไม่มีการรบกวนของ endogenous substance ที่มีอยู่ในพลาสมา เมื่อพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร จะเห็นว่าเมื่อทำการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลร่วมกับ ซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนและ IS_1 สูงกว่าการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลเพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 11) ดังนั้นการแยกสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ออกจากพลาสมาโดยวิธีตกตะกอนพลาสมาโปรตีน การใช้เมทานอลร่วมกับซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำเป็นสารตกตะกอนพลาสมาโปรตีนจะสามารถแยกสารได้ดีกว่าการใช้เมทานอลเพียงอย่างเดียวเป็นสารตกตะกอนพลาสมาโปรตีน นอกจากนี้การใช้เมทานอลร่วมกับ ซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ ยังสามารถทำได้ง่าย, ขั้นตอนการทำไม่ยุ่งยากและเสียเวลาในการสกัดต่อหนึ่งตัวอย่างน้อยกว่าการใช้เมทานอลเพียงอย่างเดียว โดยที่การตกตะกอนของพลาสมาโปรตีนที่เกิดจากเมทานอลเกิดขึ้นช้า จึงต้องตั้งสารผสมไว้นานถึง 30 นาที เพื่อให้การตกตะกอนพลาสมาโปรตีนเกิดขึ้นได้ดี นอกจากนี้ตะกอนพลาสมาโปรตีนที่เกิดขึ้นเป็นตะกอนเบาจึงต้องใช้เวลาในการหมุนเหวี่ยงเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามสารละลายส่วนบนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงยังคงขุ่น จึงต้องนำมากรองผ่านมิลลิพอร์ฟิลเตอร์ (millipore filter) เพื่อให้ได้สารละลายใสที่สามารถฉีดเข้า HPLC ได้

เมื่อเปรียบเทียบผลการแยกสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน โดยวิธีสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท และโดยวิธีตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลร่วมกับ ซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ พิจารณาจากลักษณะโครมาโทแกรม (รูปที่ 9ค.,9ง. รูปที่ 10ค. และ 10ง.) จะเห็นว่าวิธีการแยกสารทั้งสองวิธีนี้ให้ โครมาโทแกรมที่ไม่มีการรบกวนของ endogenous substance เช่นเดียวกัน เมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 เมื่อทำการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทมีค่าเฉลี่ย 89.37 และ 46.48% ตามลำดับ และเมื่อทำการแยกสารโดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลร่วมกับ ซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ มีค่าเฉลี่ย 87.98 และ 100.2% ตามลำดับ จะเห็นว่าค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ที่ได้จาก 2 วิธีนี้มีค่าใกล้เคียงกันมากและมีค่าสูง แต่การแยกสารโดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลร่วมกับ ซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ ยังให้ค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร IS_1 สูงด้วย ดังนั้น วิธีที่ดีในการแยกสารออกจากพลาสมาในครั้งนี้ทำได้โดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลร่วมกับ ซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาจากขั้นตอนวิธีการทำและเวลาที่ใช้ในการสกัดต่อหนึ่งตัวอย่าง (ตารางที่ 10 และตารางที่ 11) แล้ว จะเห็นว่าการแยกสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 โดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลร่วมกับซิงค์ซัลเฟต

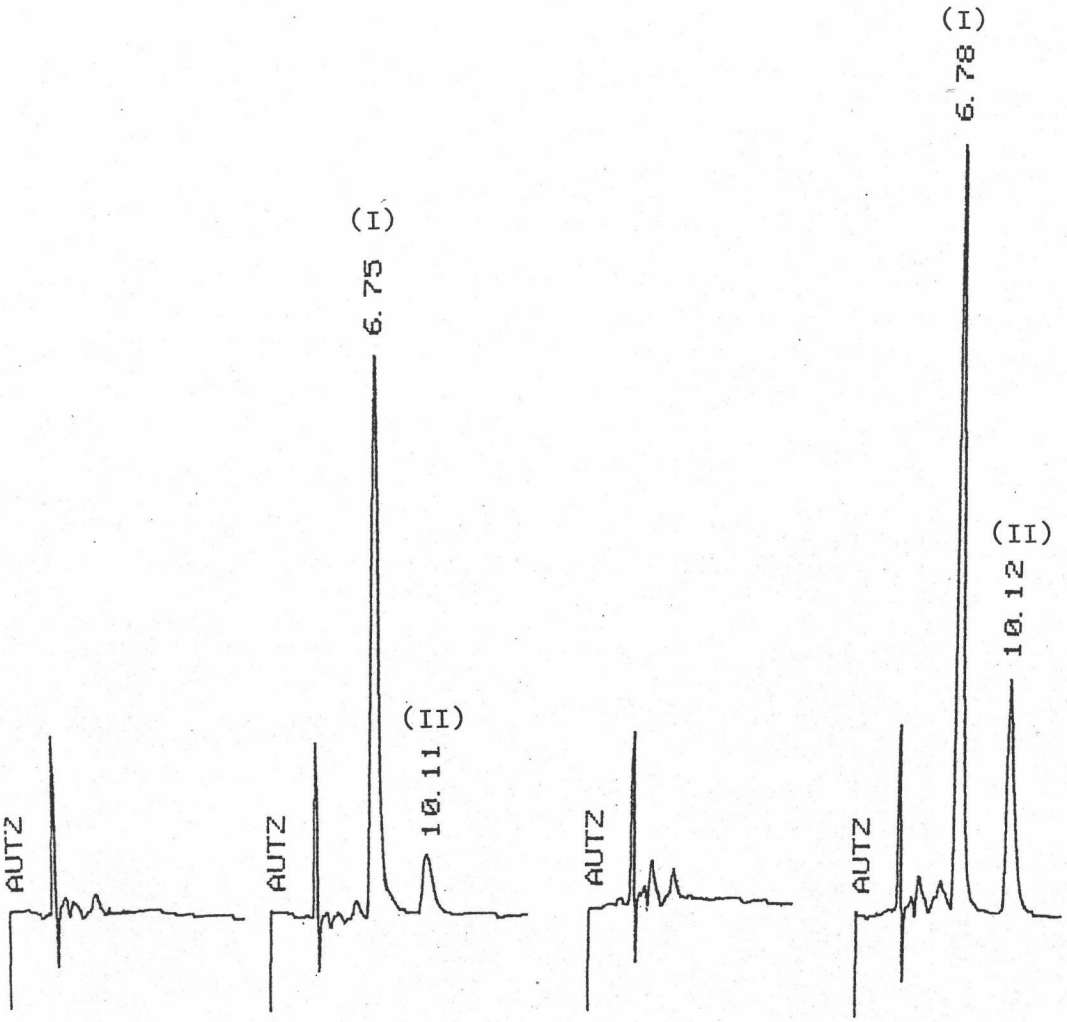
10% ในน้ำ มีขั้นตอนการทำไม่ยุ่งยาก และเสียเวลาในการทำน้อยกว่าการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ดังนั้นการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลร่วมกับซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ จึงเป็นวิธีที่ดีในการแยกสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ออกจากพลาสมา

ตารางที่ 10 การแยกสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนและ IS_1 ออกจากพลาสมาโดยการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเอทิลอะซีเตท

หัวข้อ	ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	
	คลอโรฟอร์ม	เอทิลอะซีเตท
1. ลักษณะ (Appearance)	เมื่อหมุนเหวี่ยงที่ 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ชั้นพลาสมาโปรตีนยังอัดกันไม่แน่น ชั้นคลอโรฟอร์มซึ่งอยู่ส่วนล่างของหลอดทดลองขุ่นเล็กน้อย เมื่อหมุนเหวี่ยงต่ออีก 15 นาที ชั้นพลาสมาโปรตีนจะอัดแน่นเข้าทำให้ชั้นคลอโรฟอร์มใส	เมื่อหมุนเหวี่ยงที่ 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที พลาสมาโปรตีนจะอัดกันแน่นอยู่ก้นหลอดทดลอง ส่วนชั้นเอทิลอะซีเตทจะอยู่ส่วนบนลักษณะใส, ไม่มีสี
2.ปริมาตรชั้นตัวทำละลาย	~ 1.3 มล.	~ 1.5 มล.
3. เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร (n=4)	2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน = 79.20 $\pm$ 2.77 IS_1 = 14.54 $\pm$ 0.66	2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน = 89.37 $\pm$ 0.44 IS_1 = 46.48 $\pm$ 0.49
4. ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดต่อหนึ่งตัวอย่าง	~ 60 นาที	~ 45 นาที
5. ลักษณะโครมาโทแกรม	- ไม่มีการรบกวนของ endogenous substance - ลักษณะของพีคเกิดเป็นหาง (tail) เล็กน้อย	- ไม่มีการรบกวนของ endogenous substance - ลักษณะของพีคค่อนข้างสมมาตร

ตารางที่ 11 การแยกสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนและ IS_1 ออกจากพลาสมาโดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล และเมทานอลร่วมกับซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ

หัวข้อ	สารตกตะกอนพลาสมาโปรตีน	
	เมทานอลร่วมกับซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ	เมทานอล
1. ลักษณะ (Appearance)	เมื่อหมุนเหวี่ยงที่ 2000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ส่วนของพลาสมาโปรตีนจะอัดแน่นอยู่ก้นหลอดทดลอง สารละลายส่วนบนใส, สีเหลืองอ่อน สามารถฉีดเข้า HPLC ได้เลย	ต้องใช้เวลาในการหมุนเหวี่ยงที่ 2000 รอบ/นาที นานถึง 30 นาที จึงได้สารละลายส่วนบนที่ใสขึ้น สีเหลืองอ่อน ซึ่งต้องกรองผ่าน มิลลิพอร์ ฟิลเตอร์ จึงได้สารละลายใสที่สามารถฉีดเข้า HPLC ได้ ส่วนของพลาสมาโปรตีนอยู่ก้นหลอดทดลองลักษณะตะกอนอัดแน่นน้อยกว่าเมื่อใช้เมทานอลร่วมกับซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ
2. ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดต่อหนึ่งตัวอย่าง	~ 20 นาที	~ 50 นาที
3. เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร (n = 4)	2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน = 87.98 $\pm$ 7.89 IS_1 = 100.2 $\pm$ 8.60	2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน = 75.54 $\pm$ 8.16 IS_1 = 15.49 $\pm$ 2.00
4. ลักษณะโครมาโทแกรม	- ไม่มีการรบกวนของ endogenous substance - ลักษณะพีคแคบและสมมาตร	- ไม่มีการรบกวนของ endogenous substance - ลักษณะพีคแคบและค่อนข้างสมมาตร



รูป ก รูป ข รูป ค รูป ง

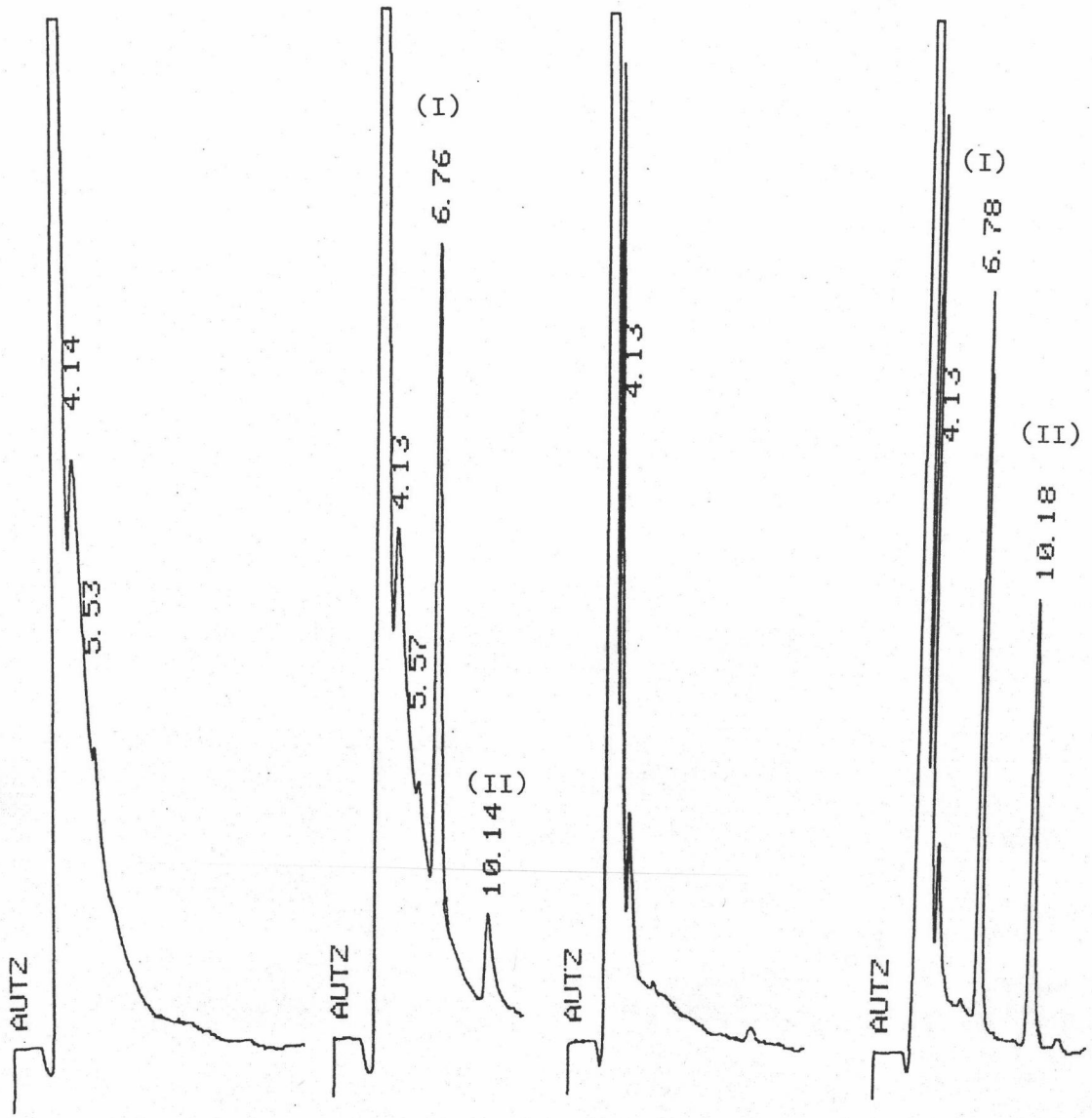
รูปที่ 9 โครมาโทแกรมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน (พีค I) และ IS_1 (พีค II) เมื่อทำการสกัดออกจากพลาสมา โดยใช้คลอโรฟอร์มและเอทิลอะซีเตท

รูป ก., ข. เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่ไม่มีสาร (plasma blank), และพลาสมาที่มี 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน กับ IS_1 ตามลำดับ เมื่อทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

รูป ค.,ง. เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่ไม่มีสาร, และพลาสมาที่มี 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน กับ IS_1 ตามลำดับ เมื่อทำการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท

ความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา = 8.0 มคก./มล.

ความเข้มข้นของสาร IS_1 ในพลาสมา = 8.0 มคก./มล.



รูป ก รูป ข รูป ค รูป ง

รูปที่ 10 โครมาโทแกรมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน (พีค I) และ IS_1 (พีค II) เมื่อทำการแยกออกจากพลาสมาโดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลและเมทานอลร่วมกับซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ

รูป ก., ข. เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่ไม่มีสาร, และพลาสมาที่มี 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน กับ IS_1 ตามลำดับ เมื่อตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอล

รูป ค., ง. เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่ไม่มีสาร และพลาสมาที่มี 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน กับ IS_1 ตามลำดับ เมื่อตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลร่วมกับซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ

ความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา = 8.0 มคก./มล.

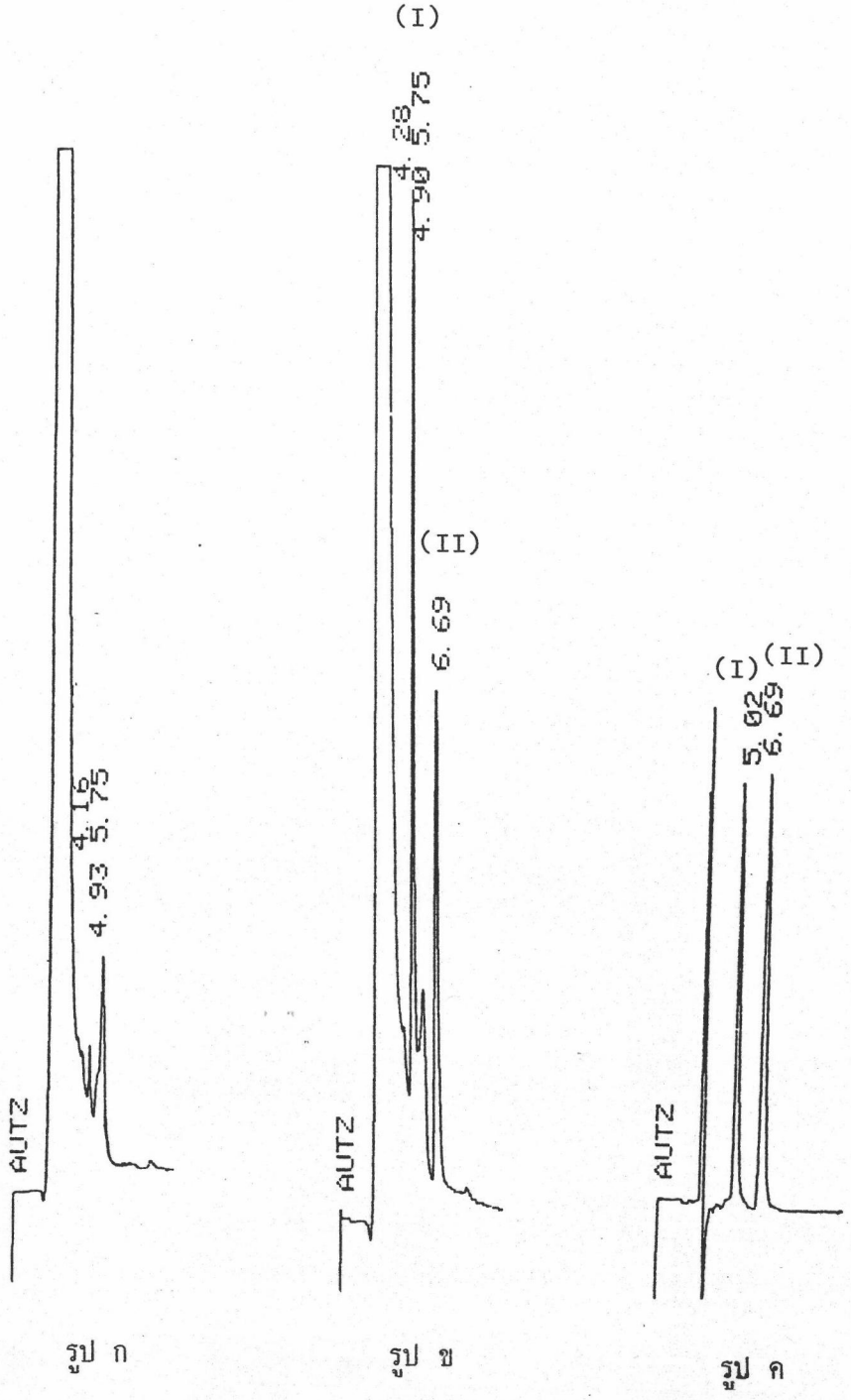
ความเข้มข้นของสาร IS_1 ในพลาสมา = 8.0 มคก./มล.

4.2 การปรับสภาวะการทดลองทางโครมาโทกราฟี จากข้อ 3 เพื่อใช้ในการหาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนและ IS_1 ในพลาสมา

ผลการทดลองปรับสภาวะการทดลองทางโครมาโทกราฟี โดยการปรับอัตราส่วนของโมบายเฟส เพื่อให้ได้วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่ดีที่สุดเมื่อใช้สาร IS_1 เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด แสดงในรูปที่ 11,12, 13 และตาราง 12 จะเห็นว่าในทุกอัตราส่วนของเมทานอลต่ออะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ที่ใช้เป็นโมบายเฟส สาร endogenous substance จะถูกชะออกมาจากคอลัมน์หมดภายในเวลาประมาณ 6 นาที โดยให้พีคของ endogenous substance ในเวลาใกล้เคียงกันในทุกอัตราส่วนโมบายเฟส คือ ที่เวลาประมาณ 4.0, 5.0 และ 5.8 นาที (รูปที่ 11ก, 12ก, 13ก) ดังนั้นเพื่อให้สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนและสาร IS_1 แยกออกจาก endogenous substance ได้อย่างสมบูรณ์ สารทั้งสองควรจะมีการรีเทนอยู่ในคอลัมน์เป็นเวลานานกว่า 6 นาที จากการทดลองเมื่อใช้อัตราส่วนโมบายเฟสเป็น 65:35 สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 จะใช้เวลารีเทนอยู่ในคอลัมน์นาน 5.02 และ 6.69 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 11ค และตารางที่ 12) ซึ่งพีคของ endogenous substance จะรบกวนพีคของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และพีคของ IS_1 บางส่วนดังแสดงในรูปที่ 11ก และ 11ข

เมื่อใช้อัตราส่วนโมบายเฟสเป็น 60:40 สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนและ IS_1 ใช้เวลาในการรีเทนอยู่ในคอลัมน์นาน 5.88 และ 8.45 นาทีตามลำดับ (รูปที่ 12ค และ ตารางที่ 12) ซึ่งพีคของ endogenous substance จะรบกวนพีคของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน เล็กน้อย และไม่รบกวนพีคของสาร IS_1 ดังแสดงในรูปที่ 12ก และ 12ข โดยที่พีคของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนจะซ้อนอยู่กับพีคของ endogenous substance พอดี

เมื่อใช้อัตราส่วนโมบายเฟสเป็น 55:45 สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ใช้เวลาในการรีเทนอยู่ในคอลัมน์นาน 6.78 และ 10.18 นาที ตามลำดับ (รูปที่ 13ค และ ตารางที่ 12) ซึ่งพีคของ endogenous substance ไม่รบกวนพีคของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 เลย ดังแสดงในรูป 13ก และ 13ข. นั่นคือเกิดการแยกที่สมบูรณ์ระหว่าง endogenous substance, สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และสาร IS_1 ดังนั้นอัตราส่วนโมบายเฟส 55:45 เมทานอลต่ออะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 จึงเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาในครั้งนี้



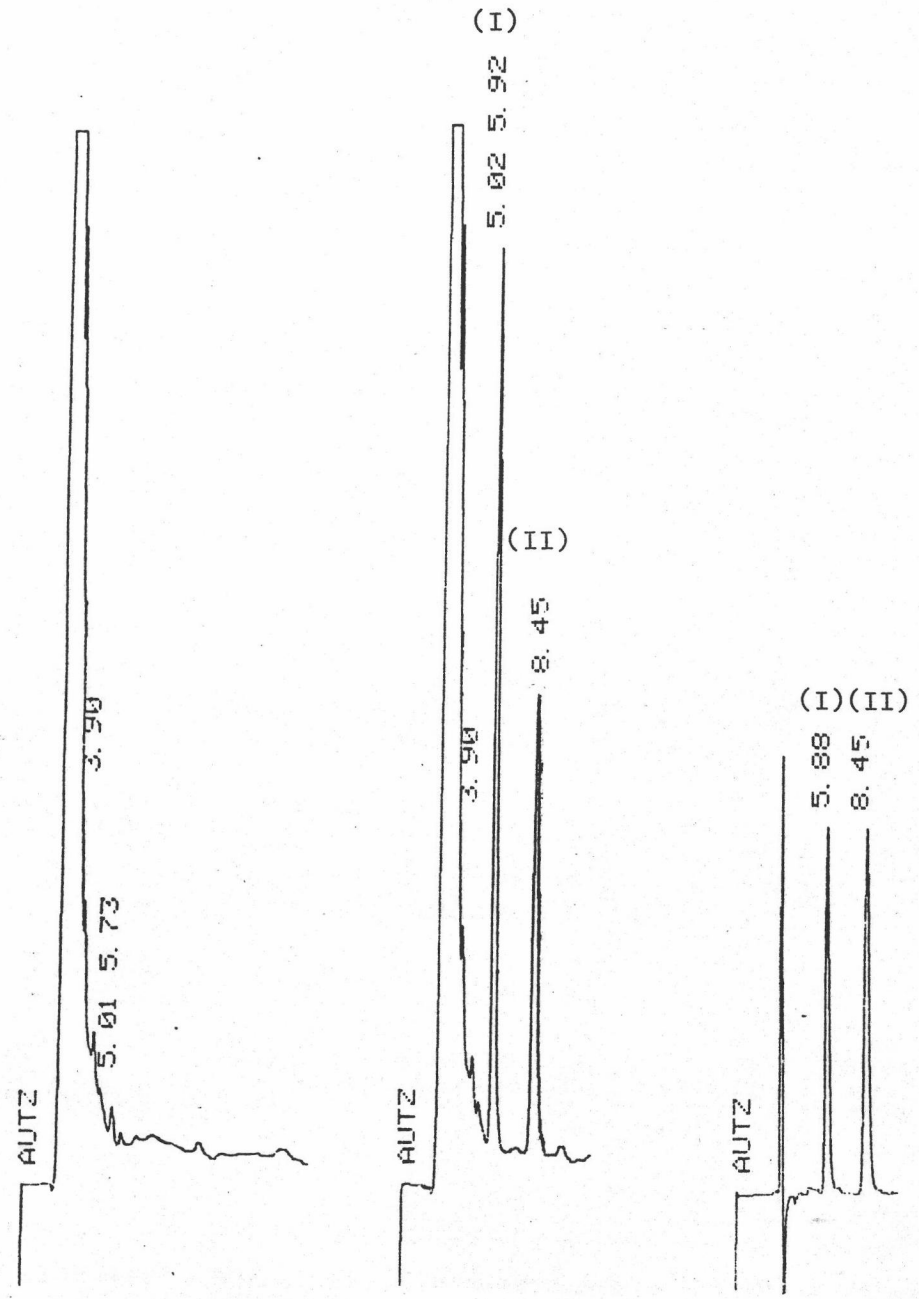
รูป ก รูป ข รูป ค

รูปที่ 11 โครมาโทแกรมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน (พีค I) และ IS_1 (พีค II) ในพลาสมา เมื่อใช้โมบายเฟสเป็นเมทานอล : อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในอัตราส่วน 65:35 และตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลร่วมกับซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ

รูป ก. เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่ไม่มีสาร (plasma blank)

รูป ข. เป็นโครมาโกทแกรมของพลาสมาที่เติมสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1

รูป ค. เป็นโครมาโทแกรมของสารร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ในเมทานอล



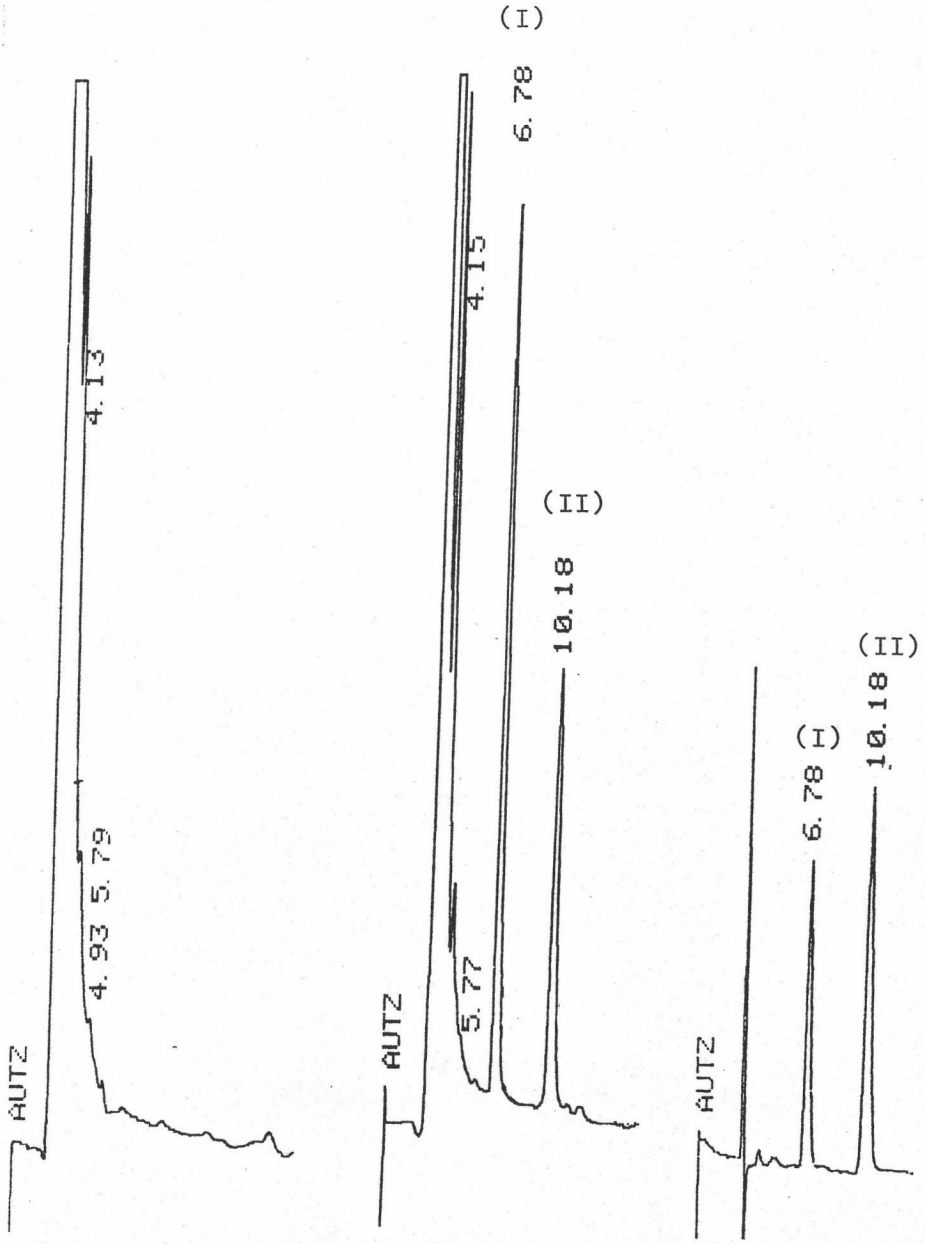
รูป ก รูป ข รูป ค

รูปที่ 12 โครมาโทแกรมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน (พีค I) และ IS_1 (พีค II) ในพลาสมา เมื่อใช้โมบายเฟสเป็นเมทานอล : อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในอัตราส่วน 60:40 และตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลร่วมกับซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ

รูป ก. เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่ไม่มีสาร (plasma blank)

รูป ข. เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่เติมสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1

รูป ค. เป็นโครมาโทแกรมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ในเมทานอล



รูป ก รูป ข รูป ค

รูปที่ 13 โครมาโทแกรมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน (พีค I) และ IS_1 (พีค II) ในพลาสมา เมื่อใช้โมบายเฟสเป็นเมทานอล : อะซีเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในอัตราส่วน 55:45 และตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลร่วมกับซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ

รูป ก. เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่ไม่มีสาร (plasma blank)

รูป ข. เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่เติมสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1

รูป ค. เป็นโครมาโทแกรมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ในเมทานอล

ตารางที่ 12 Retention times ของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน, IS_1 และ endogenous substance เมื่อใช้โมบายเฟสเป็นสารผสมของเมทานอลกับอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในอัตราส่วนต่าง ๆ และแยกสารออกจากพลาสมา โดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลร่วมกับซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ

สาร	Retention time (min) ที่อัตราส่วนโมบายเฟสต่างๆ		
	65:35	60:40	55:45
endogenous substances	4.16, 4.93, 5.75	3.90, 5.01, 5.73	4.13, 4.98, 5.79
2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน	5.02	5.88	6.78
IS_1	6.69	8.45	10.18

4.3 ขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ที่จะสามารถวิเคราะห์ปริมาณที่น้อยที่สุดของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา

ค่าขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ที่จะสามารถวิเคราะห์ปริมาณที่น้อยที่สุดของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่ได้จากการทดลองนี้ เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่ให้อัตราส่วนสัญญาณการตอบสนองของดีเทกเตอร์ของสารต่อสัญญาณรบกวนปกติ (S/N ratio) ไม่น้อยกว่า 2:1

จากการทดลองเมื่อใช้ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่จะให้ค่าอัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 คือ 0.20 มคก./มล. (S/N เฉลี่ย = 2.9) ดังแสดงในตารางที่ 13 ซึ่งในความเข้มข้นดังกล่าว ถ้าเปลี่ยนความยาวคลื่นในการวิเคราะห์หาปริมาณสารเป็น 275 นาโนเมตร ปรากฏว่าค่าอัตราส่วน S/N เฉลี่ยจะสูงถึง 4.7 (ตารางที่ 13) ซึ่งแสดงว่าที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร มีความไวในการตรวจหาสารได้ดีกว่าที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ซึ่งจากการใช้ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตรในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร ความเข้มข้นต่ำสุดที่จะให้อัตราส่วน S/N มากกว่า 2:1 เป็น 0.10 มคก./มล. (S/N เฉลี่ย = 3.0) ดังแสดงในตารางที่ 14

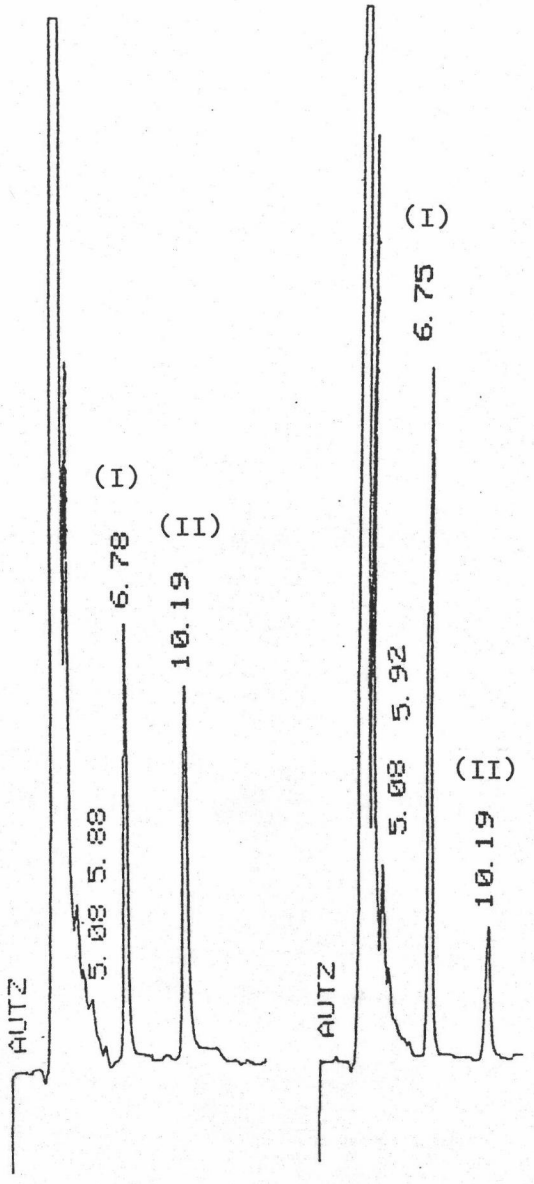
โครมาโทแกรมเปรียบเทียบระหว่างการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน โดยใช้ความยาวคลื่น 254 และ 275 นาโนเมตร แสดงในรูปที่ 14 จะเห็นว่าที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ให้พีคของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน สูงกว่าที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร แต่ให้พีคของสาร IS_1 ต่ำกว่าที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ดังนั้นเพื่อให้ได้ค่า PAR ของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนต่อสาร IS_1 อยู่ในช่วงที่เหมาะสม จึงต้องเพิ่มความเข้มข้นของสาร IS_1 ในพลาสมาจาก 3.0 มคก./มล. เมื่อตรวจหาสารที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็น 8.0 มคก./มล. เมื่อตรวจหาสารที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร

ตารางที่ 13 แสดงค่าอัตราส่วนสัญญาณของสารต่อสัญญาณรบกวน (S/N) เมื่อทำการวิเคราะห์สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่ความเข้มข้น 0.20 มคก./มล. โดยใช้ความยาวคลื่น 254 และ 275 นาโนเมตร

การทดลองครั้งที่	S/N	
	254 นาโนเมตร	275 นาโนเมตร
1	2.8	5.0
2	3.0	4.7
3	3.2	4.9
4	2.8	5.0
5	2.7	4.5
6	2.9	5.0
7	3.0	4.6
8	2.5	4.5
9	2.9	4.5
10	2.9	4.5
ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	2.9 $\pm$ 0.19	4.7 $\pm$ 0.23
% CV	6.58	4.87

ตารางที่ 14 แสดงค่าอัตราส่วนสัญญาณของสารต่อสัญญาณรบกวน (S/N) เมื่อทำการวิเคราะห์สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่ความเข้มข้น 0.10 มคก./มล. โดยใช้ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร

การทดลองครั้งที่	S/N
1	3.0
2	3.0
3	3.3
4	2.6
5	3.0
6	2.9
7	3.0
8	3.2
9	3.2
10	3.0
ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	3.0 $\pm$ 0.19
%CV	6.40



รูป ก รูป ข

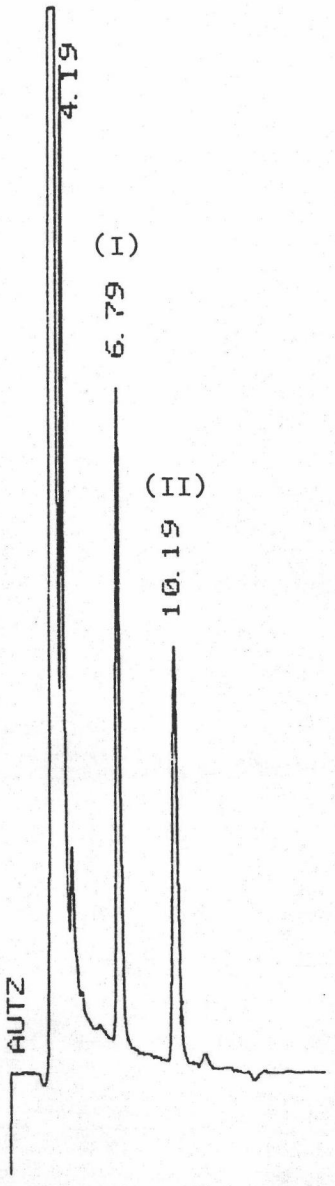
รูปที่ 14 โครมาโทแกรมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน (พีค I) และ IS_1 (พีค II) ในพลาสมา เมื่อทำการตรวจหาสารโดยใช้ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ก) และ 275 นาโนเมตร (ข)
ความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 เป็น 4.0 และ 3.0 มคก./มล. ตามลำดับ

4.4 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาโดยใช้เทคนิค HPLC

สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน เป็นสารประกอบพวกควิโนน ละลายได้ในตัวทำละลายที่มีโพลาริตีปานกลาง แต่ไม่ละลายในน้ำ จึงสามารถใช้โครมาโทกราฟีแบบรีเวิรสเฟส (reversed-phase mode) ในการแยกสารได้ การแยกสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนออกจากพลาสมาสามารถทำได้ดีโดยการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทหรือโดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลร่วมกับซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ ซึ่งทั้งสองวิธีให้เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสารใกล้เคียงกันและมีค่าสูง นอกจากนี้ก็ไม่มีการรบกวนของสารอื่น ๆ ในพลาสมา แต่การสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทมีขั้นตอนวิธีการยุ่งยากและเสียเวลาในการเตรียมตัวอย่างมากกว่า ดังนั้นการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเมทานอลร่วมกับซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการแยกสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ออกจากพลาสมาในครั้งนี้

สภาวะการทดลองทาง HPLC ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาได้จากการทดสอบคุณสมบัติการรีเทนของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดบนคอลัมน์ที่บรรจุด้วย μ-Bondapak$^{(R)}$ C_{18} ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่นิยมใช้กันมากในการแยกสารประกอบที่ไม่ชอบน้ำ (33,34) สารที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการเป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด คือ 2-เมทิล-1,4-เนฟโทควิโนน (IS_1) โดยการแยกของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 เกิดขึ้นได้ดีและแยกออกจากพีคของสารรบกวนอื่น ๆ ในเวลาที่เหมาะสม เมื่อใช้โมบายเฟสเป็นสารผสมของเมทานอลกับอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในอัตราส่วน 55 : 45 โดยปริมาตร โดยมีอัตราการไหล 1.0 มล./นาที ซึ่งสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ใช้เวลาในการรีเทนอยู่ในคอลัมน์นาน 6.79 และ 10.19 นาทีตามลำดับ ลักษณะโครมาโทแกรมแสดงในรูปที่ 15

การตรวจหาสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ในพลาสมาสามารถทำได้โดยการใช้ UV ดีเทกเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ซึ่งสามารถตรวจหาสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาได้ต่ำสุดในความเข้มข้น 0.10 มคก./มล. โดยที่เมื่อทำการตรวจหาสารโดยใช้ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ใช้กันโดยทั่วไปในการวิเคราะห์หาปริมาณสารโดย HPLC จะสามารถตรวจหาสารในพลาสมาได้ต่ำสุดในความเข้มข้น 0.20 มคก./มล.



รูปที่ 15 โครมาโทแกรมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน (พีค I) และ IS_1 (พีค II) ในพลาสมาที่วิเคราะห์ตามวิธีที่พัฒนาได้ในหน้า 30 ความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ในพลาสมา เท่ากับ 4.0 และ 8.0 มคก./มล. ตามลำดับ

4.5 ช่วงความเข้มข้นที่เป็นไปตามกฎของเบียร์

จากการทดลองได้ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่พีคของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนต่อ IS_1 กับความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา ที่เป็นเส้นตรงซึ่งเป็นไปตามกฎของเบียร์ ในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา คือ 0.10 - 16.0 มคก./มล. โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, r^2) เท่ากับ 0.9997 ดังแสดงในรูปที่ 16 สมการของเส้นตรงที่ได้ คือ $y = 0.2851x + 0.0032$ เมื่อ y เป็น PAR ระหว่างสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ต่อ IS_1 และ X เป็นความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา

4.6 การประเมินวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่พัฒนาได้

4.6.1 ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์

โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์แสดงในรูปที่ 17 จะเห็นว่าวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะสูง ซึ่งพิจารณาได้จากค่า retention time ของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน เมื่ออยู่ในพลาสมาและเมื่ออยู่ในเมทานอลมีค่าเท่ากันและพีคของสารที่ได้ไม่มีการรบกวนจากพีคของสารอื่นๆ ที่มีอยู่ในพลาสมา นอกจากนี้สาร 2-เมทิล-1,4-เนฟโทควิโนน ซึ่งใช้เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดสามารถแยกออกจากพีคของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนได้ดี และมีค่า retention time เมื่ออยู่ในพลาสมาเท่ากับเมื่ออยู่ในเมทานอล

4.6.2 เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสารในการแยกออกจากพลาสมา (Physical recovery)

ผลการทดลองหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ที่แยกจากพลาสมา เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานในเมทานอลที่มีความเข้มข้นเท่ากัน แสดงในตารางที่ 15 ค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของ IS_1 และ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ อยู่ในช่วง 78.04-103.3% และ 73.52-94.87% ตามลำดับ ซึ่งไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารในพลาสมา

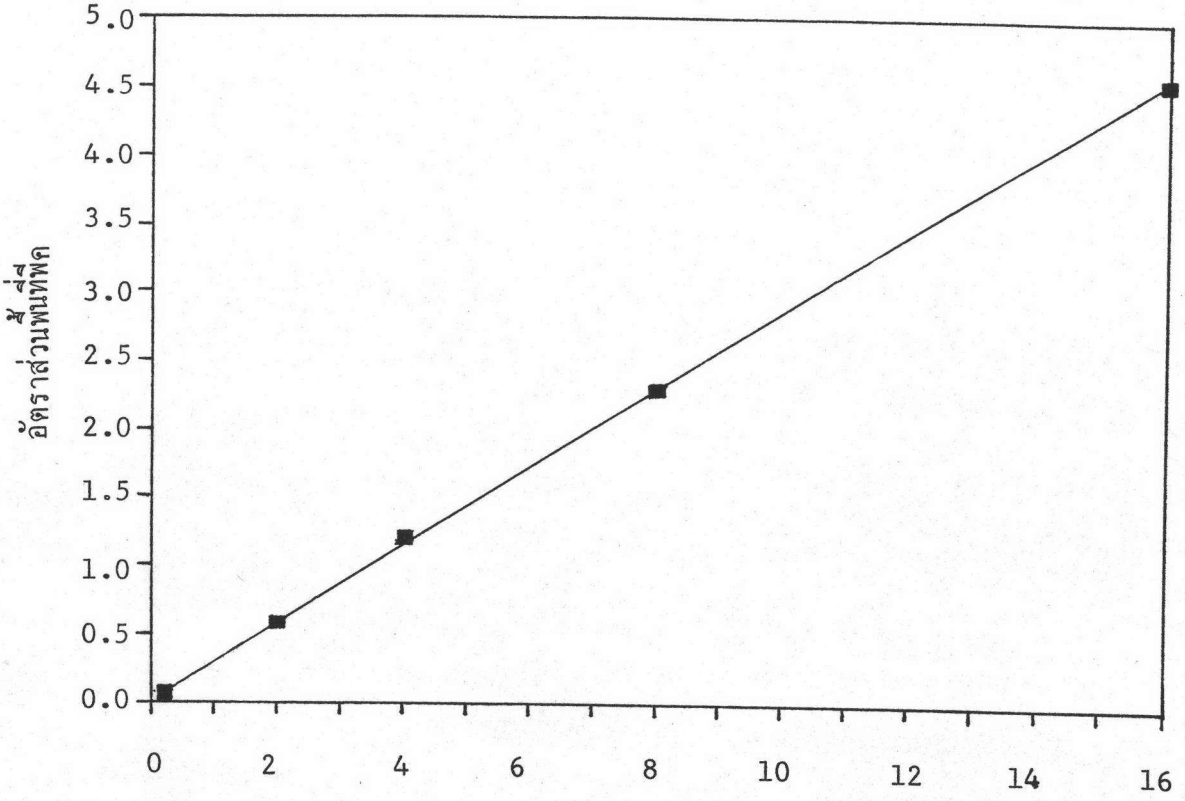
แสดงว่าวิธีการสกัดมีประสิทธิภาพที่ดี และสารมีความคงตัวในระหว่างขั้นตอนการสกัด

4.6.3 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Analytical recovery)

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา แสดงในตารางที่ 16 จะเห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความถูกต้องที่ดี ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา โดยเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสารอยู่ในช่วง 97.75-103.6% และซึ่งมีค่าโดยเฉลี่ยเป็น 101.1%

4.6.4 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์

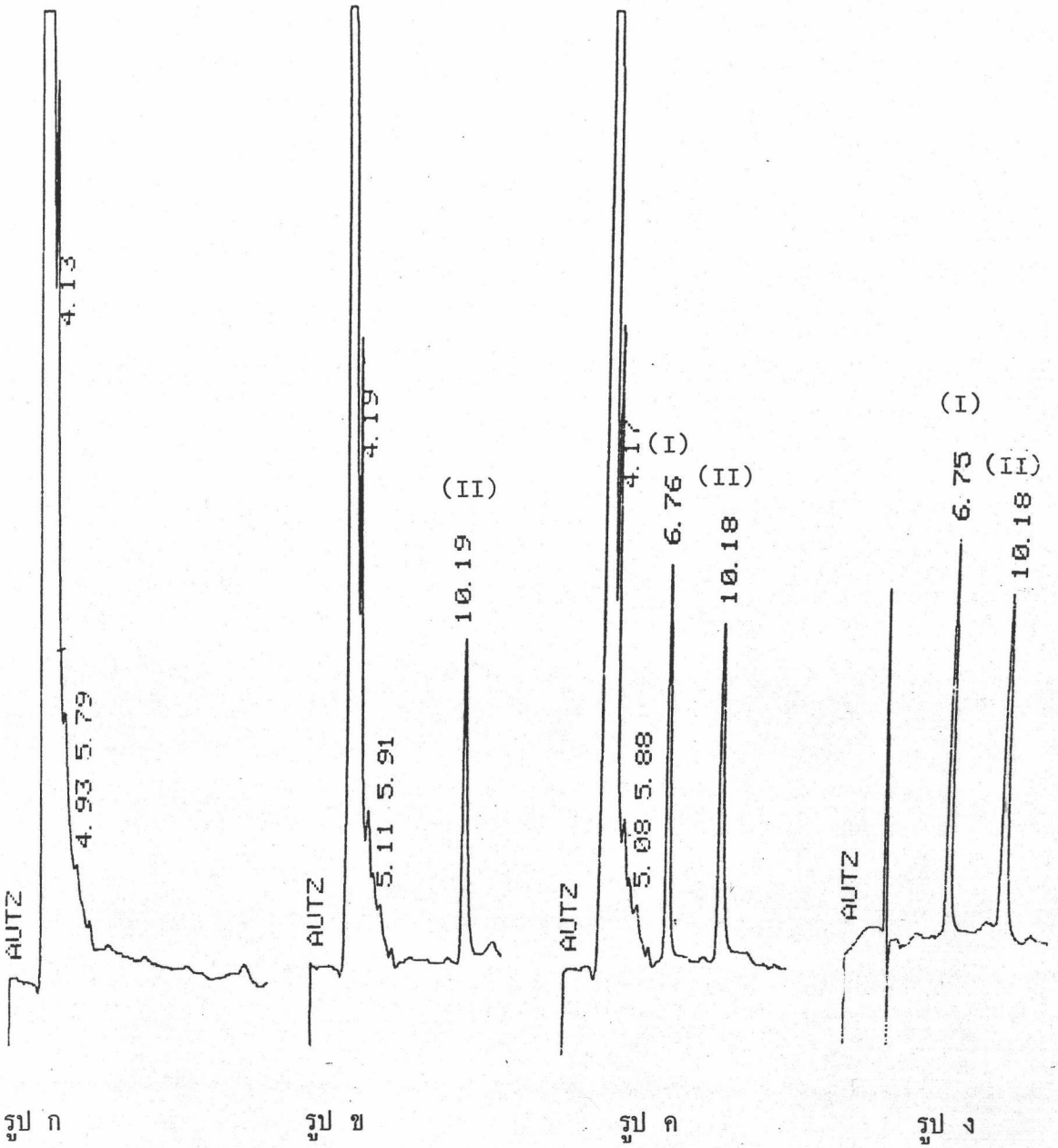
ผลการทดลองศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ใน 1 วัน (within-run precision) และความเที่ยงตรงระหว่างวัน (between-run precision) แสดงในตารางที่ 17 และตารางที่ 18 ตามลำดับ วิธีวิเคราะห์สารในพลาสมาที่ถือว่ามีความเที่ยงตรงดีค่า %CV ของผลการวิเคราะห์ที่ได้ควรมีค่าไม่เกิน 10% จากตารางที่ 17 และตารางที่ 18 จะเห็นว่าค่า %CV ของอัตราส่วนพื้นที่พีคในการวิเคราะห์สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีค่าต่าง ๆ กันไม่แน่นอน และในการวิเคราะห์ใน 1 วัน ค่า %CV ที่ได้มีค่าน้อยกว่า 10% ในทุกความเข้มข้น นั่นคือ วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ใน 1 วันดี สำหรับการวิเคราะห์ระหว่างวัน ค่า %CV ที่ความเข้มข้น 2.0-16.0 มคก./มล. มีค่าน้อยกว่า 10% แต่ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มคก./มล. ค่า %CV ที่ได้มีค่าสูงกว่า 10% เล็กน้อย ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารในพลาสมาได้ความเข้มข้น 0.1 หรือ 0.2 มคก./มล. จะต้องรายงานว่า ตรวจหาสารไม่พบ (Undetect) แต่ในบางกรณีค่า %CV ของการวิเคราะห์ยอมให้เบี่ยงเบนได้ถึง 15% ซึ่งก็จะถือว่าสามารถวิเคราะห์สารที่ความเข้มข้นนั้นได้ และมีความเที่ยงตรงดี โดยทั่วไปค่า %CV สูง ๆ มักจะเกิดขึ้นกับการวิเคราะห์สารที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นเพื่อให้ผลการศึกษาความเที่ยงตรงระหว่างวันถูกต้องยิ่งขึ้น จึงต้องทำการทดลองโดยใช้จำนวนวันเพิ่มขึ้น



รูปที่ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่พีคของสาร 2-เมทอกซี-1, 4-เนฟโทควิโนน ต่อ IS_1 กับความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1, 4-เนฟโทควิโนน ในพลาสมา

สมการของเส้นตรงคือ $y = 0.2851x + 0.0032$

$r^2 = 0.9997$



รูป ก รูป ข รูป ค รูป ง

รูปที่ 17 โครมาโทแกรมแสดงความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ 2-เมทอกซี-1, 4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา โดยเทคนิค HPLC

รูป ก. เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่ไม่มีสาร (plasma blank), รูป ข. เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่มี 2-เมทิล-1,4-เนฟโทควิโนน (IS_1), รูป ค. เป็นโครมาโทแกรมของพลาสมาที่มี 2-เมทอกซี- และ 2-เมทิล-1,4-เนฟโทควิโนน, รูป ง. เป็นโครมาโทแกรมของสารผสม 2-เมทอกซี- และ 2-เมทิล-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอล

พีค I = 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน, พีค II = 2-เมทิล-1,4-เนฟโทควิโนน

สภาวะการทดลองแสดงในหน้า 30

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ในการแยกออกจากพลาสมา (physical recovery) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (n = 3)

ความเข้มข้น[n] (มคก./มล.)	2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน		IS_1	
	เปอร์เซ็นต์การกลับคืน (mean ± SD)	% CV	เปอร์เซ็นต์การกลับคืน (mean ± SD)	% CV
16.0	88.46 ± 6.6	7.4	100.5 ± 5.0	5.0
8.0	87.98 ± 7.9	9.0	100.2 ± 8.6	8.6
4.0	87.27 ± 6.1	7.0	103.3 ± 7.2	7.0
2.0	93.48 ± 8.4	9.0	79.78 ± 1.9	2.3
0.2	94.87 ± 6.4	6.8	80.20 ± 6.0	7.5
0.1	73.52 ± 3.2	4.4	78.04 ± 1.5	2.0

[n] ความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา

เปอร์เซ็นต์การกลับคืนเฉลี่ยของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน = 88.42± 8.5 (n=18)
และของ IS_1 = 91.07±12.3 (n=18)

IS_1 = 2-เมทิล-1,4-เนฟโทควิโนน

ตารางที่ 16 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ในพลาสมา (analytical recovery) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (n = 3)

ความเข้มข้นของสารในพลาสมาที่เตรียมขึ้น (มคก./มล.)	ความเข้มข้นของสารในพลาสมาที่วิเคราะห์ได้ (มคก./มล.)(mean±SD)	เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร	
		mean ± SD	%CV
16.0	16.6 ± 0.05	103.6 ± 0.30	0.3
8.0	8.2 ± 0.22	102.5 ± 2.76	2.7
4.0	4.1 ± 0.11	102.4 ± 2.79	2.7
2.0	2.0 ± 0.02	99.24 ± 1.13	1.1
1.0	1.0 ± 0.05	97.75 ± 5.05	5.2

เปอร์เซ็นต์การกลับคืนเฉลี่ย = 101.1 ± 3.36 (n = 15)

ตารางที่ 17 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ในพลาสมา ใน 1 วัน (within-run precision, n = 3)

ความเข้มข้น[ก] (มคก./มล.)	อัตราส่วนพื้นที่พีค[ข] (mean ± SD)	%CV
16.0	5.62 ± 0.494	8.8
8.0	2.46 ± 0.023	0.9
4.0	1.22 ± 0.095	7.8
2.0	0.71 ± 0.070	9.9
0.2	0.07 ± 0.003	4.3
0.1	0.028 ± 0.001	2.0

[ก] ความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา

[ข] อัตราส่วนพื้นที่พีคของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนต่อสาร IS_1

ตารางที่ 18 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ในพลาสมา ระหว่างวัน (between-run precision, n = 6)

ความเข้มข้น[n] (มคก./มล.)	อัตราส่วนพื้นที่พีค[ฅ] (mean ± SD)	%CV
16.0	4.87 ± 0.291	6.0
8.0	2.32 ± 0.100	4.3
4.0	1.20 ± 0.045	3.8
2.0	0.62 ± 0.034	5.4
0.2	0.06 ± 0.008	12.4
0.1	0.027 ± 0.003	11.9

[n] ความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา

[ฅ] อัตราส่วนพื้นที่พีคของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนต่อสาร IS_1

ส่วนที่ 5 การศึกษาช่วงระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างพลาสมาที่มีสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในช่องแช่แข็ง (อุณหภูมิประมาณ -20°ซ.)

ผลการทดลองศึกษาการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่เวลาต่างๆ หลังจากเก็บในช่องแช่แข็ง (อุณหภูมิประมาณ -20°ซ.) ที่ความเข้มข้น 8.00, 4.00 และ 0.50 มคก./มล.ของพลาสมา แสดงในตารางที่ 19

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาในครั้งนี้ เป็นการศึกษาเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการกำหนดขีดจำกัดของช่วงเวลาที่จะต้องวิเคราะห์สารตัวอย่าง เพื่อให้ผลการศึกษาวิเคราะห์มีความถูกต้องตรงตามความเป็นจริงมากที่สุด ดังนั้นช่วงระยะเวลาของการเก็บสารตัวอย่างจึงไม่สามารถกำหนดตาม shelf-life ซึ่งเป็นการกำหนดระยะเวลาของการเก็บยา โดยกำหนดให้มีการเปลี่ยนแปลงของสารได้ไม่เกิน ± 10% และในทำนองเดียวกันก็ไม่สามารถกำหนดตามช่วงความเชื่อมั่น (confidence interval) 90% ได้ โดยช่วงระยะเวลาที่จะสามารถเก็บตัวอย่างจะเป็นช่วงเวลาที่สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนไม่ควรเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากที่เวลาเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) จากตารางที่ 19 จะเห็นว่า เมื่อเก็บตัวอย่างไว้นาน 7 วัน ค่าความเข้มข้นของสารจะแตกต่างจากความเข้มข้นของสารที่เวลาเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา โดยที่ความเข้มข้น 8.00, 4.00 และ 0.50 มคก./มล. ความเข้มข้นของสารลดลง 8.38, 8.00 และ 6.20% ตามลำดับ และการลดลงของสารที่ความเข้มข้น 8.00, 4.00 และ 0.50 มคก./มล. อยู่ในช่วงความเชื่อมั่นระหว่าง -9.13-(-7.61), -10.54-(-5.26) และ -9.22-(-3.08) ตามลำดับ ดังนั้นจึงไม่ควรเก็บตัวอย่างพลาสมาที่มีสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ. ไว้นานเกิน 7 วัน ก่อนทำการศึกษาวิเคราะห์

ส่วนที่ 6 การศึกษาระยะเวลาของการเก็บสารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอลในช่องแช่แข็ง (อุณหภูมิประมาณ -20° ซ.)

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอลความเข้มข้น 400, 200 และ 40 มคก./มล.ที่เวลาต่าง ๆ หลังจากเก็บ

ในช่องแช่แข็ง (อุณหภูมิประมาณ -20° ซ.) แสดงในตารางที่ 20 จะเห็นว่าที่ความเข้มข้น 400 มคก./มล. การเปลี่ยนแปลงในช่วง 7 วันแรกจะเกิดขึ้นได้เร็วกว่าที่ความเข้มข้น 200 และ 40 มคก./มล. คือมีการเปลี่ยนแปลงถึง 1% ในขณะที่ความเข้มข้น 200 และ 40 มคก./มล. จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงประมาณ 0.3% เท่านั้น อย่างไรก็ตามในทุกความเข้มข้น การเปลี่ยนแปลงในช่วง 14 วันแรกจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและจะค่อย ๆ ช้าลงจนเกือบคงที่หลังจากเก็บนาน 21 วัน เนื่องจากในการทดลองนี้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารในระยะเวลาเพียง 4 สัปดาห์ และจำนวนตัวอย่างที่ทำการศึกษามีน้อย (n = 5) จึงไม่อาจสรุปได้แน่นอนว่าลักษณะการเปลี่ยนแปลงของสารเป็นแบบใด

จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Paired Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จะเห็นว่าที่ความเข้มข้น 400 มคก./มล. เมื่อเก็บนาน 7 วัน สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารที่เวลาเริ่มต้น ส่วนที่ความเข้มข้น 200 และ 40 มคก./มล. การเปลี่ยนแปลงของสารที่เกิดขึ้นยังไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ความเข้มข้น 200 และ 40 มคก./มล. นี้ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารที่เวลาเริ่มต้นเมื่อเก็บนาน 14 วัน เนื่องจากไม่ได้ทำการทดลองศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารในช่วง 7-14 วัน จึงไม่อาจคาดคะเนได้แน่นอนว่า สารที่ความเข้มข้นนี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารที่เวลาเริ่มต้นเมื่อเก็บนานกี่วัน

ในการเก็บสารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอลในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ. ซึ่งโดยทั่วไปสารจะมีความคงตัวดีที่อุณหภูมินี้ อย่างไรก็ตามก็ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารแต่ละชนิด ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อกำหนดระยะเวลาของการเก็บสารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอลที่จะใช้ในการเตรียมกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา ดังนั้นสารละลายที่เก็บไว้ไม่ควรจะเกิดการเปลี่ยนแปลงจนมีความแตกต่างจากสารที่เตรียมใหม่ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ช่วงระยะเวลาของการเก็บสารละลายจึงไม่สามารถกำหนดตาม shelf-life ซึ่งเป็นการกำหนดระยะเวลาของการเก็บยาโดยกำหนดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารได้ไม่เกิน ± 10% จากตารางที่ 20 จะเห็นว่าสารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ในเมทานอลสามารถเก็บในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ. ได้นาน 7 วัน โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

กับสารที่เวลาเริ่มต้นที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95% นอกจากนี้จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของสารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ในเมทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีการเปลี่ยนแปลงไม่แน่นอน ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสาร ดังนั้นในการเตรียมสารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอลเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน จึงควรเจือจางจากสารละลายสต๊อกเดียวกัน

ตารางที่ 19 การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ หลังจากเก็บในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ. ที่ความเข้มข้น 8.00, 4.00 และ 0.50 มคก./มล.

เวลา (วัน)	ความเข้มข้น 8.00 มคก./มล.				ความเข้มข้น 4.00 มคก./มล.				ความเข้มข้น 0.50 มคก./มล.			
	ความเข้มข้น[n] (มคก./มล.)	%การเปลี่ยนแปลงเฉลี่ย	t คำนวณ[*]	ช่วงความเชื่อมั่น	ความเข้มข้น[n] (มคก./มล.)	%การเปลี่ยนแปลงเฉลี่ย	t คำนวณ[*]	ช่วงความเชื่อมั่น	ความเข้มข้น[n] (มคก./มล.)	%การเปลี่ยนแปลงเฉลี่ย	t คำนวณ[*]	ช่วงความเชื่อมั่น
0	8.00±0.020	-	-	-	4.00±0.006	-	-	-	0.500±0.009	-	-	-
7	7.33±0.046	8.38	23.136	-9.13- (-7.61)	3.68±0.085	8.00	6.504	-10.54- (-5.26)	0.469±0.009	6.20	4.218	-9.22- (-3.08)
14	7.18±0.045	10.25	28.841	-11.04- (-9.54)	3.32±0.040	17.00	29.119	-18.17- (-15.68)	0.454±0.008	9.20	6.616	-11.99- (-6.19)
30	6.85±0.017	14.38	75.884	-14.75- (-14.00)	3.20±0.078	20.00	17.712	-22.40- (-17.59)	0.447±0.005	10.60	8.916	-13.03- (-8.23)

[n] ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของการทดลอง 3 ครั้ง

[*] ค่า t จากตารางที่ระดับความเชื่อมั่น 95% = 2.776 (degree of freedom = 4)

ตารางที่ 20 การเปลี่ยนแปลงของสารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอล ความเข้มข้น 400, 200 และ 40 มคก./มล. ที่เวลาต่าง ๆ หลังจากเก็บในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ.

เวลา (วัน)	ความเข้มข้น 400 มคก./มล.		ความเข้มข้น 200 มคก./มล.		ความเข้มข้น 40 มคก./มล.	
	% การเปลี่ยนแปลง[n]	t คำนวณ*	% การเปลี่ยนแปลง[n]	t คำนวณ*	% การเปลี่ยนแปลง[n]	t คำนวณ*
7	1.04 ± 0.038	64.45	0.36 ± 0.911	0.892	0.34 ± 0.903	0.847
14	4.57 ± 0.074	107.99	7.09 ± 0.478	35.80	4.52 ± 0.246	44.43
21	4.66 ± 0.101	88.18	9.02 ± 0.127	160.78	6.17 ± 0.149	102.90
28	4.75 ± 0.138	70.20	10.08 ± 0.239	105.50	6.93 ± 0.254	58.09

[n] ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 5 ครั้ง

* ค่า t จากตารางที่ระดับความเชื่อมั่น 95% = 2.132 (degree of freedom = 4)