บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การหาภาวะการทดลองทางแก๊สโครมาโทกราฟีที่เหมาะสมของเปลาโนทอล

ภาวะการทดลองของการวิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอลในเฮกเซน ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีที่สร้างขึ้น มีรายละเอียดของภาวะที่ใช้ดังต่อไปนี้

อินเจคเตอร์ (injector) : ใช้ระบบการฉีดสารแบบอัตโนมัติ (automatic sample mode) สำหรับสารละลายเปลาโนทอลในแต่ละความเข้มข้นซึ่งจะต้องทำการตั้งค่าการฉีดสารทั้งก่อนและหลังการฉีดสารละลายเปลาโนทอล ดังนี้

การตั้งค่าการชะล้างก่อนการฉีดสารละลายเปลาโนทอล (pre-injection) ตามลำดับ ดังนี้

- ปริมาตรของสารละลายเฮกเซนใน vial-A เท่ากับ 10 ไมโครลิตร ล้างทั้งหมด 3 ครั้ง
- ปริมาตรของสารละลายเฮกเซนใน vial-B เท่ากับ 10 ไมโครลิตร ล้างทั้งหมด 3 ครั้ง
- ปริมาตรของสารละลายเปลาโนทอลในเฮกเซน 10 ไมโครลิตร ล้างทั้งหมด 3 ครั้ง
- จำนวนครั้งของปั๊มเพื่อไล่อากาศออกจากเข็มจำนวน 5 ครั้ง
- ปริมาตรของสารละลายเปลาโนทอลที่ฉีดเข้าคอลัมน์ต่อตัวอย่าง เท่ากับ 1 ไมโครลิตร

หลังจากการฉีดสารละลายเปลาโนทอลแล้วเครื่องจะทำการล้างเข็มภายหลังการฉีดต่อไป

การตั้งค่าการชะล้างหลังการฉีดสารละลายเปลาโนทอล (post-injection) ตามลำดับ ดังนี้

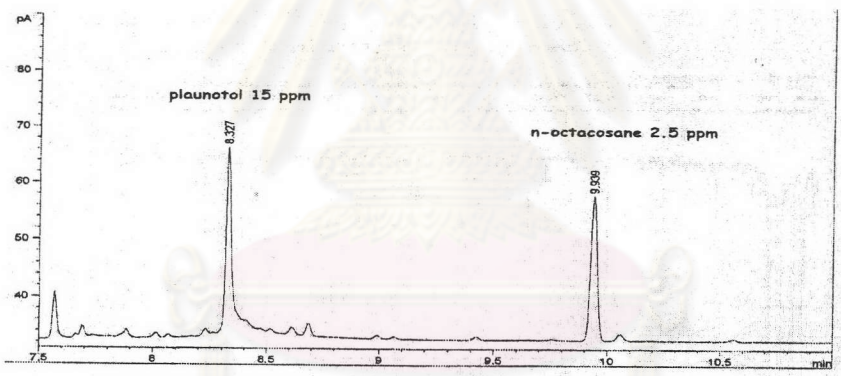
- ปริมาตรของสารละลายเฮกเซนใน vial-A เท่ากับ 10 ไมโครลิตร ล้างทั้งหมด 3 ครั้ง
- ปริมาตรของสารละลายเฮกเซนใน vial-B เท่ากับ 10 ไมโครลิตร ล้างทั้งหมด 3 ครั้ง

หมายเหตุ ขนาดของเข็ม (syringe size) เท่ากับ 10 ไมโครลิตร

อินเลต (inlet) : ใช้ระบบ splitless mode โดยมีแก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาซึ่งมีอัตราการไหลของแก๊สทั้งหมด (total gas) เท่ากับ 25 มิลลิลิตร/นาที ตั้งค่าที่ระบบ gas saver mode เท่ากับ 20 มิลลิลิตร/นาที เพื่อประหยัดแก๊ส อุณหภูมิที่ใช้เท่ากับ 200 องศาเซลเซียส

<u>คอลัมน์ (column)</u> : ใช้แคปปิลลารีคอลัมน์ชนิด HP-1 ซึ่งมี 1 % phenyl-methyl siloxane เป็นเฟสที่อยู่กับที่ ตั้งระบบความดันคงที่ (constant pressure mode) ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา อัตราเร็ว 1.8 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิที่ใช้เป็น multi - linear temperature program ซึ่งก็คือการควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ โดยเริ่มต้นที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ก่อนแล้วจึงค่อยเพิ่มอุณหภูมิขึ้นในอัตราเร็ว 50 องศาเซลเซียส/นาที จนถึงอุณหภูมิที่ 285 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้วิเคราะห์ทั้งหมด 11 นาที

<u>ดีเทคเตอร์ (detector)</u> : ใช้ดีเทคเตอร์ชนิดเฟลมไอออไนเซชัน (flame ionization detector, FID.) อุณหภูมิที่ใช้เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส อัตราเร็วของแก๊สไฮโดรเจน (hydrogen gas) เท่ากับ 40 มิลลิลิตร/นาที อัตราเร็วของอากาศ (air gas) เท่ากับ 300 มิลลิลิตร/นาที และอัตราเร็วของไนโตรเจนเมคอัพแก๊ส (nitrogen make-up gas) เท่ากับ 25 มิลลิลิตร/นาที



รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลในเฮกเซน ความเข้มข้น 15.0 ppm

จากผลการทดลองจะเห็นว่าภาวะของแก๊สโครมาโทกราฟีที่ใช้ สำหรับวิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทั้งในเฮกเซนและที่เติมลงในพลาสมามีความเหมาะสม โดยเป็นการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์จากเดิมที่เคยใช้แพคคอลัมน์ มาเป็นการใช้แคปปิลารีคอลัมน์แทน ทั้งนี้เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่ามีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ที่ดีกว่าการใช้แพคคอลัมน์ จากโครมาโทแกรมที่ได้ ดังในรูปที่ 4.1 เมื่อทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลในเฮกเซนที่ความเข้มข้น 15.0 ppm พบว่ามีความเหมาะสมเนื่องจากมีค่ารีเทนชันไทม์ที่ประมาณ 8.3 นาที ส่วนนอร์

T002296833

มอลออกตาโคเซนความเข้มข้น 2.5 ppm ที่ใช้เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด มีค่ารีเทนชันไทม์ที่ประมาณ 10.0 นาที ถือว่าไม่ใช้เวลาในการวิเคราะห์สารทั้งสองชนิดนานจนเกินไป

ใช้ระบบการฉีดสารในลักษณะที่เป็น splitless mode ซึ่งเหมาะที่จะใช้วิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยมาก (trace analysis) ในระดับต่ำคือ ppm หรือ ppb ได้ ถึงแม้ว่าจะใช้เวลาในการวิเคราะห์นานกว่าระบบการฉีดสารในลักษณะที่เป็น split mode ก็ตาม เพราะโดยปกติแล้วการวิเคราะห์ในลักษณะที่เป็น split-less mode นี้จะให้ค่ารีเทนชันไทม์ที่มากกว่านี้ เนื่องจากจำเป็นต้องตั้งค่าอุณหภูมิเริ่มต้นที่อินเลต (inlet temperature) ก่อนการวิเคราะห์ต่ำ ๆ ก่อนเพื่อให้เกิดการสะสมของโมเลกุลของสารที่จะวิเคราะห์ที่บริเวณภายในอินเลตมีมากขึ้นทำให้ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์สารเปลาโนทอลสำหรับขั้นตอนนี้นาน หลังจากนั้นจึงค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิในลักษณะที่เป็น multi-linear temperature program ที่เหมาะสมต่อไป

โครมาโทแกรมในรูปที่ 4.1 พีก (peak) ของเปลาโนทอลที่มีลักษณะเป็นหาง (tailing) เล็กน้อย เนื่องจากเปลาโนทอลเป็นสารประกอบแอลกอฮอล์ที่มีลักษณะเป็น อะไซคลิกไดเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ ซึ่งโดยธรรมชาติสารประกอบอินทรีย์ประเภทแอลกอฮอล์ โดยทั่วไปจะให้พีกของโครมาโทแกรมที่มีลักษณะเช่นนี้อยู่แล้ว เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซี (hydroxy group) จะเกิดอันตรกิริยา (interaction) ได้ดีกับ 1 % phenyl-methyl siloxane ซึ่งเป็นเฟสที่อยู่กับที่ ในคอลัมน์ชนิด HP-1 ที่เลือกใช้ในการทดลองนี้ นอกจากนี้ค่ารีเทนชันไทม์ที่ได้อยู่ที่ประมาณ 8.3 นาทีซึ่งไม่ใช้เวลาในการที่ดีเทคเตอร์จะตรวจจับโมเลกุลของเปลาโนทอลนานจนเกินไป

4.2 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเปลาโนทอลในพลาสมาโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็ง

วิธีการสกัดเปลาโนทอลที่เติมลงในพลาสมาที่ได้พัฒนาขึ้นนั้น ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักที่สำคัญคือ

1. การตกตะกอนโปรตีนในพลาสมาด้วยแอซีโตรไนไตรล์
2. การกำจัด (washing step) สารรบกวนต่าง ๆ โดยเฉพาะสารจำพวกเกลืออินทรีย์และเกลืออนินทรีย์ที่มีอยู่ในพลาสมาออกไป
3. การชะ (elution step) สารเปลาโนทอลในแต่ละความเข้มข้นออกจากพลาสมา ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้เลือกชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิดเป็นตัวชะคือ เฮกเซน, เอทิลอะซีเตต : เฮกเซน ในอัตราส่วน 3 : 2 และเอทานอลสัมบูรณ์

พบว่าการใช้ตัวชะที่เป็นเฮกเซนและเอทิลอะซีเตต:เฮกเซน (3:2) ได้โครมาโทแกรม ดังรูปที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ จะเห็นว่าปรากฏพีกของสารรบกวนอยู่เป็นจำนวนมาก ทั้งยังมีการทับซ้อนกันกับพีกของเปลาโนทอลเมื่อเทียบกับโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลในเฮกเซนตามปกติ ดังรูปที่ 4.1 จึงไม่สามารถนำตัวชะทั้ง 2 ชนิดนี้ มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณได้ ในขณะที่การใช้ตัวชะที่เป็นเอทานอลสัมบูรณ์ได้โครมาโทแกรม ดังรูปที่ 4.4 จะเห็นว่ามีลักษณะดีที่สุด เนื่องจากลักษณะโครมาโทแกรมของเปลาโนทอลในพลาสมา ไม่มีการรบกวนจากสารรบกวนที่มีอยู่ในพลาสมา เมื่อเทียบกับโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลในเฮกเซนตามปกติ ดังรูปที่ 4.1 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากความแรง (elutropic strength) ในการชะเปลาโนทอลออกจากพลาสมาเมื่อใช้เอทานอลสัมบูรณ์เป็นตัวชะนั้น มีความแรงของการชะที่เหมาะสมต่อการชะเปลาโนทอลออกจากพลาสมาได้ในขณะที่สารรบกวนอื่น ๆ ที่มีอยู่ในพลาสมามาไม่สามารถชะออกมาได้โดยยังคงค้างและเกาะติดอยู่กับเฟสที่อยู่กับที่ของ Sep-pak C18 SPE cartridge column

4.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์เปลาโนทอลในพลาสมาที่ได้พัฒนาขึ้น

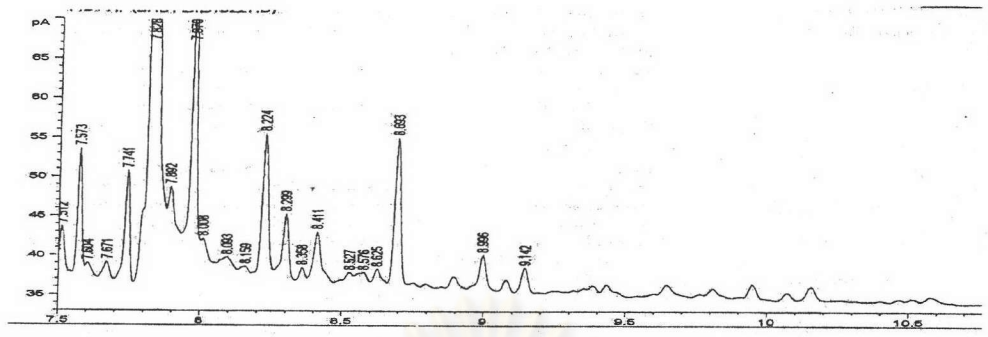
4.3.1 การหาขีดจำกัดของการวัดได้ (LOD) และขีดจำกัดของการหาปริมาณ (LOQ)

จากการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลในเฮกเซน ที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณของเปลาโนทอลต่อสัญญาณรบกวนเป็น 3:1 เพื่อหาค่า LOD ดังรูปที่ 4.5 พบว่ามีค่า LOD เท่ากับ 1.9 ± 0.1 ppm ดังตารางที่ 4.1

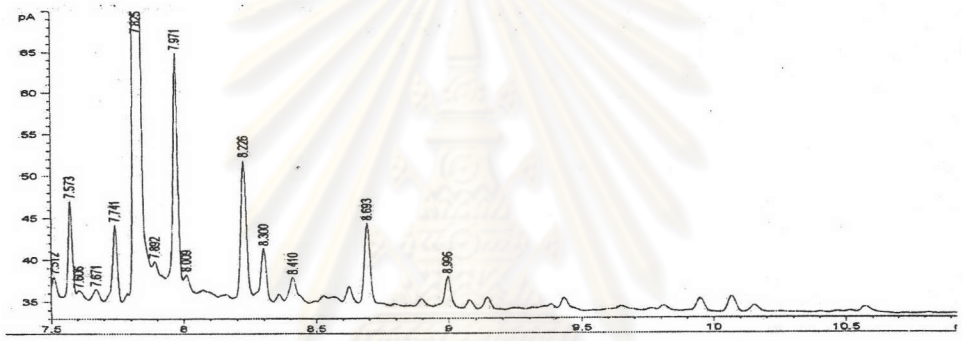
จากการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารละลายเปลาโนทอลที่เติมลงในพลาสมาซึ่งผ่านการสกัดมาแล้วตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น ที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณของเปลาโนทอลต่อสัญญาณรบกวนเป็น 3:1 เพื่อหาค่า LOD ดังรูปที่ 4.6 พบว่ามีค่า LOD เท่ากับ 2.0 ± 0.2 ppm ดังตารางที่ 4.1

จากการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลในเฮกเซน ที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณของเปลาโนทอลต่อสัญญาณรบกวนเป็น 10:1 เพื่อหาค่า LOQ ดังรูปที่ 4.7 พบว่ามีค่า LOQ เท่ากับ 2.9 ± 0.1 ppm ดังตารางที่ 4.1

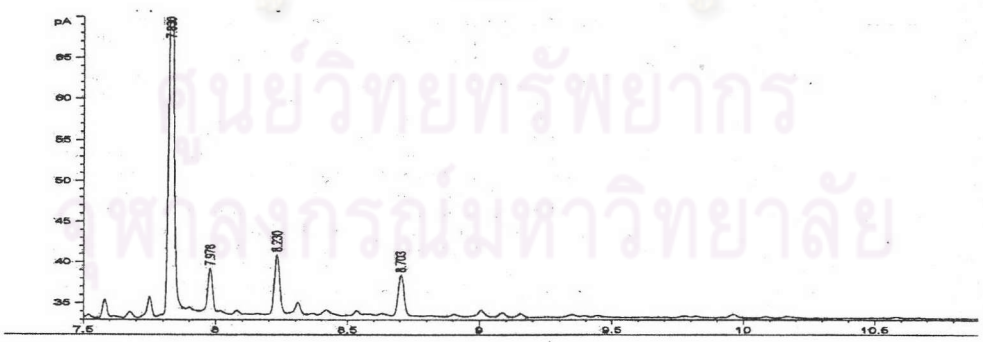
จากการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารละลายเปลาโนทอลที่เติมลงในพลาสมาซึ่งผ่านการสกัดมาแล้วตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น ที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณของเปลาโนทอลต่อสัญญาณรบกวนเป็น 10:1 เพื่อหาค่า LOQ ดังรูปที่ 4.8 พบว่า มีค่า LOQ เท่ากับ 3.1 ± 0.2 ppm ดังตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.2 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์เปลาโนทอลที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายสำหรับชะเปลาโนทอลออกจากพลาสมา



รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์เปลาโนทอลที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้เอทิลอะซีเตต:เฮกเซน ในอัตราส่วน 3:2 เป็นตัวทำละลายสำหรับชะเปลาโนทอลออกจากพลาสมา



รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรม ที่ได้จากการวิเคราะห์เปลาโนทอลที่เติมลงในพลาสมา โดยใช้เอทานอลสัมบูรณ์เป็นตัวทำละลายสำหรับชะเปลาโนทอลออกจากพลาสมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1 ขีดจำกัดของการวัดได้ (LOD) และขีดจำกัดของการหาปริมาณ (LOQ)

ครั้งที่	LOD (ppm) ในเมทริกซ์ที่เป็น		LOQ (ppm) ในเมทริกซ์ที่เป็น	
	เฮกเซน	พลาสมา	เฮกเซน	พลาสมา
1	1.8	1.8	3.1	3.2
2	2.1	2.2	3.1	2.9
3	2.0	1.8	2.8	3.1
4	1.9	2.1	2.9	-
5	2.0	2.2	3.0	2.8
mean ± SD	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.2	2.9 ± 0.1	3.1 ± 0.2

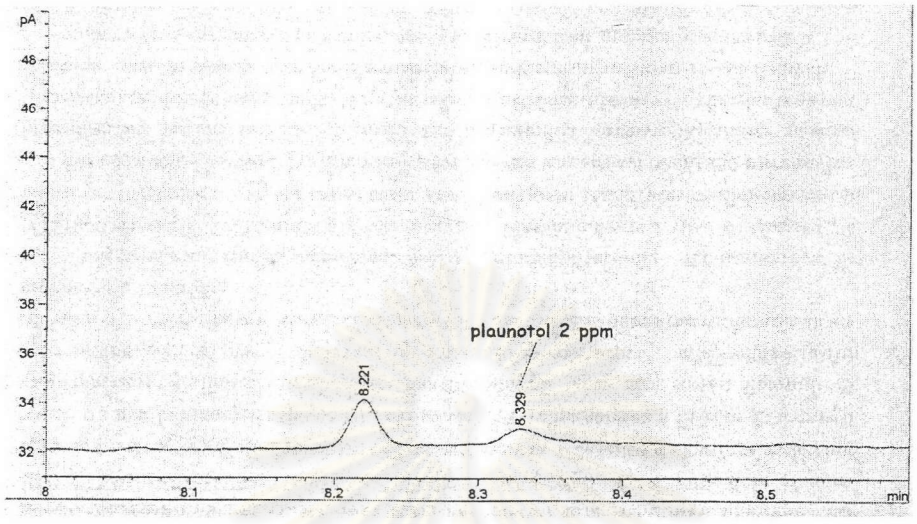
หมายเหตุ (-) หมายถึง ตรวจไม่พบสาร

4.3.2 ความจำเพาะของการวิธีวิเคราะห์

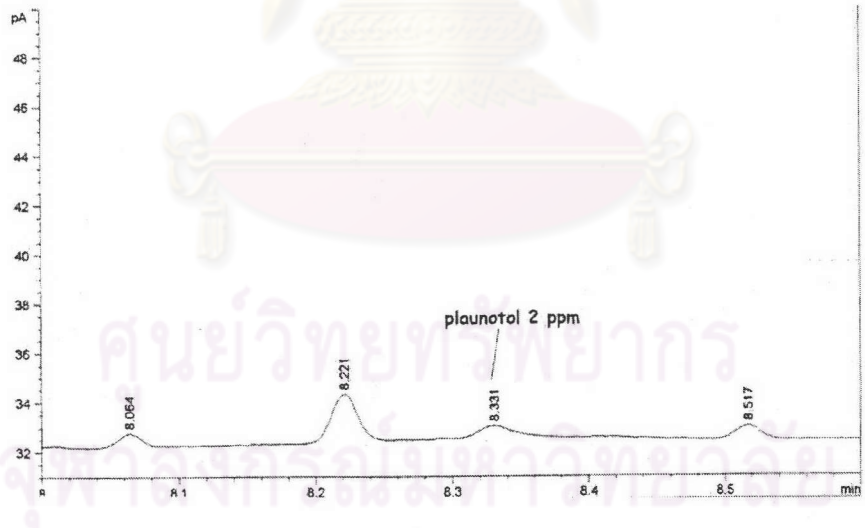
จากการวิเคราะห์หาปริมาณเปลาโนทอลที่เติมลงในพลาสมาโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยวัฏภาคของแข็งที่ได้พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะสูง เนื่องจากลักษณะโครมาโทแกรมของเปลาโนทอลในพลาสมาไม่มีการรบกวนจาก endogenous substances ที่อยู่ในพลาสมา ดังรูปที่ 4.9

4.3.3 ช่วงของความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง

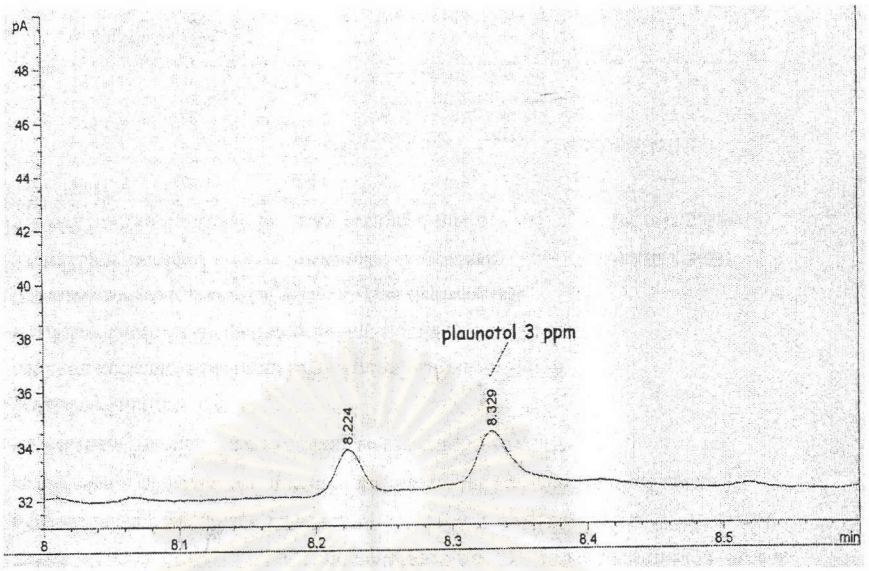
จากการเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลที่ความเข้มข้น 5.0 – 20.0 ppm ในเฮกเซน ในแต่ละวันที่ทำการทดลองทั้งสิ้น 5 วัน ได้โครมาโทแกรม ดังรูปที่ 4.10 จากนั้นหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกของเปลาโนทอล/นอร์มอลออกตาโคเซนกับความเข้มข้นของเปลาโนทอลทั้ง 5 ความเข้มข้น ผลที่ได้นำมาเขียนกราฟระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกของเปลาโนทอล/นอร์มอลออกตาโคเซน (แกน x) กับความเข้มข้นของเปลาโนทอลในพลาสมา (แกน y) ได้ความสัมพันธ์ที่เป็นกราฟเส้นตรงโดยมีสมการเส้นตรงคือ $y = 0.0999x - 0.3635$ และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9921 ของการทดลองในวันที่ 1 ดังรูปที่ 4.11



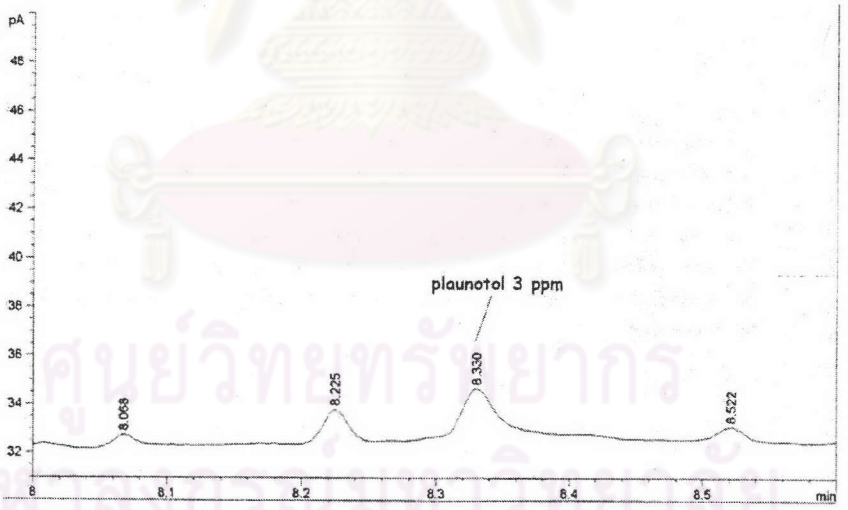
รูปที่ 4.5 ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลในเฮกเซนที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณของเปลาโนทอลต่อสัญญาณรบกวนเป็น 3:1 เพื่อหาค่า LOD



รูปที่ 4.6 ความเข้มข้นของสารละลายเปลาโนทอลที่เติมลงในพลาสมาซึ่งผ่านการสกัดมาแล้วตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณของเปลาโนทอลต่อสัญญาณรบกวนเป็น 3:1 เพื่อหาค่า LOD



รูปที่ 4.7 ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลในเฮกเซนที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณของเปลาโนทอลต่อสัญญาณรบกวนเป็น 10:1 เพื่อหาค่า LOQ

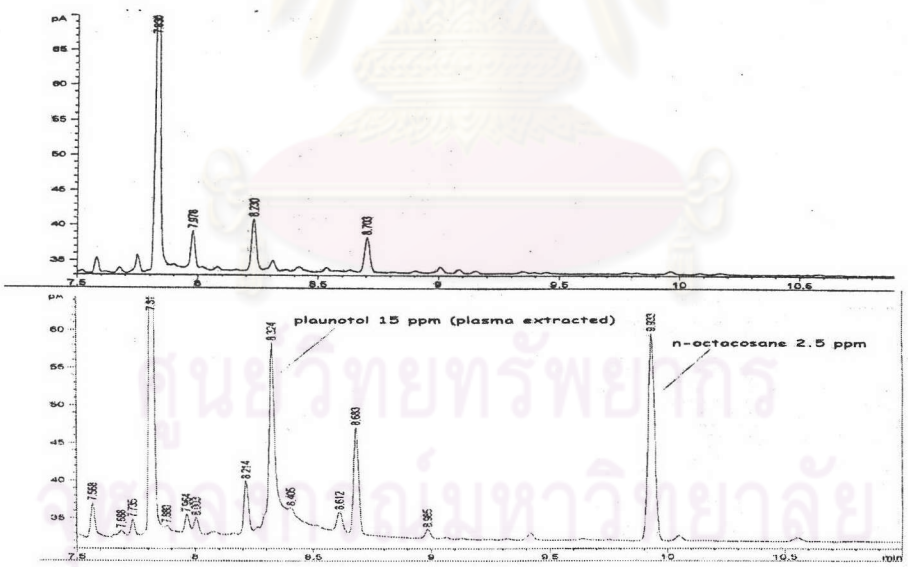


รูปที่ 4.8 ความเข้มข้นของสารละลายเปลาโนทอลที่เติมลงในพลาสมาซึ่งผ่านการสกัดมาแล้วตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นที่ให้ค่าอัตราส่วนของสัญญาณของเปลาโนทอลต่อสัญญาณรบกวนเป็น 10:1 เพื่อหาค่า LOQ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายเปลาโนทอลที่ความเข้มข้นในช่วงเดียวกันซึ่งเติมลงในพลาสมาแล้วทำการสกัดตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น ได้โครมาโทแกรม ดังรูปที่ 4.12 หาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกของเปลาโนทอล/นอร์มอลออกตาโคเซนกับความเข้มข้นของเปลาโนทอลทั้ง 5 ความเข้มข้น ผลที่ได้นำมาเขียนกราฟระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกของเปลาโนทอล/นอร์มอลออกตาโคเซน (แกน x) กับความเข้มข้นของเปลาโนทอลในพลาสมา (แกน y) ได้ความสัมพันธ์ที่เป็นกราฟเส้นตรงโดยมีสมการเส้นตรงคือ $y = 0.0992x - 0.3628$ และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9973 ดังรูปที่ 4.13

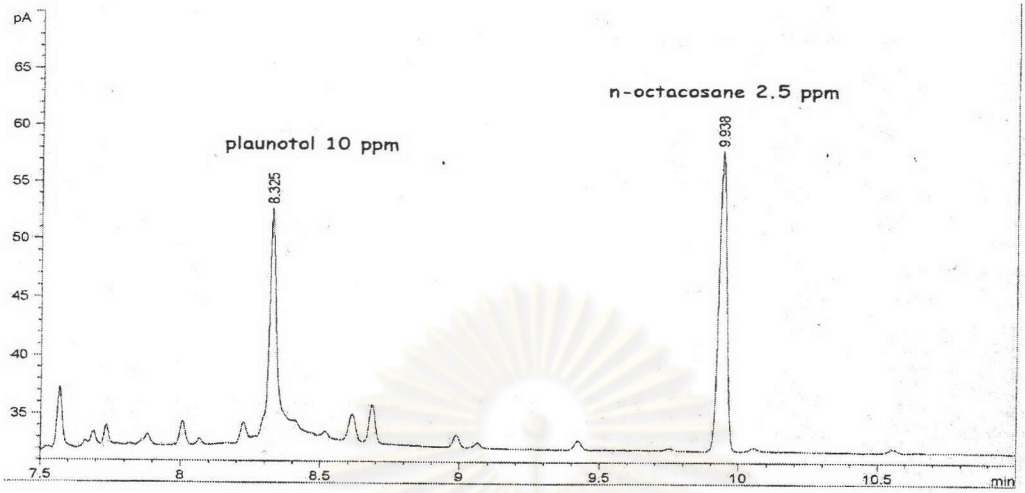
ดังนั้นสามารถใช้กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลในเฮกเซน เพื่อใช้ในการศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์ แทนการใช้กราฟมาตรฐานของสารละลายเปลาโนทอลที่เติมลงในพลาสมาได้ เนื่องจากสมการเส้นตรงที่ได้จากเมทริกซ์ที่ต่างกันคือเฮกเซนและพลาสมา มีค่าความชันเท่ากับ 0.0999 และ 0.0992 ตามลำดับ ซึ่งถือว่าใกล้เคียงกัน หาสมการเส้นตรงที่ได้จากการเตรียมกราฟมาตรฐานของเปลาโนทอลในเฮกเซนของการทดลองในวันอื่น ๆ เป็นเวลา 5 วัน ดังตารางที่ 4.2



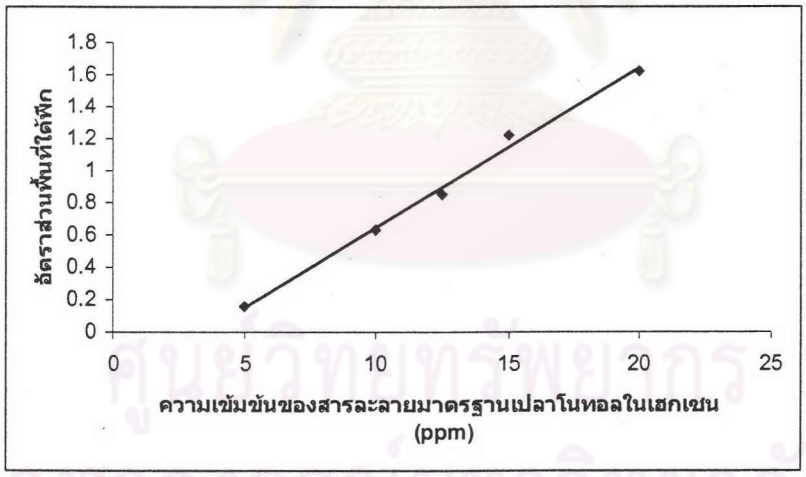
รูปที่ 4.9 โครมาโทแกรมของพลาสมา (blank) เทียบกับโครมาโทแกรมของพลาสมาที่เติมเปลาโนทอลความเข้มข้น 15.0 ppm

บน : โครมาโทแกรมของพลาสมา (blank) ที่ผ่านการสกัดตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น

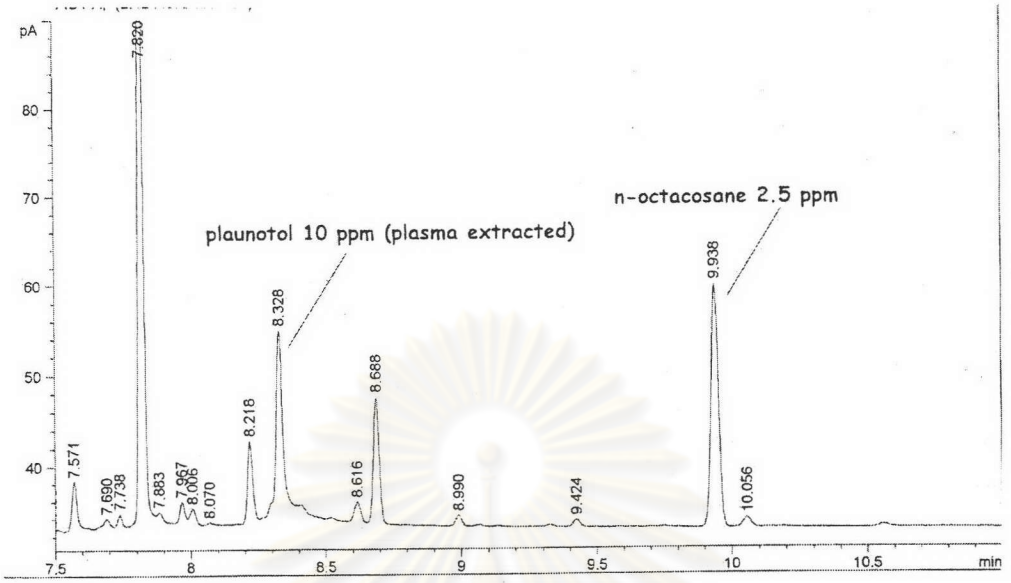
ล่าง : โครมาโทแกรมของพลาสมาที่เติมเปลาโนทอลความเข้มข้น 15.0 ppm ซึ่งผ่านการสกัดตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น



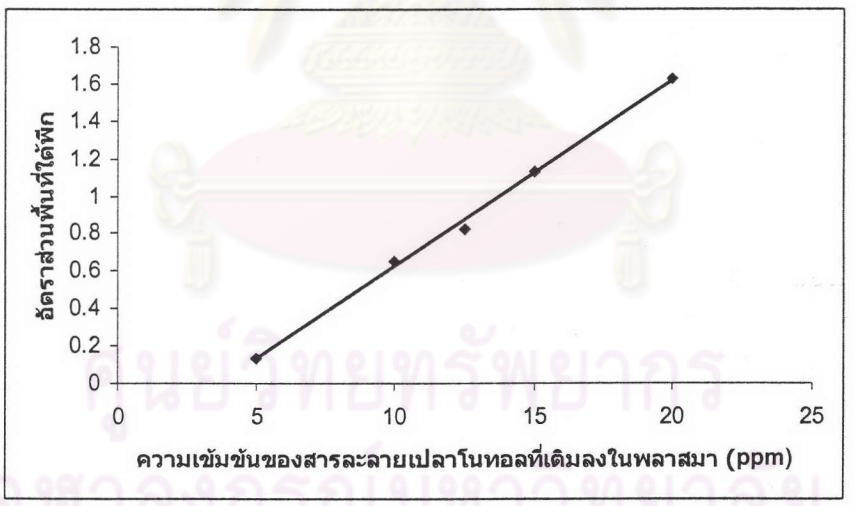
รูปที่ 4.10 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลความเข้มข้น 10.0 ppm
ในเฮกเซนโดยมีนอร์มอลออกตาโคเซนความเข้มข้น 2.5 ppm
เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด



รูปที่ 4.11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกเปลาโนทอลต่อนอร์
มอลออกตาโคเซน 2.5 ppm ในเมทริกซ์ที่เป็นเฮกเซนของการทดลองวันที่ 1
สมการของเส้นตรงคือ $y = 0.0999x - 0.3536$
ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9921



รูปที่ 4.12 โครมาโทแกรมของสารละลายเปลาโนทอลความเข้มข้น 10.0 ppm ที่เติมลงในพลาสมาโดยมีนอร์มอลออกตาโคเซนความเข้มข้น 2.5 ppm เป็นอินเทอร์นอลสแตนดาร์ด



รูปที่ 4.13 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีกเปลาโนทอลต่อนอร์มอลออกตาโคเซน 2.5 ppm ในเมทริกซ์ที่เป็นพลาสมา
สมการของเส้นตรงคือ $y = 0.0992x - 0.3628$
ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9973

ตารางที่ 4.2 สมการเส้นตรง (y = mx + c) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ที่ได้จากการเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเปลาโนทอลในเฮกเซนในแต่ละวันที่ทำการทดลอง

การทดลองวันที่	สมการเส้นตรง (y = mx + c)	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2)
1	y = 0.0999x – 0.3536	0.9921
2	y = 0.1021x – 0.3681	0.9954
3	y = 0.0954x – 0.3102	0.9924
4	y = 0.1009x – 0.3708	0.9935
5	y = 0.0956x – 0.3076	0.9945

4.3.4 ความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ใน 1 วัน

จากการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารละลายเปลาโนทอลในพลาสมาที่ตรวจพบทั้ง 5 ความเข้มข้น ซึ่งผ่านการสกัดมาแล้วตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น ได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 4.12 ทำซ้ำในแต่ละความเข้มข้นจำนวน 5 ซ้ำ (n = 5) เทียบจากสมการเส้นตรง y = 0.0999x–0.3536 ของการทดลองในวันที่ 1 ดังตารางที่ 4.2 ได้ค่าความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ ซึ่งแสดงในรูปของค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืน ดังตารางที่ 4.3 พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 89.2 –104.2 % ซึ่งถือว่ายอมรับได้ และมีค่า RSD (%) อยู่ระหว่าง 1.1–5.0 % ถือว่ามีความผันแปรน้อยในแต่ละความเข้มข้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 ความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอลที่เติมลงในพลาสมา เมื่อทำการวิเคราะห์ใน 1 วันของการทดลองวันที่ 1

ความเข้มข้นของเปลาโนทอลในพลาสมาที่เตรียมขึ้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของเปลาโนทอล (ครั้งที่)					mean ± SD	%RSD	%RSD มากสุดที่ยอมรับได้
	1	2	3	4	5			
20.0	90.5	93.4	100.3	97.6	102.4	96.8 ± 4.8	5.0	6.3
15.0	87.4	88.4	89.5	90.1	90.7	89.2 ± 1.3	1.5	7.0
12.5	93.7	93.9	92.8	94.5	92.0	93.4 ± 0.9	1.1	7.2
10.0	99.7	98.5	96.6	94.6	93.7	96.6 ± 2.5	2.7	7.5
5.0	104.0	108.0	103.0	103.4	102.8	104.2 ± 2.2	2.1	8.3

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เปลาโนทอลที่เติมลงในพลาสมาที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ ถือว่ามีประสิทธิภาพและให้ผลการวิเคราะห์ที่ดี สำหรับช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงทั้ง 5 ความเข้มข้น คือ 5.0 ppm ถึง 20.0 ppm เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ใน 1 วันนั้นให้ค่าความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ ที่แสดงในรูปของค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของเปลาโนทอลทุกข้อมูล อยู่ในระดับที่ยอมรับได้คืออยู่ในช่วง 80.0–110.0 % ตามข้อกำหนดของ AOAC international (78, 79) ในขณะที่ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้ จากการศึกษาความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ภายใน 1 วันนั้น ทุกข้อมูลมีค่าน้อยกว่าค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เกินค่าที่กำหนดไว้ ตามมาตรฐานของ AOAC international เพียงเล็กน้อย โดยดูจากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มากสุดที่ยอมรับได้ซึ่งคำนวณได้จากสูตร (%RSD) = $0.67 \times 2^{(1-0.5\log C)}$ เมื่อ C คือความเข้มข้นในหน่วย g/g (80) นอกจากนี้ค่ารีเทนชันไทม์ที่ได้จากการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันมีค่า mean ± SD และ %RSD เท่ากับ 8.326 ± 0.3 และ 3.6 % ตามลำดับ สำหรับเปลาโนทอลและมีค่า mean ± SD และ %RSD เท่ากับ 9.937 ± 0.4 และ 4.0 % ตามลำดับ สำหรับนอร์มอลออกตาโคเซน ซึ่งยอมรับได้เพราะมีค่า %RSD น้อยกว่า 5.0 %

4.3.5 ความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ระหว่างวัน

จากการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารละลายเปลาโนทอลในพลาสมาที่ตรวจพบทั้ง 5 ความเข้มข้น ซึ่งผ่านการสกัดมาแล้วตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้น ทำการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษา

ความเที่ยงของการวิเคราะห์ใน 1 วัน ทำการทดลองทั้งสิ้น 5 วัน (n = 5) เทียบจากสมการเส้นตรง y = mx + c ของการทดลองในแต่ละวันดังตารางที่ 4.2 ได้ค่าความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ซึ่งแสดงในรูปของค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืน ดังตารางที่ 4.4 พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 87.4 – 100.3 % ซึ่งถือว่ายอมรับได้ และมีค่า RSD อยู่ระหว่าง 0.8–7.6 % ถือว่ามีความผันแปรน้อยในความเข้มข้นที่ 5.0 ppm, 10.0 ppm, และ 15.0 ppm ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 12.5 ppm และ 20.0 ppm มีค่าสูงเนื่องจากมีค่าความคลาดเคลื่อนที่ไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด

ในขณะที่ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่ได้ จากการศึกษาความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ระหว่างวัน มีค่ามากกว่าค่าที่ได้จากการศึกษาความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ภายใน 1 วัน ที่ความเข้มข้น 20.0 ppm และ 12.5 ppm มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เกินค่าที่กำหนดไว้ตามมาตรฐานของ AOAC international เพียงเล็กน้อย โดยดูจากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์มากสุดที่ยอมรับได้ซึ่งคำนวณได้จากสูตร (%RSD) = $0.67 \times 2^{(1-0.5\log C)}$ เมื่อ C คือความเข้มข้นในหน่วย g/g (80) นอกจากนี้ค่ารีเทนชันไทม์ที่ได้จากการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันมีค่า mean ± SD และ %RSD เท่ากับ 8.327 ± 0.4 และ 4.8 % ตามลำดับ สำหรับเปลาโนทอลและมีค่า mean ± SD และ %RSD เท่ากับ 9.938 ± 0.5 และ 5.0 % ตามลำดับ สำหรับนอร์มอลออกตาโคเซน ซึ่งยอมรับได้เพราะมีค่า %RSD น้อยกว่า 5.0 %

ตารางที่ 4.4 ความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอลที่เติมลงในพลาสมา
เมื่อทำการวิเคราะห์ระหว่างวัน

ความเข้มข้นของเปลาโนทอลในพลาสมาที่เตรียมขึ้น (ppm)	เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของเปลาโนทอล (ครั้งที่)					mean ± SD	%RSD	%RSD มากสุดที่ยอมรับได้
	1	2	3	4	5			
20.0	96.8	91.5	87.1	81.2	80.4	87.4 ± 6.6	7.6	6.3
15.0	89.2	91.2	93.1	90.4	91.6	91.1 ± 1.5	1.6	7.0
12.5	93.4	84.1	101.9	83.0	94.5	91.4 ± 7.8	8.5	7.2
10.0	96.6	97.3	96.5	98.4	96.7	97.1 ± 0.9	0.8	7.5
5.0	104.2	96.3	94.8	103.3	103.3	100.3 ± 4.5	4.4	8.3

โดยภาพรวมแล้วจะเห็นว่ายิ่งมีค่าความเข้มข้นที่น้อยลงคือที่ 12.5 ppm, 10.0 ppm และ 5 ppm จะยิ่งมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ที่น้อยลง ในขณะที่ความเข้มข้นที่มากขึ้นคือที่ 15.0 ppm และ 20.0 ppm กลับมีค่ามากขึ้น ซึ่งสวนทางกับความเป็นจริงที่ว่ายิ่งความเข้มข้นที่น้อยลง โอกาสของการเกิดความผิดพลาดจากการวิเคราะห์จะมากขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากเปลาโนทอลเป็นสารที่มีความเป็นขั้วน้อย ในขณะที่ตัวชะเปลาโนทอลออกจากพลาสมา ซึ่งในที่นี้ใช้เอทานอลสัมบูรณ์ นั้นถือว่าเป็นตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูง ทำให้ยิ่งเปลาโนทอลที่มีความเข้มข้นมากขึ้นคือ 15.0 ppm และ 20.0 ppm หรืออาจสูงกว่านั้น มีโอกาสที่จะชะเปลาโนทอลออกจากพลาสมาจะน้อยลงในขณะที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ คือ 12.5 ppm, 10.0 ppm และ 5.0 ppm นั้น เพียงพอที่จะถูกชะออกมาได้ด้วยเอทานอลสัมบูรณ์ เนื่องจากเปลาโนทอลมีหมู่ไฮดรอกซี (-OH group) อยู่ 2 หมู่ซึ่งมีความเป็นขั้วเล็กน้อยที่เอทานอลสัมบูรณ์สามารถชะเปลาโนทอลออกมาได้เกือบหมด

วิธีการสกัดเปลาโนทอลออกจากพลาสมาที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ มีประสิทธิภาพและข้อดีอยู่หลายประการคือ ลักษณะโครมาโทแกรมที่ได้ไม่มีการรบกวนของสารธรรมชาติที่มีอยู่ในพลาสมา เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสารภายหลังการสกัดมีค่าสูงและอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ขั้นตอนการสกัดไม่ยุ่งยาก เวลาที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์สารน้อย รวมถึงประหยัดค่าใช้จ่ายในการสกัด สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นวิธีมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอลจากตัวอย่างพลาสมาของผู้ป่วยต่อไป ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จำเป็นต่อการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเปลาโนทอล เภสัชจลนศาสตร์ของเปลาโนทอล และประโยชน์ต่อการควบคุมระดับเปลาโนทอลในผู้ป่วย ตลอดจนการพัฒนาตำรับยา และการศึกษาการเอื้อประโยชน์สมมูลในร่างกายต่อไป

อย่างไรก็ตามเทคนิคที่ได้พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ยังไม่สามารถวิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอลที่เติมลงในพลาสมาให้มีปริมาณต่ำกว่าที่ควรจะเป็นได้ กล่าวคือมีค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการหาปริมาณที่ตรวจหาได้อยู่ในระดับ ppm เท่านั้น ซึ่งโดยความเป็นจริงแล้วควรที่จะตรวจวัดสารทั้งในแง่ของ LOD และ LOQ ได้ในระดับที่ต่ำกว่านี้ คือระดับ ppb ทั้งนี้อาจเนื่องจากข้อจำกัดของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีที่ใช้ ตลอดจนชนิดของดีเทคเตอร์ เป็นต้น และอาจรวมไปถึงลักษณะโครงสร้างทางเคมีของเปลาโนทอลที่สามารถจะวิเคราะห์ได้ในระดับ ppm นี้เท่านั้น ดังนั้นในอนาคตอาจมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดเปลาโนทอลในพลาสมาให้มีระดับต่ำถึง ppb ได้ต่อไป