บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. พลาสมาของคน

ตลอดการศึกษานี้ใช้พลาสมาของคนซึ่งแยกจากโลหิตที่ได้รับอนุเคราะห์จากสภากาชาดไทย (หมายเลขบริจาค 068556, หมู่โลหิต : หมู่เอ) โดยนำโลหิตที่ได้มาปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง เพื่อแยกชั้นพลาสมา และเก็บเข้าตู้เย็นในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ. จนกว่าจะถูกนำออกมาใช้

2. สารเคมี : สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ตลอดการศึกษามีดังนี้

2.1 สารสกัดบริสุทธิ์ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน จากใบเทียนบ้าน (ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ชาตรี ผดุงเจริญ ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

2.2 2-ไฮดรอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน (Sigma Chemical Company, Montana, USA.) Lot no. 38F-3756

2.3 2-เมทิล-1,4-เนฟโทควิโนน (2-Methyl-1,4-naphthoquinone; Sigma Chemical Company, Montana, USA.) Lot no. 39F-0686

2.4 1,4-เนฟโทควิโนน (1,4-Naphthoquinone; Fluka, Buchs, Switzerland) Analysis no. 353221089

2.5 กรดไฮโดรคลอริก เกรด AR (Hydrochloric acid, HCl, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.6 เมทานอล เกรด AR (Methanol, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.7 เมทานอล เกรด HPLC (BDH Chemical, Poole, England)

2.8 อะซีโทน เกรด AR (Acetone, AR; Fisher Scientific Company, Pennsylvania, USA.)

2.9 แอซีโตไนไตรล์ เกรด AR (Acetonitrile, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.10 คลอโรฟอร์ม เกรด AR (Chloroform, $CHCl_3$, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.11 ไซโคลเฮกเซน สำหรับโครมาโทกราฟี (Cyclohexane for chromatography; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.12 เฮกเซน เกรด AR (Hexane, AR; J.T. Baker Chemical, New Jersey, USA.)

2.13 ออกทานอล เกรด AR (Octanol, AR; Fluka, Buchs, Switzerland)

2.14 เอทิลอะซีเตท เกรด AR (Ethylacetate, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.15 อีเทอร์ เกรด AR (Ether, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.16 โทลูอีน เกรด AR (Toluene, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.17 ไดเมทิลฟอร์มาไมด์ เกรด AR (Dimethylformamide, AR; BDH Chemical, Poole, England)

2.18 เอทานอล เกรด AR (Ethanol, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.19 ไอโซโพรพานอล เกรด AR (Isopropanol, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.20 บิวทานอล เกรด AR (Butanol, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.21 เบนซีน เกรด AR (Benzene, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.22 ไดคลอโรมีเทน เกรด AR (Dichloromethane, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.23 โซเดียมไฮดรอกไซด์ เกรด AR (Sodium hydroxide, NaOH, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.24 โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เกรด AR (Potassium hydroxide, KOH, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.25 กรดอะซีติกล้วน เกรด AR (Glacial acetic acid, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.26 โซเดียมอะซีเตท เกรด AR (Sodium acetate, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.27 ซิงค์ซัลเฟต เกรด AR (Zinc sulfate, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.28 ซิลิกาเจล 60 ขนาดอนุภาค 0.040-0.063 มม., สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Silica gel 60; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.29 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ปราศจากน้ำ เกรด AR (Anhydrous disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4, AR; May & Baker, Dagenham, England)

2.30 โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เกรด AR (Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.31 โปแตสเซียมโบรไมด์ที่ปราศจากน้ำ เกรด AR (Anhydrous potassium bromide, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.32 ดิวเทอเรตคลอโรฟอร์ม เกรด AR (Deuterated chloroform, $CDCl_3$, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

2.33 เตตราเมทิลไซเลน เกรด AR (Tetramethylsilane, AR; E. Merck, Darmstadt, Germany)

3. <u>เครื่องมือ</u> : เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่

3.1 เครื่องชั่งสำหรับการวิเคราะห์ (Sartorius type 2472, Fabr. Nr. 176582, Sartorius-Werke GMBH, Germany)

3.2 เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Buchi melting point apparatus, Nach Dr. Tottoli, Buchi, Switzerland)

3.3 อินฟราเรด สเปกโทรมิเตอร์ (Infrared spectrometer; Shimadzu, Model IR-400, Shimadzu, Japan)

3.4 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรมิเตอร์ (Nuclear magnetic resonance spectrometer; Jaeol, Model FX 90Q, Jaeol Limited, Japan)

3.5 อัลตราไวโอเลตสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Ultraviolet Spectrophotometer; Shimadzu, model UV-180 double beam, Shimadzu, Japan)

3.6 ไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC; Milton Roy LDC Division, Florida, USA.) ประกอบด้วย

3.6.1 Model CM 4000 multiple solvent delivery system

3.6.2 Model SM 4000 programmable wavelength detector

3.6.3 Model CI-4100 computing integrator

3.7 อินเจคเตอร์ (Injector; Rheodyne 7100 injection port, Rheodyne, California, USA.)

3.8 โครมาโทกราฟิกคอลัมน์ (Chromatographic column) เป็นคอลัมน์แบบเหล็กกล้าไร้สนิม ขนาดความยาว 30 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3.9 มม. บรรจุด้วย μ-Bondapak C_{18} (Phenomenax(R), California, USA.) ขนาดอนุภาค 10 ไมครอน

3.9 การ์ดคอลัมน์ (Guard-column) เป็นคอลัมน์แบบเหล็กกล้าไร้สนิม ขนาดความยาว 5 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.0 มม. บรรจุด้วย Bondapak(R) C_{18} /Coracil (Waters Associates Pty. Ltd., Massachusetts, USA.) ขนาดอนุภาค 37-50 ไมครอน

3.10 เครื่องผสมวอร์เทกซ์ (Vortex mixer; Vortex-Genie, Scientific Industries. Inc., New York, USA.)

3.11 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Gallenkamp Junior Centrifuge, Gallenkamp, England)

3.12 ไมโครปิเปต (Micropipet ; Pipetman(R), Gilson, U.K.)

3.13 Heating mantle (Scientific Industries Inc., New York, USA.)

วิธีการ

ขั้นตอนการศึกษาเพื่อให้ได้มาซึ่งวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยเทคนิคทาง HPLC ในครั้งนี้แบ่งออกเป็น 6 ส่วนดังนี้

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

ส่วนที่ 2 การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมี (Physicochemical properties) ของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ในด้านคุณสมบัติการละลาย, การกระจายตัวของสารระหว่างชั้นตัวทำละลายอินทรีย์กับชั้นบัฟเฟอร์ รวมทั้งการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลต

ส่วนที่ 3 การหาสภาวะการทดลองทางโครมาโทกราฟี (chromatographic condition) ที่เหมาะสมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอล

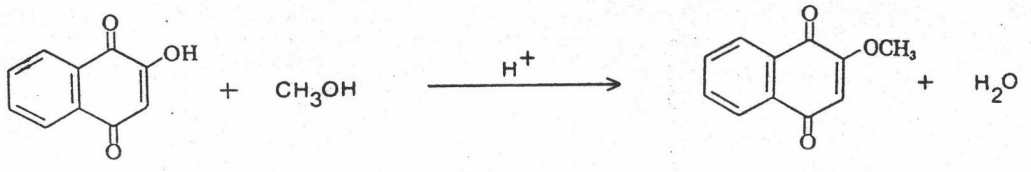
ส่วนที่ 4 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ในพลาสมา

ส่วนที่ 5 การศึกษาช่วงระยะเวลาที่สามารถเก็บตัวอย่างพลาสมาที่มีสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ.

ส่วนที่ 6 การศึกษาระยะเวลาที่สามารถเก็บสารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอล ในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ.

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

สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนสามารถเตรียมได้จากปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์ (esterification) ตามวิธีของ Fieser (8) โดยใช้ 2-ไฮดรอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ซึ่งเป็นกรดที่แรง (pKa = 4.0) ทำปฏิกิริยากับเมทานอล โดยมีกรดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเอสเทอร์ (11) สมการแสดงปฏิกิริยาเป็นดังนี้



2-ไฮดรอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน

1.1 <u>วิธีการสังเคราะห์</u>

ชั่งสาร 2-ไฮดรอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนหนัก 10 กรัมโดยประมาณ ใส่ในขวดแก้วก้นกลมขนาด 250 มล.

↓

เติมกรดไฮโดรคลอริก 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในเมทานอล จำนวน 100 มล.

↓

รีฟลักซ์ (reflux) ที่อุณหภูมิ 70°ซ. นาน 1 ชั่วโมง จะเกิดสารมีลักษณะเป็นก้อนสีเหลือง

↓

สารผสมที่ได้ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณภูมิห้อง

↓

กรองตะกอนผ่านกรวยกรองแบบบุชเนอร์ (Buchner funnel)

↓

ล้างตะกอนด้วยน้ำจนกระทั่งน้ำที่ล้างตะกอนไม่มีสี

↓

ตะกอนที่ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่บรรจุด้วยซิลิกาเจล 60 โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวชะ (eluent)

↓

ระเหยคลอโรฟอร์มออกจะได้สารมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองปนแดง

↓

สารที่ได้นำมาตกผลึกใหม่ (recrystallization) ในน้ำเดือด จะได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อน ผึ่งผลึกให้แห้งในเดซิกเคเตอร์

1.2 <u>การพิสูจน์เอกลักษณ์สารที่สังเคราะห์ได้</u>

เพื่อให้แน่ใจว่าสารที่ได้จากการสังเคราะห์ในข้อ 1.1 เป็น 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน จึงได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์และเปรียบเทียบกับที่มีรายงานไว้ (2, 3, 9, 10) โดยอาศัยจุดหลอมเหลว และเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่อัลตราไวโอเลต (Ultraviolet, UV), อินฟราเรด (Infrared, IR) และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear magnetic resonance, NMR)

1.2.1 <u>การศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วง UV</u> (ในคลอโรฟอร์มและในเอทานอล):- ชั่งสารที่ได้จากการสังเคราะห์ ในข้อ 1.1 จำนวน 30.0 มก. ($\pm$10%) ละลายในคลอโรฟอร์มและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล.ในฟลาสค์ปรับปริมาตร สารละลายที่ได้นำมาเจือจางด้วยคลอโรฟอร์มให้ได้ความเข้มข้น 7.50 มคก./มล. ($\pm$10%) โดยปิเปตสารละลายที่ได้จำนวน 5 มล. เจือจางและปรับปริมาตรด้วยคลอโรฟอร์มให้ครบ 200 มล.ในฟลาสค์ปรับปริมาตร บรรจุสารละลายในควอร์ทซเซลล์ (quartz cell) สำหรับใช้กับเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยมีขนาดความกว้างของเซลล์ที่แสงผ่านได้ (path length) เท่ากับ 1 ซม. สำรวจ (scan) การดูดกลืนแสงของสารละลายในช่วงความยาวคลื่น 200-400 นาโนเมตร ความเร็วของการสำรวจ 50 นาโนเมตร/นาที สเปกตรัมของสารจะถูกบันทึกโดยเครื่องบันทึก ด้วยความเร็ว 50 มม./นาที ทำซ้ำวิธีการเช่นเดียวกันนี้โดยใช้สารสกัดบริสุทธิ์จากใบเทียนบ้าน และทำวิธีการเช่นเดียวกันนี้โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายแทนคลอโรฟอร์มในกรณี UV สเปกตรัมในเอทานอล

1.2.2 <u>การศึกษาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วง IR</u> :- บดสารที่ได้จากการสังเคราะห์ในข้อ 1.1 จำนวนเล็กน้อยกับโปแตสเซียมโบรไมด์ที่ปราศจากน้ำจนกระทั่งผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปอัดเม็ดโดยใช้เครื่องอัดเม็ด และวัดการดูดกลืนแสงในช่วงอินฟราเรดด้วยอินฟราเรด สเปกโทรมิเตอร์ ทำซ้ำวิธีการเช่นเดียวกันนี้โดยใช้สารสกัดบริสุทธิ์จากใบเทียนบ้าน

1.2.3 <u>การศึกษาคุณสมบัติทาง NMR</u> :- บันทึกโปรตอนแมกเนติก-เรโซแนนซ์ สเปกตรัมของสารที่ได้จากการสังเคราะห์ในข้อ 1.1 และสารสกัดบริสุทธิ์จากใบเทียนบ้าน โดยใช้เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรมิเตอร์ที่ความถี่ 90 เมกะเฮิรตซ์ (megahertz, MHz) โดยใช้ $CDCl_3$ เป็นตัวทำละลายและใช้เตตรา-เมทิลไซเลนเป็นสารอ้างอิง

1.2.4 การหาจุดหลอมเหลวของสาร

1.2.4.1 การหาจุดหลอมเหลวโดยประมาณ :- บรรจุสารที่บดเป็นผงละเอียดแล้วจำนวนเล็กน้อยในหลอดรูเล็ก (capillary tube) จนกระทั่งได้ความสูงของสารจากก้นหลอดประมาณ 2.5-3.5 มม. เมื่ออัดแน่น นำไปใส่ในเครื่องหาจุดหลอมเหลว เปิดเครื่องมือให้ความร้อนแก่สารโดยให้ความร้อนเพิ่มในอัตรา 4-5°ซ. ต่อนาที จนกระทั่งสารเริ่มหลอมเหลวและหลอมเหลวหมด บันทึกอุณหภูมิที่สารเริ่มหลอมเหลวและหลอมเหลวหมด

1.2.4.2 การหาจุดหลอมเหลวที่แท้จริง :- บรรจุสารในหลอดรูเล็กเช่นเดียวกับข้อ 1.2.4.1 เปิดเครื่องมือหาจุดหลอมเหลวให้ความร้อนเพิ่มในอัตรา 4-5°ซ.ต่อนาที จนกระทั่งถึงอุณหภูมิช่วงที่ต่ำกว่าจุดหลอมเหลวซึ่งทราบได้จากการทดลองในข้อ 1.2.4.1 10°ซ. จึงลดอัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเป็น 1°ซ ต่อนาที เมื่ออุณหภูมิถึงอุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดหลอมเหลว 5°ซ. จึงใส่หลอดรูเล็กที่บรรจุสารลงไป ให้ความร้อนแก่สารในอัตรา 1°ซ.ต่อนาทีต่อไป จนกระทั่งสารเริ่มหลอมเหลวและหลอมเหลวหมด บันทึกอุณหภูมิที่สารเริ่มหลอมเหลวและหลอมเหลวหมด ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ส่วนที่ 2 การศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมี (Physicochemical properties) ของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน

เนื่องจากข้อมูลทางด้านคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน มีอยู่น้อยมาก ไม่เพียงพอสำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ จึงได้ทำการศึกษาทดลองหาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีที่สำคัญที่จะใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่เหมาะสม คุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีที่ทำการศึกษาได้แก่

- คุณสมบัติการละลายของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ในตัวทำละลายต่าง ๆ
- คุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลตของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอล
- คุณสมบัติการกระจายตัวของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ระหว่าง

ชั้นของออกทานอลกับชั้นบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ และระหว่างชั้นของเฮกเซนกับชั้นบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆ

2.1 <u>การทดสอบการละลาย (Solubility test) ของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในตัวทำละลายต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้อง</u>

2.1.1 <u>ตัวทำละลาย</u> :- ตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษาการละลายของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในครั้งนี้ได้แก่

- น้ำ, สารละลายกรด (0.1 โมลาร์ HCl), สารละลายด่าง (0.1 โมลาร์ NaOH)
- ตัวทำละลายกลุ่มอัลกอฮอล์ที่ทำการศึกษาได้แก่ เมทานอล, เอทานอล, บิวทานอล และไอโซโพรพานอล
- ตัวทำละลายกลุ่มอนุพันธ์มีเทนที่ทำการศึกษาได้แก่ คลอโรฟอร์ม, และไดคลอโรมีเทน
- ตัวทำละลายอื่น ๆ ได้แก่ อะซีโทน, แอซีโตไนไตรล์, ไซโคลเฮกเซน, เอทิลอะซีเตท, อีเทอร์, โทลูอีน, ไดเมทิลฟอร์มาไมด์, เบนซีน และเฮกเซน

ตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้เลือกจากตัวทำละลายที่มักใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะครอบคลุมตัวทำละลายที่มีโพลาริตี (polarity) สูง, โพลาริตีปานกลาง และ โพลาริตีต่ำ

2.1.2 <u>วิธีการทำ</u> :-

การทดสอบคุณสมบัติการละลายของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนนี้ดัดแปลงมาจากวิธีหาค่าการละลายแบบ Modify synthetic method ในหนังสือ Bentley's Textbook of Pharmaceutics (12) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการหาค่าการละลายของสารที่ยังไม่มีวิธีการที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสารในสารละลายอิ่มตัว และได้ดัดแปลงวิธีดังกล่าวเพื่อให้สิ้นเปลืองสารในการทดสอบน้อยลง ซึ่งค่าการละลายที่ได้จะแสดงในเทอมของการบรรยาย (descriptive term) ตามที่ระบุในเภสัชตำรับ (13) ขั้นตอนวิธีการทดสอบการละลายเป็นดังนี้

ชั่งสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน จำนวน 20.0 มก. ± 10% ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวขนาดความจุ 100 มล. เติมตัวทำละลายที่จะทดสอบ (ข้อ 2.1.1) ลงทีละส่วนครั้งละ 0.1 มล. ผสมเข้าด้วยกันโดยใช้เครื่องผสมวอร์เทกซ์นาน 5 นาที สังเกตการละลาย ถ้ายังมีสารส่วนที่ไม่ละลายเหลืออยู่ต้องเติมตัวทำละลายเพิ่มเป็นส่วน ๆ และผสมโดยใช้เครื่องผสมวอร์เทกซ์ นาน 5 นาที ทำเช่นนี้จนกว่าสารจะละลายหมด บันทึกปริมาตรทั้งหมดของตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสาร ในกรณีที่สารไม่ละลายในตัวทำละลายที่ทดสอบซึ่งอาจต้องใช้ตัวทำละลายมากกว่า 200 มล.ต่อปริมาณสาร 20.0 มก. ต้องทำการลดปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนที่ใช้ในการทดสอบลง โดยชั่งสารมาเพียง 10.0 มก. และทำการทดสอบการละลายตามวิธีดังกล่าว เมื่อใช้ตัวทำละลายในการละลายสารไปจนถึง 100 มล. แล้ว ยังคงมีสารส่วนที่ไม่ละลายเหลืออยู่ตั้งหลอดทดลองนั้นไว้ค้างคืน และเขย่าเป็นระยะ ๆ ถ้ายังคงมีสารส่วนที่ไม่ละลายเหลืออยู่แสดงว่าการละลายของสารในตัวทำละลายนั้นมีน้อยมากจนแทบไม่ละลาย (Insoluble)

2.2 <u>การหาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลต (ในเมทานอล)</u>

เนื่องจาก UV ดีเทกเตอร์ (detector) เป็นดีเทกเตอร์ที่นิยมใช้กันมากในการตรวจหาสารโดยทั่วไป เมื่อทำการวิเคราะห์โดยอาศัยเทคนิคทาง HPLC และในการเริ่มต้นพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน โดยใช้ HPLC ในครั้งนี้ได้ใช้สารละลายผสมของเมทานอลเป็นโมบายเฟส การศึกษานี้จึงได้ทดลองหาคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอล เพื่อเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจหาสารโดยใช้ UV ดีเทกเตอร์ สำหรับวิธีการทดลองทำเช่นเดียวกับข้อ 1.2.1 หน้า 11

2.3 <u>การหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ระหว่างชั้นออกทานอลกับชั้นบัฟเฟอร์ที่ pH 1-7 และระหว่างชั้นเฮกเซนกับชั้นบัฟเฟอร์ที่ pH 1-7 ที่อุณหภูมิห้อง</u>

การกระจายของสารระหว่างชั้นตัวทำละลายอินทรีย์กับชั้นน้ำ (หรือบัฟเฟอร์)ที่ไม่ผสมกัน แสดงได้ในรูปของค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (Distribution or partition coefficient, P) ค่า P เป็นอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารที่ภาวะสมดุลย์ระหว่างชั้นตัวทำละลายอินทรีย์กับชั้นน้ำในระบบของตัวทำละลายอินทรีย์/

น้ำที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งค่านี้จะมีประโยชน์ในการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารออกจากของเหลวชีวภาพเพื่อให้สามารถสกัดสารออกมาได้มากที่สุด ในการศึกษานี้ใช้ออกทานอลเป็นตัวแทนของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีโพลาริตีปานกลาง เช่น ไดคลอโรมีเทน, คลอโรฟอร์ม, เอทิลอะซีเตท เป็นต้น และใช้เฮกเซนเป็นตัวแทนของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีโพลาริตีต่ำ เช่น ไซโคลเฮกเซน, โทลูอีน เป็นต้น นอกจากนี้ค่า P ระหว่างชั้นออกทานอลกับชั้นน้ำ ยังสามารถแสดงถึงการดูดซึม, การซึมผ่าน (penetrate) และการสะสมยาในร่างกาย (14,15,16)

2.3.1 <u>การเตรียมสารละลายต่าง ๆ</u>

ก. เตรียมสารละลายสต๊อคของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในน้ำ ความเข้มข้น 30.0 มคก./มล. โดยชั่งสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนจำนวน 30.0 มก. อย่างแม่นยำ ละลายในน้ำและปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มล. ในฟลาสค์ปรับปริมาตร

ข. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆ ตามวิธีของ Perrin (17) ดังนี้

- บัฟเฟอร์ pH 4 (อะซีเตทบัฟเฟอร์) : ผสมกรดอะซีติก 0.1 โมลาร์ จำนวน 51.3 มล. กับ KOH 0.1 โมลาร์ จำนวน 9.9 มล. และเจือจางด้วยน้ำจนครบ 100 มล.

- บัฟเฟอร์ pH 5 (อะซีเตทบัฟเฟอร์) : ผสมกรดอะซิติก 0.1 โมลาร์ จำนวน 15.3 มล. กับ KOH 0.1 โมลาร์ จำนวน 10.0 มล. และเจือจางด้วยน้ำจนครบ 100 มล.

- บัฟเฟอร์ pH 7 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) : ผสม KH_2PO_4 0.02 โมลาร์ จำนวน 14.0 มล. กับ Na_2HPO_4 0.01 โมลาร์ จำนวน 24.0 มล. และเจือจางด้วยน้ำจนครบ 100 มล.

ค. เตรียมสารละลาย 0.1 โมลาร์ HCl : เจือจางกรดไฮโดรคลอริก จำนวน 0.85 มล. ในน้ำ และปรับปริมาตรจนครบ 100 มล.

017438

ง. เตรียมสารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆ โดยปิเปตสารละลายจากข้อ ก. จำนวน 10 มล. ใส่ในฟลาสค์ปรับปริมาตรขนาด 50 มล. และปรับปริมาตรให้ครบ 50 มล. ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ ในข้อ ข. หรือสารละลาย 0.1 โมลาร์ HCl ในข้อ ค. นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการวัดหาปริมาณของสารในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1-7 (ดูภาคผนวก ก.)

2.3.2 การหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว ทำตามวิธีในหนังสือ A Textbook of Biopharmaceutic Analysis (18) ดังนี้

ปิเปตสารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆ และ ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ HCl จาก ง. จำนวน 10 มล. ใส่ separatory funnel ขนาด 125 มล. เติมออกทานอลหรือเฮกเซนจำนวน 10 มล. (ปิเปต) ลงไปสกัด โดยการเขย่าสารผสมจนถึงภาวะสมดุลย์ (ทดสอบภาวะสมดุลย์ได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรของชั้นน้ำที่เวลา 1 นาที, 5 นาที และ 10 นาทีหลังจากเขย่าสารผสม เมื่อเกิดภาวะสมดุลย์ค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่าง ๆ จะมีค่าคงที่พบว่าเกิดภาวะสมดุลย์ของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ระหว่างชั้นตัวทำละลายอินทรีย์กับชั้นบัฟเฟอร์เมื่อเขย่านาน 5 นาที) วัดค่าการดูดกลืนแสงของชั้นบัฟเฟอร์และชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

<u>การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (18)</u>

$$\text{ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว} = \frac{C_{org}}{C_{aq}}$$

เมื่อ C_{org} และ C_{aq} เป็นความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ และชั้นบัฟเฟอร์ตามลำดับ

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

จากการค้นคว้ารายงานจากวารสารต่าง ๆ ทั้งในและต่างประเทศ ยังไม่มีผู้รายงานถึงสภาวะการทดลองใด ๆ ทาง HPLC ของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนทั้งในรูปวัตถุดิบ, ผลิตภัณฑ์หรือในชีวของเหลว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาเพื่อหาสภาวะการทดลองทางโครมาโทกราฟีของสารนี้ โดยใช้เทคนิค isocratic, reversed-phase HPLC

การเตรียมสารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอล :- ชั่งสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน จำนวน 10.0 มก. ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 50 มล.ในฟลาสค์ปรับปริมาตร สารละลายที่ได้นำมาเจือจางด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้นของสาร 0.40 มคก./มล. (เตรียมใหม่ทุกครั้งในแต่ละวันของการทดลอง)

3.1 การทดลองเพื่อเลือกโมบายเฟส (mobile phase) ที่เหมาะสม

ในการพัฒนาหาสภาวะการทดลองทางโครมาโทกราฟีของสารในครั้งนี้ได้เริ่มจากการใช้เมทานอลเป็นส่วนผสมในโมบายเฟส เนื่องจากมีราคาถูก, มีความคงตัว และมีอันตรายน้อยกว่าตัวทำละลายอื่น ๆ ที่นิยมใช้เป็นโมบายเฟสในรีเวิรสเฟส HPLC (19,20) นอกจากนี้ได้มีรายงานเกี่ยวกับการแยกสารประกอบพวกเนฟโทควิโนนโดยรีเวิรสเฟส HPLC โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุด้วย μ-Bondapak C_{18} และใช้สารผสมของเมทานอลกับน้ำ ในอัตราส่วน 75:25 ปริมาตร/ปริมาตรเป็นโมบายเฟส (21)

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลของโมบายเฟส 3 ชนิด คือ

1) สารผสมของเมทานอลกับน้ำ
2) สารผสมของเมทานอลกับ อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 1×10^{-2} โมลาร์
และ 3) สารผสมของเมทานอลกับ อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์

โดยมีอัตราส่วนของปริมาตรเมทานอลต่อน้ำหรือบัฟเฟอร์เท่ากับ 3:1 และมีสภาวะการทดลองอื่น ๆ เหมือนกัน เพื่อศึกษาผลของโมบายเฟสในสภาวะที่ไม่มี

อะซีเตทบัฟเฟอร์และในสภาวะที่มีอะซีเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้นต่างกันที่มีต่อรูปร่างของโครมาโทแกรมในด้านความสมมาตร และความกว้างของโครมาโทแกรม

<u>การเตรียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 1 x 10^{-2} และ 2 x 10^{-4} โมลาร์</u> :- อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 1 x 10^{-2} โมลาร์ เตรียมโดยผสมกรดอะซีติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 37.5 มล. กับโซเดียม-อะซีเตท ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 20.0 มล. และเจือจางด้วยน้ำจนได้ปริมาตร 300 มล. ส่วนอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2 x 10^{-4} โมลาร์ เตรียมโดยเจือจางอะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 1 x 10^{-2} โมลาร์ ด้วยน้ำลงไป 50 เท่า

<u>การตรวจหาสาร (detection)</u> :- ในการเริ่มต้นศึกษาเพื่อหาสภาวะการทดลองของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในครั้งนี้ ได้ใช้ UV ดีเทกเตอร์ (detector) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ในการตรวจหาสาร เนื่องจากขีดจำกัดของเครื่องมือที่มีอยู่ ไม่สามารถปรับเปลี่ยนความยาวคลื่นเพื่อความเหมาะสมในการตรวจหาสารได้ และที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นความยาวคลื่นที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปในการวิเคราะห์สารโดยใช้เทคนิคทาง HPLC

<u>สภาวะการทดลองเริ่มแรก</u>

โครมาโทกราฟิก คอลัมน์ : คอลัมน์แบบเหล็กกล้าไร้สนิม ขนาดความยาว 30 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3.9 มม. บรรจุด้วย μ-Bondapak C_{18} ขนาดอนุภาค 10 ไมครอน

การ์ดคอลัมน์ : คอลัมน์แบบเหล็กกล้าไร้สนิม ขนาดความยาว 5 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.0 มม. บรรจุด้วย Bondapak$^{(R)}$ C_{18} /Coracil ขนาดอนุภาค 37-50 ไมครอน

โมบายเฟส :โมบายเฟส 1 เป็น เมทานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 75:25
โมบายเฟส 2 เป็น เมทานอล : อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 1 x 10^{-2} โมลาร์ ในอัตราส่วน 75:25

โมบายเฟส 3 เป็น เมทานอล : อะซีเตท
บัฟเฟอร์ pH4.0 ความเข้มข้น 2 x 10^{-4} โมลาร์
ในอัตราส่วน 75:25

อัตราการไหล (flow rate) : 1 มล./นาที

ดีเทกเตอร์ (detector) : 254 นาโนเมตร

ปริมาตรสารที่ฉีดต่อตัวอย่าง (injection volume) : 20 มคล.

3.2 <u>การศึกษาทดลองเพื่อให้ได้อินเทอร์นอลสแตนดาร์ด (Internal standard, IS) ที่เหมาะสม</u>

การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ในครั้งนี้ใช้วิธีการเติมสารอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดลงไปในตัวอย่างพลาสมา ทางทฤษฎีอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้ (22)

- ไม่เป็นสารที่อาจพบอยู่ในตัวอย่างที่จะวิเคราะห์
- ต้องมีคุณสมบัติการรีเทนที่ใกล้เคียงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ แต่ต้องสามารถแยกออกจากพีคของสารอื่น ๆ ทั้งหมดในโครมาโทแกรมได้ดี
- มีคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีใกล้เคียงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์

การเลือกสารเคมีที่จะใช้เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน พิจารณาจากสารที่มีสูตรโครงสร้างคล้าย (analog) กับสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน, มีคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีใกล้เคียงและไม่เป็นสารที่อาจพบอยู่ในตัวอย่าง สารเคมีที่มีคุณสมบัติดังกล่าวเท่าที่สามารถหาได้มี 3 ตัว คือ 2-เมทิล-1,4-เนฟโทควิโนน (IS_1), 2-ไฮดรอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน (IS_2) และ 1,4-เนฟโทควิโนน (IS_3) คุณสมบัติของสารเหล่านี้เปรียบเทียบกับสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน แสดงในตารางที่ 1

สารทั้ง 3 ตัวที่เลือกมานี้นำมาทดลองศึกษาเพื่อเลือกสารที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน โดยการศึกษาคุณสมบัติการรีเทนอยู่ในคอลัมน์ ซึ่งพิจารณาจากค่า capacity factor และการแยกของสารเทียบกับสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ซึ่งพิจารณาจากค่า selectivity เมื่อใช้โมบายเฟสที่เหมาะสม

ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.1 สารที่มีคุณสมบัติการรีเทนใกล้เคียงกับสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนและสามารถแยกออกจากพีคของสารอื่น ๆ ทั้งหมดในตัวอย่างได้ดี จะถูกนำมาใช้เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด

การทดลอง

ก. การเตรียมสารละลายอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดในเมทานอล :- ชั่งสาร IS_1, หรือ IS_2, หรือ IS_3 จำนวน 10.0 มก. ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอลจนครบ 50 มล.ในฟลาสค์ปรับปริมาตร สารละลาย IS_1, IS_2 และ IS_3 ที่ได้นำมาเจือจางด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสง (absorptivity) ของสาร ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร IS_1, IS_2 และ IS_3 คือ 0.80, 1.60 และ 0.80 มคก./มล. ตามลำดับ

ข. สภาวะการทดลอง :- เหมือนข้อ 3.1 และใช้โมบายเฟสซึ่งได้ทดลองคัดเลือกแล้วคือ เมทานอล : อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ในอัตราส่วน 75:25

เพื่อให้แน่ใจว่าสารที่เลือกได้จากสภาวะการทดลองนี้เป็นสารที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดในการใช้เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในครั้งนี้ จึงได้ทำการทดลองศึกษาคุณสมบัติการรีเทน และการแยกของสาร ในโมบายเฟสที่มีอัตราส่วนของเมทานอล : อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ต่าง ๆ คือ 70:30, 65:35 และ 60:40

3.3 การหาช่วงความเข้มข้นของการวิเคราะห์ที่เป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's law)

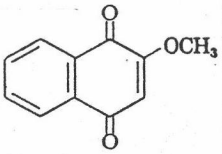
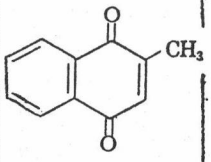
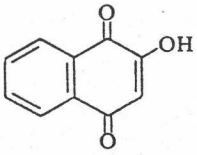
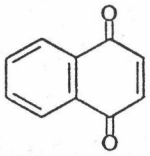
ทำการทดลองหาช่วงความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับการดูดกลืนแสงตามกฎของเบียร์ในช่วงที่คาดว่ากว้างพอที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ได้ โดยได้ทำการทดลองในช่วงความเข้มข้น 0.08-1.60 มคก./มล. และใช้สารอินเทอร์นอลสแตนดาร์ดที่เหมาะสมที่เลือกจากการทดลองในข้อ 3.2 (IS_1) โดยได้ทำการทดลองหาความเข้มข้นของสาร IS_1 ที่จะให้อัตราส่วนพื้นที่

พีคของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนต่อสาร IS_1 (peak area ratio, PAR) ที่เหมาะสมเมื่อทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้นดังกล่าว จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร IS_1 คือ 0.80 มคก./มล. ทดลองหาช่วงความเข้มข้นที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับการดูดกลืนแสงตามกฎของเบียร์ดังนี้

เตรียมสารละลายมาตรฐานซึ่งเป็นสารละลายผสมของสาร 2-เมทอกซี-1, 4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ในเมทานอลโดยมีความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1, 4-เนฟโทควิโนนต่าง ๆ กัน 6 ความเข้มข้นคือ 1.60, 0.80, 0.48, 0.32, 0.16 และ 0.08 มคก./มล. และมีความเข้มข้นของ IS_1 0.80 มคก./มล. ตามตารางที่ 2

สารละลายแต่ละความเข้มข้นจะถูกฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยมีสภาวะการทดลองเหมือนข้อ 3.1 โดยใช้โมบายเฟสที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.2 (สารผสมของเมทานอลกับ อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในอัตราส่วน 65:35) สารละลายแต่ละความเข้มข้นจะถูกฉีดเข้า HPLC 2 ครั้ง ผลที่ได้นำมาเขียนกราฟระหว่างค่าอัตราส่วนพื้นที่พีคของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ต่อ IS_1 กับความเข้มข้นของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน เพื่อหาช่วงความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนที่ PAR เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นตามกฎของเบียร์

ตารางที่ 1 คุณสมบัติสาร 2-เมทิล-, 2-ไฮดรอกซี- และ 1,4-เนฟโทควิโนนเปรียบเทียบกับสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน (23,24,25,26,27)

คุณสมบัติ	2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน	2-เมทิล-1,4-เนฟโทควิโนน	2-ไฮดรอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน	1,4-เนฟโทควิโนน
สูตรโครงสร้าง				
สูตรโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล การละลาย	$C_{11}H_8O_3$ 188.2 insoluble in water; freely soluble in chloroform; soluble in dimethylformamide and dichloromethane	$C_{11}H_8O_2$ 172.2 insoluble in water; freely soluble in chloroform; soluble in ether; soluble 1 in 60 of ethanol	$C_{10}H_6O_3$ 174.2 very slightly soluble in water; sparingly soluble in benzene and petroleum ether	$C_{10}H_6O_2$ 158.2 sparingly soluble in cold water; freely soluble in ether, benzene, chloroform and carbonbisulfide
การดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลต (ในเอทานอล), นาโนเมตร	λmax = 246,252, 275 และ 333	λmax=245,250, 263 และ 333	λmax = 242,248, 272 และ 330	λmax=248(sh), 244 และ 332

ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานในเมทานอลของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโท-ควิโนน เพื่อใช้ในการศึกษาช่วงความเข้มข้นที่เป็นไปตามกฎของเบียร์ โดยมีสาร IS_1 เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด

ความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในสารละลายมาตรฐาน (มคก./มล.)	ปริมาตรสารละลายสต๊อก 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอล[ฆ] (มล.)	ปริมาตรสารละลายสต๊อก IS_1 ในเมทานอล[ค] (มล.)	ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายมาตรฐาน[ง] (มล.)
1.60	10	10	25
0.80	5	10	25
0.48	3	10	25
0.32	2	10	25
0.16	1	10	25
0.08	1	20	50

[ก] สาร IS_1 คือ 2-เมทิล-1,4-เนฟโทควิโนน

[ฆ] ความเข้มข้น 4.00 มคก./มล.

[ค] ความเข้มข้น 2.00 มคก./มล.

[ง] ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลในฟลาสค์ปรับปริมาตร

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

4.1 การพัฒนาวิธีการแยก 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนออกจากพลาสมา

การแยกสารออกจากพลาสมาสามารถทำได้หลายวิธี ในการพัฒนาวิธีการแยกสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนออกจากพลาสมาในครั้งนี้ ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายและวิธีตกตะกอนพลาสมาโปรตีน โดยมีหลักการพิจารณาเลือกวิธีการแยกที่เหมาะสมที่สุดจาก

- ลักษณะโครมาโทแกรมที่ได้ไม่มีการรบกวนของ endogenous substance ที่มีอยู่ในพลาสมา
- เปอร์เซ็นต์การกลับคืน (percent recovery) ของสารและ IS สูง
- ขั้นตอนการทำไม่ยุ่งยาก
- ไม่ใช้เวลาในการวิเคราะห์มากเกินไป
- ประหยัดค่าใช้จ่ายในการทำ

4.1.1 การแยกสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ออกจากพลาสมาโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย

จากข้อมูลคุณสมบัติการละลายของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.1 นำมาเลือกตัวทำละลายเพื่อใช้ในการสกัด โดยตัวทำละลายที่ใช้ควรมีคุณสมบัติไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำ (immisible) และควรจะมีจุดเดือดไม่สูงมากเพื่อให้ระเหยได้ง่าย

ตัวทำละลายที่เลือกมาทดลองสกัดสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ออกจากพลาสมาในครั้งนี้คือ คลอโรฟอร์มและเอทิลอะซิเตท ขั้นตอนวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นดังนี้

ผสมพลาสมา 0.5 มล. กับ สารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ในเมทานอล ความเข้มข้น 400 มคก./มล. จำนวน 10 มคล.ในหลอดเซนตริฟิวก์

↓

เติมสารละลาย IS_1 ในเมทานอล ความเข้มข้น 400 มคก./มล. จำนวน 10 มคล., วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เติมตัวทำละลายสำหรับสกัดสาร (คลอโรฟอร์มหรือเอทิลอะซีเตท) จำนวน 2.0 มล., วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 2000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

↓

ดูดชั้นตัวทำละลาย (อยู่ชั้นล่างเมื่อสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม, อยู่ชั้นบนเมื่อสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท) จำนวน 1.0 มล. ใส่หลอดทดลอง

↓

ปล่อยทิ้งไว้ให้ระเหยจนกระทั่งแห้งในตู้ควัน

↓

ละลายสารที่เหลือจากการระเหยด้วยเมทานอล 1.0 มล.

↓

ฉีดสารละลายที่ได้จำนวน 20 มคล. เข้า HPLC โดยใช้สภาวะการทดลองที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.2 (ใช้โมบายเฟสเป็น เมทานอล : อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในอัตราส่วน 65:35)

<u>การคำนวณค่าความเข้มข้นของสารในตัวทำละลายเมื่อการสกัดเกิดขึ้นสมบูรณ์ 100%</u>

ปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ที่เติมลงในพลาสมา มีจำนวนเท่ากันคือเท่ากับ

$$\frac{400}{1000} \times 10 = 4.0 \text{ มคก.}$$

ปริมาตรตัวทำละลายที่ใช้สกัด = 2.0 มล.

..ถ้าการสกัดเกิดขึ้นสมบูรณ์ความเข้มข้นของสาร = $\frac{4.0}{2}$ = 2.0 มคก./มล.

<u>การหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร</u> :- ผสมสารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอล ความเข้มข้น 400 มคก./มล. และสารละลาย IS_1ในเมทานอล ความเข้มข้น 400 มคก./มล. อย่างละ 50 มคล. เจือจางและปรับปริมาตรให้ครบ 10 มล. ด้วยเมทานอล จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 อย่างละ 2.0 มคก./มล. ซึ่งจะเป็นความเข้มข้นของสารในตัวทำละลาย เมื่อการสกัดเกิดขึ้นสมบูรณ์ 100% สารละลายที่ได้นำมาฉีดเข้า HPLC จำนวน 20 มคล. โดยใช้สภาวะในการทดลองเหมือนกับการทำในตัวอย่าง

<u>การคำนวณเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร</u> :-

เมื่อปริมาตรสารตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานที่ฉีดเข้า HPLC มีจำนวนเท่ากันจะได้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร} = \frac{\text{พ.ท. 1}}{\text{พ.ท. 2}} \times 100$$

เมื่อ พ.ท. 1 เป็นพื้นที่พีคของสารที่แยก จากตัวอย่างพลาสมา

พ.ท. 2 เป็นพื้นที่พีคของสารจากสารละลายมาตรฐาน

4.1.2 <u>การแยก 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนและ IS_1 ออกจากพลาสมาโดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีน</u>

ทำการทดลองเปรียบเทียบการแยก 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนออกจากพลาสมา โดยใช้สารที่มีคุณสมบัติในการตกตะกอนพลาสมาโปรตีน คือ เมทานอล และเมทานอลร่วมกับ ซิงค์ซัลเฟต 10% น้ำหนัก/ปริมาตรในน้ำ ขั้นตอนวิธีการแยกสารโดยการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนเป็นดังนี้

ผสมพลาสมา 0.5 มล. กับสารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอล ความเข้มข้น 400 มคก./มล. จำนวน 10 มคล. ในหลอดเซนตริฟิวก์

↓

เติมเมทานอล 1.0 มล. (หรือซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ 0.1 มล. ร่วมกับเมทานอล 1.0 มล.), วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เติมสารละลาย IS_1 ในเมทานอล ความเข้มข้น 400 มคก./มล. จำนวน 10 มคล., วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 2000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

↓

สารละลายส่วนใสข้างบนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยง นำมาฉีดเข้า HPLC จำนวน 20 มคล. โดยใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1.1 หน้า 24

<u>การหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร</u> :- ทำขั้นตอนทุกอย่างเหมือนการเตรียมตัวอย่าง แต่ใช้น้ำจำนวน 0.5 มล. แทนพลาสมา

<u>การคำนวณเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร</u> :- เหมือนข้อ 4.1.1 หน้า 26

4.1.3 <u>การปรับอัตราส่วนโมบายเฟสเพื่อใช้ในการศึกษาพัฒนาวิธีการแยกสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนออกจากพลาสมา</u>

จากการทดลองในข้อ 4.1.1 และ 4.1.2 เมื่อใช้โมบายเฟสเป็น เมทานอล : อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ในอัตราส่วน 65:35 ในการศึกษาเปรียบเทียบผลการสกัดสารออกจากพลาสมา โครมาโทแกรมของสารที่ได้มีการรบกวนของสาร endogenous substance ที่มีอยู่ในพลาสมา จึงได้ปรับอัตราส่วนโมบายเฟสที่ใช้เป็น 55:45 เพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนดังกล่าว ซึ่งทำให้ผลการทดลองที่ได้มีความถูกต้องสมบูรณ์

4.2 <u>การปรับสภาวะการทดลองทางโครมาโทกราฟีจากข้อ 3 เพื่อใช้ในการหาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 ในพลาสมา</u>

จากผลการทดลองแยกสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนออกจากพลาสมาในข้อ 4.1 วิธีที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งพิจารณาตามหลักการที่กล่าวไปแล้ว คือ วิธีตกตะกอนพลาสมาโปรตีน ด้วยเมทานอลร่วมกับ ซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ เพื่อให้เกิดการแยกที่ดีระหว่างสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนกับสาร endogenous substance และ IS_1 ในเวลาที่เหมาะสม จึงได้ทำการปรับสภาวะการทดลองทางโครมาโทกราฟีจากข้อ 3 โดยการปรับอัตราส่วนของโมบายเฟสที่ใช้

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 โดยใช้สารตกตะกอนพลาสมาโปรตีนเป็น ซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ 0.1 มล. ร่วมกับเมทานอล 1.0 มล. และใช้โมบายเฟสเป็นสารผสมของเมทานอลกับ อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ในอัตราส่วนต่างๆ ดังนี้ 65:35, 60:40 และ 55:45 อัตราส่วนโมบายเฟสที่ทำให้เกิดการแยกที่ดีระหว่างสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนกับสาร endogenous substance และ IS_1 ในเวลาที่เหมาะสม จะถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา

4.3 <u>การหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์ที่จะสามารถวิเคราะห์ปริมาณที่น้อยที่สุดของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา</u>

เพื่อให้แน่ใจว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณ

สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ในตัวอย่างพลาสมาได้แม้ในปริมาณต่ำ ๆ จึงจำเป็นต้องทำการทดลองหาปริมาณต่ำสุดของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนที่จะวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นมา โดยอาศัยหลักเกณฑ์ทั่วไปทางโครมาโทกราฟีว่าปริมาณที่น้อยที่สุดของสารที่ถือว่ายังสามารถวิเคราะห์ได้จะต้องให้สัญญาณของสารอย่างน้อยเป็น 2 เท่าของสัญญาณรบกวนปกติของการวิเคราะห์ (Signal to noise ratio, S/N $\geq$ 2:1) (28)

<u>วิธีการทดลอง</u> :- ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.2 โดยใช้อัตราส่วนโมบายเฟสที่ดีที่สุดซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 4.2 (อัตราส่วนโมบายเฟสที่ดีที่สุดคือ เมทานอล : อะซีเตท บัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในอัตราส่วน 55:45) โดยเตรียมตัวอย่างสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาความเข้มข้นต่ำ ๆ หลายความเข้มข้น แล้ววิเคราะห์หาว่าความเข้มข้นใดให้โครมาโทแกรมที่ให้อัตราส่วนสัญญาณของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนต่อสัญญาณรบกวนไม่น้อยกว่า 2:1 เมื่อใช้เอทเทนนูเอชันของเครื่องบันทึกเป็น $2^{\wedge 0}$ ทำการทดลองซ้ำโดยใช้ความเข้มข้นนั้นอีก 9 ตัวอย่าง เพื่อดูการเบี่ยงเบนของอัตราส่วนสัญญาณของสารต่อสัญญาณรบกวน เพื่อให้ผลการทดลองหาค่าขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์มีความถูกต้อง

จากที่กล่าวมาแล้วว่าได้ทำการตรวจหาสารโดยใช้ UV ดีเทกเตอร์ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ใช้กันโดยทั่วไป ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารโดย HPLC จากการศึกษาหาขีดจำกัดของวิธีวิเคราะห์พบว่าที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จะสามารถวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนได้ไม่ต่ำเท่าที่คาดว่าวิธีที่ใช้ควรจะวิเคราะห์ได้ จึงได้ทดลองเปลี่ยนความยาวคลื่นที่จะใช้ในการตรวจหาสารใหม่ โดยอาศัยอัลตราไวโอเลตสเปกตรัมของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอลซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 2.2 หน้า 14 พบว่าที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนมีคุณสมบัติการดูดกลืนแสงสูงกว่าที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (ดูรูปที่ 5) ดังนั้นจึงได้เปลี่ยนความยาวคลื่นในการตรวจหาสารเป็นความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร

ทำการทดลองศึกษาเปรียบเทียบขีดจำกัดความไวในการตรวจหาสารเมื่อใช้ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตรและเมื่อใช้ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เพื่อเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่ทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่มีจำนวนน้อย ๆ ได้

4.4 <u>วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่พัฒนาได้</u>

ผสมพลาสมา 0.5 มล. กับ สารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอล จำนวน 10 มคล. ในหลอดเซนตริฟิวก์

↓

เติมซิงค์ซัลเฟต 10% ในน้ำ 0.1 มล., วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เติมเมทานอล 1 มล., วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เติมสารละลาย IS_1 ในเมทานอล ความเข้มข้น 400 มคก./มล. จำนวน 10 มคล., วอร์เทกซ์นาน 20 วินาที

↓

เหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 2000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

↓

สารละลายใสส่วนบนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงนำมาฉีดเข้า HPLC จำนวน 20 มคล.

<u>สภาวะการทดลองสุดท้ายทางโครมาโทกราฟี ที่ใช้วิเคราะห์สาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา</u>

โครมาโทกราฟิกคอลัมน์ : เหมือนสภาวะการทดลองเริ่มแรก หน้า 18
การ์ดคอลัมน์ : เหมือนสภาวะการทดลองเริ่มแรก หน้า 18
โมบายเฟส : เมทานอล : อะซีเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 ความเข้มข้น 2×10^{-4} โมลาร์ ในอัตราส่วน 55:45
อัตราการไหล : 1.0 มล./นาที
ดีเทกเตอร์ : UV 275 นาโนเมตร
ปริมาตรสารที่ฉีดต่อตัวอย่าง : 20 มคล.
อินทิเกรเตอร์ (integrator condition) :
เอทเทนนูเอชัน (Attenuation) : $2^{\wedge 4}$
ความเร็วของกระดาษบันทึก (chart speed) : 2 มม./นาที

4.5 การหาช่วงความเข้มข้นที่เป็นไปตามกฎของเบียร์

ทำการเตรียมตัวอย่าง 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาความเข้มข้นต่าง ๆ กันที่คาดว่าน่าจะครอบคลุมช่วงความเข้มข้นทั้งหมดที่ควรจะตรวจพบในพลาสมา จำนวน 6 ความเข้มข้น คือ 16.0, 8.0, 4.0, 2.0, 0.2 และ 0.1 มคก./มล. และแบลงค์พลาสมา (plasma blank) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณตามวิธีที่พัฒนาได้ตามข้อ 4.4 ผลที่ได้นำมาเขียนกราฟระหว่างอัตราส่วนพื้นที่พีคของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนต่อพื้นที่พีค IS_1 (PAR) กับความเข้มข้นของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา เพื่อหาช่วงที่ PAR เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นตามกฎของเบียร์

4.6 การประเมินวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่พัฒนาได้

ทำการทดลองเพื่อประเมินวิธีการวิเคราะห์ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่พัฒนาได้ในด้านความจำเพาะ (specificity), เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสารในการแยกออกจากพลาสมา, ความแม่นยำ (accuracy) ของการวิเคราะห์, ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ทั้งความเที่ยงตรงในการวิเคราะห์ใน 1 วัน (within-run precision) และความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ระหว่างวัน (between-run precision)

4.6.1 การศึกษาความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์

โดยการเปรียบเทียบเวลาที่สารรีเทนอยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน และ IS_1 เมื่ออยู่ในพลาสมาและเมื่ออยู่ในตัวทำละลายเมทานอล รวมทั้งเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของพลาสมาเมื่อไม่มีสารอยู่เลย, โครมาโทแกรมของพลาสมาเมื่อมีสาร IS_1 และโครมาโทแกรมของพลาสมาเมื่อมี 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนผสมกับ IS_1 เพื่อพิจารณาถึงการรบกวนของสารอื่น ๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมา

4.6.2 <u>การหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสารในการแยกออกจากพลาสมา (Physical Recovery)</u>

ทำการวิเคราะห์หาสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนที่ได้เติม (spike) ลงไปในพลาสมาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในทำนองเดียวกับข้อ 4.5 หน้า 31 เทียบกับการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนกับ IS_1 ในเมทานอล ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน คำนวณเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร ทำซ้ำแต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ตัวอย่าง (n = 3)

4.6.3 <u>การศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Recovery)</u>

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ประเมินจากการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนน ในตัวอย่างพลาสมาที่ถูกเติมสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนไว้ในความเข้มข้นต่าง ๆ โดยผู้อื่น โดยแต่ละตัวอย่างทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง (n = 3) และหาความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งเตรียมขึ้นโดยวิธีเดียวกับการทดลองในข้อ 4.5

4.6.4 <u>การศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์</u>

ทำการทดลองวิเคราะห์หาสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาตามวิธีที่พัฒนาได้ โดยเตรียมชุดความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาในช่วง 0.10-16.0 มคก./มล. ในทำนองเดียวกับการทดลองในข้อ 4.5 หน้า 32 ในการศึกษาความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ใน 1 วัน (within-run precision) ใช้ชุดความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในช่วงดังกล่าว 3 ชุด (n = 3) และทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารให้เสร็จภายในวันเดียวกัน ส่วนในการศึกษาความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ระหว่างวัน (between-run precision) ทำการวิเคราะห์สารในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวแต่ละวัน โดยทำการทดลอง จำนวน 6 วัน (n = 6) คำนวณอัตราส่วนพื้นที่พีคของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนต่อพื้นที่พีคของ IS_1 (PAR) ในแต่ละความเข้มข้น ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์พิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation, C.V.) ของค่า PAR จากผลการทดลองที่ได้

ส่วนที่ 5 การศึกษาช่วงระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างพลาสมาที่มีสาร 2-เมทอกซี-1, 4-เนฟโทควิโนน ในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ.

ในการศึกษาหาปริมาณสารในชีวของเหลวต่างๆ เช่นพลาสมามักจะไม่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ทันที ตัวอย่างมักจะถูกเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ. ทันที จนกว่าจะถึงเวลาวิเคราะห์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาหาช่วงเวลาที่สารในของเหลวชีวภาพยังคงสภาพเดิมไม่เสื่อมสลายหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงจนกว่าถึงเวลาทำการวิเคราะห์ การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ทำการทดลองเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ. เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการกำหนดขีดจำกัดของช่วงเวลาที่ต้องวิเคราะห์สารตัวอย่าง เพื่อให้ผลการศึกษาวิเคราะห์มีความถูกต้องตรงตามความเป็นจริงมากที่สุด

การทดลอง :- ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่เก็บในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ โดยใช้ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 3 ความเข้มข้นคือ 8.00, 4.00 และ 0.50 มคก./มล.ของพลาสมา โดยการเติมสารละลายในเมทานอลของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนลงไปในพลาสมา โดยให้มีปริมาตรของเมทานอล 20.0 มคล. ต่อปริมาตรพลาสมา 1.00 มล. ผสมให้เข้ากันดีโดยใช้เครื่องผสมวอร์เทกซ์ ทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1, 4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาตามวิธีที่พัฒนาได้ในข้อ 4.4 ที่เวลาต่าง ๆ คือ ที่เวลาเริ่มต้น (0 วัน), 7 วัน, 14 วัน และ 30 วันหลังจากเก็บในหลอดแก้วในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ. โดยใช้จำนวนตัวอย่างในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง แต่ละความเข้มข้น 3 ตัวอย่าง (n=3) การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นถ้าเกิดขึ้นระหว่างการเก็บจะทราบได้จากการเทียบจากกราฟมาตรฐานซึ่งได้จากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่เตรียมใหม่ทุกครั้งที่นำตัวอย่างมาวิเคราะห์

การวิเคราะห์ข้อมูล :- ในการศึกษานี้ได้เปรียบเทียบวิธีการสรุปการเปลี่ยนแปลงของสารแบบต่าง ๆ คือ

- การสรุปการเปลี่ยนแปลงของสารโดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้น

เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของสาร (% การเปลี่ยนแปลง) $= \frac{C_{t_0} - C_t}{C_{t_0}} \times 100$

เมื่อ C_{t_0} เป็นความเข้มข้นของสารในพลาสมาที่เวลาเริ่มต้น ($t = 0$)

C_t เป็นความเข้มข้นของสารในพลาสมาที่เวลาใด ๆ

· เกณฑ์การตัดสินการเปลี่ยนแปลงของสาร :- จะถือว่าสารมีการเปลี่ยนแปลงไปจากที่เวลาเริ่มต้น เมื่อ % การเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของสาร $\geq \pm$ 10%

- การสรุปผลการทดลองที่ระยะเวลาเก็บต่าง ๆ ด้วยสถิติ

: เปรียบเทียบข้อมูลความเข้มข้นของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่วิเคราะห์ได้ที่เวลาเริ่มต้น กับที่เวลา 7, 14 และ 30 วัน หลังจากเก็บในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ. โดยใช้ Unpaired Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถ้าค่า t ที่ได้จากการคำนวณสูงกว่าค่า t จากตารางแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างข้อมูลความเข้มข้นสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่เวลาเริ่มต้นกับที่เวลาต่าง ๆ การคำนวณค่า t ดูภาคผนวก ค

: เปรียบเทียบข้อมูลความเข้มข้นสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในพลาสมาที่เวลาเริ่มต้นกับที่เวลา 7, 14 และ 30 วัน หลังจากเก็บในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ. ที่ช่วงความเชื่อมั่น (confidence interval) 90% การคำนวณดูภาคผนวก ค

<u>ส่วนที่ 6 การศึกษาระยะเวลาของการเก็บสารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอลในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ.</u>

สารละลาย 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนในเมทานอล เป็นสารละลายที่ถูกเตรียมไว้ เพื่อใช้สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ทุกครั้งของการวิเคราะห์ การศึกษานี้จึงเป็นการดูว่าจำเป็นต้องเตรียมสารละลายนี้ใหม่ทุกครั้งที่จะใช้หรือไม่ โดยได้ทำการศึกษาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 3 ความเข้มข้นคือ 400, 200 และ 40.0 มคก./มล. เปรียบเทียบพื้นที่พีคของ 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนที่ได้จากการวิเคราะห์สารละลายที่เวลาต่าง ๆ คือ 7, 14, 21 และ 28 วัน หลังจากเก็บในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ. กับที่เวลาเริ่มต้น แต่ละความเข้มข้นใช้ตัวอย่างในการวิเคราะห์แต่ละครั้งจำนวน 5 ตัวอย่าง (n=5)

<u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

- คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของพื้นที่พีคของสาร 2-เมทอกซี-1,4-เนฟโทควิโนนที่เวลาต่าง ๆ เทียบกับที่เวลาเริ่มต้น

$$\% \text{ การเปลี่ยนแปลง} = \frac{\text{พื้นที่พีค}_{t_0} - \text{พื้นที่พีค}_{t}}{\text{พื้นที่พีค}_{t_0}} \times 100\%$$

เมื่อพื้นที่พีค$_{t_0}$, พื้นที่พีค$_{t}$ เป็นพื้นที่พีคของสารที่เวลาเริ่มต้นและที่เวลาใด ๆ หลังจากเก็บไว้ในช่องแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -20°ซ. ตามลำดับ

เกณฑ์การตัดสินการเปลี่ยนแปลง :- จะถือว่าสารมีการเปลี่ยนแปลงไปจากที่เวลาเริ่มต้น เมื่อ % การเปลี่ยนแปลงของพื้นที่พีคของสาร $\geq \pm$ 10%

- เปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างพื้นที่พีคของสารที่เวลาเริ่มต้นกับที่เวลาใด ๆ ว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ โดยใช้ Paired Student's t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถ้าค่า t ที่ได้จากการคำนวณสูงกว่าค่า t จากตาราง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างพื้นที่พีคของสารที่เวลาเริ่มต้นกับที่เวลาต่าง ๆ การคำนวณค่า t ดูภาคผนวก ค