

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การวิเคราะห์ปริมาณอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา โดยเปรียบเทียบ
ระหว่างเทคนิคไมเซลล์าร์ ลิควิด โครมาโทกราฟี และ
เทคนิครีเวอร์สเฟสลิควิด โครมาโทกราฟี

Direct Determination of acetaminophen in Plasma by Micellar Liquid
Chromatography Compare with Reversed-phase Liquid Chromatography

โดย

ศิริพร จันทศิริ

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

2543

การวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนจากงบประมาณรายได้
ประจำปีงบประมาณ 2540

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ปริมาณอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาด้วยเทคนิคไมเซลล์าร์ ลิกวิด โครมาโทกราฟี(MLC) และเทคนิครีเวอร์สเฟส ลิกวิด โครมาโทกราฟี(RPLC) มีกระบวนการวิเคราะห์แตกต่างกันที่ขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่าง โดยการเตรียมสารตัวอย่างพลาสมาในเทคนิคRPLC ใช้เวลานาน เนื่องจากต้องกำจัดโปรตีนในพลาสมาออกก่อน โดยวิธีการสกัดหรือตกตะกอน ซึ่งอาจทำให้สารตัวอย่างบางส่วนในพลาสมาสูญเสียไปได้ โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์อะเซตามิโนเฟนโดยเทคนิคRPLC คือใช้สารละลายโซเดียมไดดิลซิลเฟต 0.05 โมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตร/นาที ที่ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร

ส่วนในเทคนิคMLC สามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาได้ทันที โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการกำจัดโปรตีน ซึ่งทำให้เทคนิคMLC เป็นเทคนิคที่สามารถทำการวิเคราะห์ได้รวดเร็ว และมีความถูกต้องสูง แต่พบว่าคอลัมน์ที่ใช้แยกสารในเทคนิคMLC อายุการใช้งานจะสั้น สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์อะเซตามิโนเฟนโดยเทคนิคMLC คือ ใช้ 30%เมทานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ 0.75 มิลลิลิตร/นาที ที่ความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์หาปริมาณอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาโดยเทคนิคMLC และเทคนิคRPLC พบว่าทั้งสองเทคนิคไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Abstract

Determination of acetaminophen in plasma by Micellar Liquid Chromatography (MLC) and Reverse-phase Liquid Chromatography (RPLC) had different preparation of plasma procedures. Preparative procedure in RPLC had used long times because it required a removal of plasma protein by extraction and/or protein precipitation prior to chromatographic analysis. May be, some sample in plasma lost in this procedure. The optimum condition for analysis of acetaminophen in plasma by RPLC was 30% methanol mobile phase, flow rate 0.75 mL/min, wavelength 244 nm.

In the case of MLC, it can direct injection onto the chromatographic column without treated plasma. Thus, analysis time was shorten, less lost sample in plasma and high precision. But MLC had some problem about clog of analytical column which it made shorten life-time. The optimum condition for analysis of acetaminophen in plasma by MLC was 0.05 M sodium dodecyl sulphate mobile phase, flow rate 1.0 mL/min, wavelength 245 nm.

A comparison of analyses acetaminophen in plasma from RPLC and MLC using F-test showed that there was not a significant difference at 95% confidence limited

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎี	4
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	7
บทที่ 4 ผลการทดลอง	14
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	34
บรรณานุกรม	36



สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของอะเซตามิโนเฟน	3
รูปที่ 2 แสดงการแยกของผลสมของสาร 3 ชนิด	4
รูปที่ 3 แสดงกลไกการทำงานของไมเซลล์ที่เกิดขึ้นในเฟสเคลื่อนที่	6
รูปที่ 4 แสดงการดูดกลืนแสงของอะเซตามิโนเฟนที่ความยาวคลื่น 200 - 300 นาโนเมตร	14
รูปที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่กับการเคลื่อนที่ออกของอะเซตามิโนเฟน(capacity factor)	15
รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสภาพความเป็นกรด(pH)ที่ความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ต่างๆกับอัตราการเคลื่อนที่ออกของอะเซตามิโนเฟน	17
รูปที่ 7 แสดงกราฟมาตรฐานของอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา(MLC)	18
รูปที่ 8 แสดงโครมาโทแกรมในการวิเคราะห์หาปริมาณของอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาที่ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ : 0.05 โมลาร์ โซเดียมไดดีคิลซัลเฟต อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที	21
รูปที่ 9 แสดงโครมาโทแกรมการหาปริมาณของอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา เฟสเคลื่อนที่ : 15%MeOH	25
รูปที่ 10 แสดงโครมาโทแกรมการหาปริมาณของอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา เฟสเคลื่อนที่ : 20%MeOH	25
รูปที่ 11 แสดงโครมาโทแกรมการหาปริมาณของอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา เฟสเคลื่อนที่ : 25%MeOH	26
รูปที่ 12 แสดงโครมาโทแกรมการหาปริมาณของอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา เฟสเคลื่อนที่ : 30%MeOH	26
รูปที่ 13 แสดงโครมาโทแกรมการหาปริมาณของอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา เฟสเคลื่อนที่ : 35%MeOH	27
รูปที่ 14 แสดงโครมาโทแกรมของพลาสมา เฟสเคลื่อนที่ : 35%MeOH	27
รูปที่ 15 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า HETP กับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	28
รูปที่ 16 แสดงกราฟมาตรฐานของอะเซตามิโนเฟน(RPLC)	31
รูปที่ 17 แสดงโครมาโทแกรมการวิเคราะห์หาปริมาณอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาที่ความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่: 30%เมทานอล อัตราการไหล 0.75 มิลลิลิตร/นาที	32

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงค่าcapacity factor ของอะเซตามิโนเฟน เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไดดิลซัลเฟต	15
ตารางที่ 2	แสดงค่าcapacity factor ของอะเซตามิโนเฟน เมื่อเปลี่ยนแปลงสภาพความเป็นกรดของสารละลายโซเดียมไดดิลซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ	16
ตารางที่ 3	แสดงค่า%recovery ของเทคนิคไมเซลล์าร์ ลิกวิด โครมาโทกราฟี	19
ตารางที่ 4	แสดงความสูงพีคของสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาที่ความเข้มข้นต่างๆ	20
ตารางที่ 5	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 200-300 นาโนเมตร	22
ตารางที่ 6	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ความยาวคลื่น 240-250 นาโนเมตร	23
ตารางที่ 7	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่กับค่า capacity factor	24
ตารางที่ 8	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า HETP กับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่	28
ตารางที่ 9	แสดงเปอร์เซ็นต์การสกัดสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟน	29
ตารางที่ 10	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอะเซตามิโนเฟนกับค่าการดูดกลืนแสงของอะเซตามิโนเฟน	30
ตารางที่ 11	แสดงการเปรียบเทียบการหาปริมาณของอะเซตามิโนเฟนโดยเทคนิค MLC และเทคนิค RPLC	33

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันการใช้อยามีทั้งคุณและโทษถ้าใช้ไม่ถูกวิธี การใช้ยารักษาโรคที่มากเกินไปจนเกินไป จะมีผลเสียต่อร่างกายและชีวิต การวิเคราะห์หาปริมาณของสารตัวยาในร่างกายจึงมีความจำเป็น และควรควบคุมขนาดของตัวยาให้กับผู้ป่วย เนื่องจากการหาปริมาณของสารตัวยาในร่างกายมักใช้ของเหลวในร่างกาย (body fluid) เช่น ซีรัม (serum) พลาสมา (plasma) และปัสสาวะ เป็นต้น การวิเคราะห์หาปริมาณควรใช้วิธีที่รวดเร็วและได้ผลที่เชื่อถือได้ เทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ที่เหมาะสมวิธีหนึ่ง คือ high-performance liquid chromatography เพราะว่าเป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างแม่นยำ ถูกต้อง และใช้ปริมาณสารตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อย แต่เนื่องจากของเหลวในร่างกายนั้น จะประกอบด้วยโปรตีนและเมตาโบไลต์ ซึ่งเมื่อทำตามการวิเคราะห์หาปริมาณของสารตัวยาในของเหลวในร่างกายโดยวิธีนี้ จึงต้องผ่านการสกัดหรือแยกโปรตีนออกก่อน มิฉะนั้นจะทำให้คอลัมน์ที่บรรจุเฟสที่อยู่กับที่ (stationary phase) อุดตันได้ การแยกโปรตีน และสิ่งเจือปนอื่นๆออกจากของเหลวในร่างกายมีข้อยุ่งยากหลายประการ อย่างน้อยที่สุดต้องใช้เวลามากขึ้นและเพิ่มโอกาสของความผิดพลาด เนื่องจากการสกัดหรือแยกสารตัวยาออกมาได้ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้อาจก่อให้เกิดการอุดตันของคอลัมน์ได้ การวิจัยนี้จะกล่าวถึงการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของสารตัวยาในพลาสมา โดยไม่ต้องผ่านการสกัดหรือแยกโปรตีนออกก่อนทำการวิเคราะห์ โดยใช้เทคนิค micellar liquid chromatography ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณของสารตัวยาในของเหลวในร่างกายได้โดยตรง โดยไม่ต้องผ่านการสกัด โดยเทคนิคนี้มีผู้สนใจทำงานวิจัย

1. Camanas, *et al.* (1995 : 1767-1772) ทำการศึกษาการเตรียมยา catecholamines (CAs) ในทางเภสัชกรรม และศึกษาพฤติกรรมและการเคลื่อนที่ของCAs โดยเทคนิค HPLC เฟสเคลื่อนที่ คือ sodium dodecyl sulfate และใช้คอลัมน์ C₁₈

2. DeLuccia, *et al.* (1985 : 1564-1568) ใช้เทคนิค micellar liquid chromatography (MLC) ศึกษาการวิเคราะห์ยาชนิดต่างๆ ได้แก่ acetaminophen, acetylsalicylic acid, carbamazepine, chloramphenicol, phenobarbital, phenytoin, procainamide, quinidine และ theophylline เปรียบเทียบกับเทคนิค enzyme-multiplied immunoassay ซึ่งผลการทดลองที่ได้พบว่าทั้งสองวิธี ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และยังพบว่าเทคนิค MLC มีความสามารถในการตรวจวัด สารต่ำสุด (detection limit) อยู่ในระดับ µg/mL

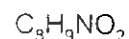
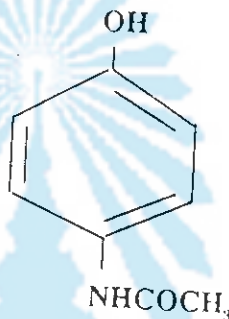
3. Habel, *et al.* (1993 : 1511-1513) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ theophylline ในพลาสมามนุษย์ โดยใช้เทคนิค HPLC เฟสเคลื่อนที่ คือ 3-(diimethyldodecylammonio)

propanesulfonate + 3%, v/v propanol และใช้คอลัมน์ μ Bondapak phenyl ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้สามารถวิเคราะห์ theophylline ในพลาสมามนุษย์ได้โดยไม่ต้องผ่านการสกัดหรือการกำจัดโปรตีนก่อนทำการวิเคราะห์ ผลการทดลองที่ได้มีความแม่นยำสูง



คุณสมบัติของอะเซตามิโนเฟน

Acetaminophen(N-acetyl-*p*-aminophenol, paracetamol, *p*-acetamidophenol, APAP) มีสูตรโครงสร้าง แสดงดังในรูปที่ 1



$$\text{M.W.} = 151.16$$

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของอะเซตามิโนเฟน

สมบัติทางกายภาพ : เป็นผลึกสีขาว หรือผลึกรูปแปด

จุดเดือด : 169° ถึง 172°C.

คุณสมบัติการละลาย : ที่อุณหภูมิ 25°C อะเซตามิโนเฟน 1 กรัม สามารถละลายได้ในน้ำ 70 มิลลิลิตร ในแอลกอฮอล์ 7 มิลลิลิตร, ในอะซิโตน 13 มิลลิลิตร, ในคลอโรฟอร์ม 50 มิลลิลิตร, ในกลีเซอริน 40 มิลลิลิตร, ในโพพิลีนไกลคอล 9 มิลลิลิตร อะเซตามิโนเฟนไม่ละลายในเบนซีนและอีเทอร์ แต่สามารถละลายในสารละลายอัลคาไลไฮดรอกไซด์ สารละลายอิ่มตัวอะเซตามิโนเฟนมี pH ประมาณ 6

ค่าคงที่ของการแตกตัว(pK_a) : 9.5 (25°C)

ครึ่งชีวิต(Half-life) : ปกติ 2 ชั่วโมง

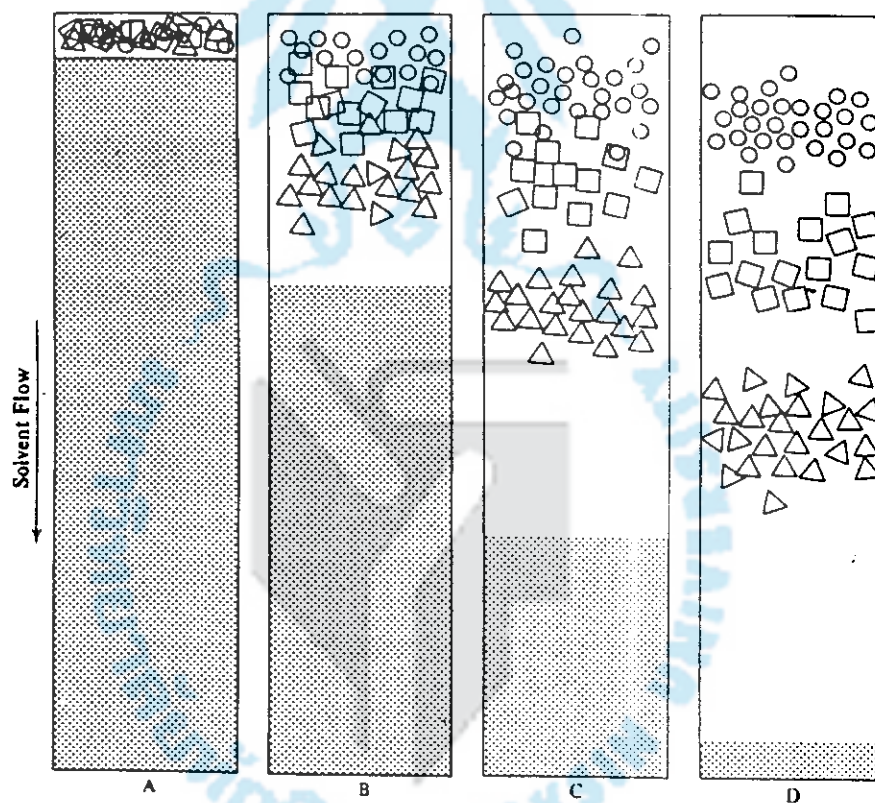
ขนาดความเป็นพิษของยา : ขนาดรับประทานน้อยสุดที่ทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย ประมาณ 10 กรัม อาการของตับที่ได้รับอันตรายจะไม่แสดงออกมาในช่วงก่อน 12 ชั่วโมง หลังจากรับประทานยาแต่อาจแสดงผลในช่วง 4 - 6 วันหลังจากนั้น ความเข้มข้นของอะเซตามิโนเฟนที่อาจเป็นอันตรายต่อบุคคลอยู่ในช่วง 4 - 6 ชั่วโมง หลังจากรับประทานยาช่วง 120 - 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และหลังจากรับประทานยา 12 ชั่วโมง ความเข้มข้นของอะเซตามิโนเฟนเป็น 50-120 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

บทที่ 2

ทฤษฎี

หลักการขั้นพื้นฐานของลิควิดโครมาโทกราฟี

หลักการขั้นพื้นฐานของลิควิดโครมาโทกราฟี อาจทำให้เข้าใจได้ง่ายขึ้น โดยการพิจารณาถึงการแยกสารละลายผสม ซึ่งประกอบด้วยสารสามชนิดด้วยกัน ในคอลัมน์ปิด(closed column) ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งขนาดเล็กๆ ที่มีรูพรุน เส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 150 ไมครอน ในหลอดยาวเล็กๆ เรียกว่า คอลัมน์



รูปที่ 2 แสดงการแยกของผสมของสาร 3 ชนิด โดยสมมุติให้สาร A เป็น ∇ , สาร B เป็น $\square$, สาร C เป็น $\circ$ และพื้นที่ที่เป็นจุดๆ แสดงถึงตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่

สารประกอบแต่ละตัวจะถูกดูดซับ และถูกทำให้หลุดออกไปจากตัวดูดซับ(desorption) บนอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ผลที่ตามมาคือ สารประกอบจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ช้าลง และอัตราเร็วของการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาพ(affinity) ของสารกับอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์

สารประกอบ X มีการกระจายอยู่ระหว่างเฟสที่อยู่กับที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เมื่อมันผ่านไปตามคอลัมน์ ดังสมการ

$$X_m < \text{-----} > X_s$$

โดย X_m ใน mobile phase

X_s ใน stationary phase

ค่า distribution coefficient สำหรับสารประกอบที่สอดคล้องกับสมการข้างบน คือ

$$K_x = [X]_s / [X]_m = \text{ค่าคงที่}$$

K_x = distribution coefficient ของสาร X

$[X]_s$ = ความเข้มข้นของสาร X ใน stationary phase

$[X]_m$ = ความเข้มข้นของสาร X ใน mobile phase

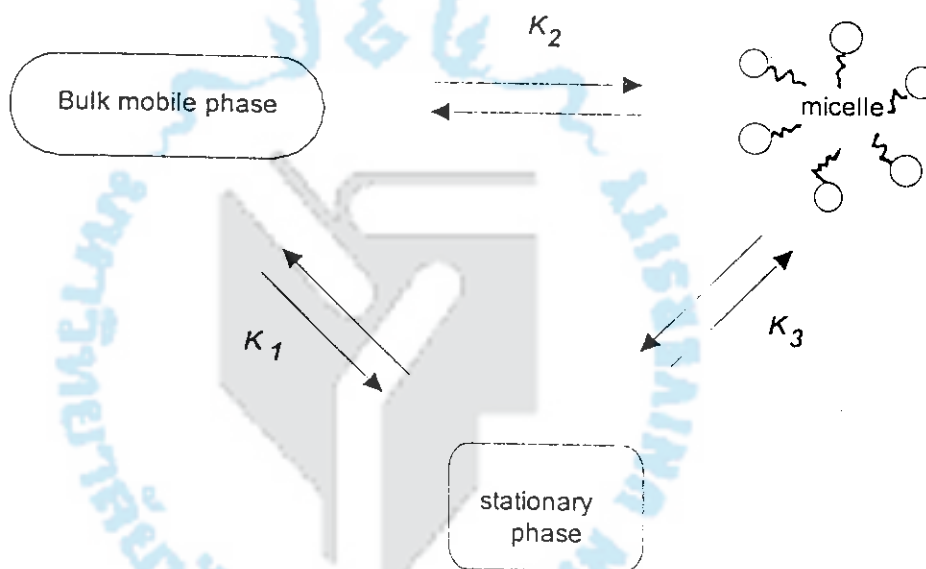
ถ้า K_x มีค่ามาก แสดงว่าสารประกอบชอบที่จะละลายในเฟสที่อยู่กับที่มากกว่าเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นสารประกอบนี้ก็จะละลายในเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าเฟสอยู่กับที่ และจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว

ความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบ จะมีผลทำให้เกิดการแยกสารประกอบนั้นในคอลัมน์ ใน elution chromatography สารประกอบซึ่งถูกแยกนั้นจะเคลื่อนที่ไปตามความยาวทั้งหมดของคอลัมน์โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวพาไป ถ้าเราทำการวัดความเข้มข้นของสารประกอบแต่ละชนิดที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ และนำค่านี้ไปเขียนกราฟ กับปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่หรือเวลา กราฟที่ได้คือ โครมาโทแกรม ระยะแรกของการศึกษาทางโครมาโทกราฟีนั้น จะเก็บปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่แล้วนำมา วัดความเข้มข้นของตัวถูกละลายได้โดยใช้วิธีที่เหมาะสม เช่น วิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรี แต่ปัจจุบันนี้สามารถที่จะวัดส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่อง โดยใช้เครื่องตรวจวัด (detector) ซึ่งอาจเป็นการวัดสมบัติทางกายภาพหรือทางเคมีของตัวถูกละลาย หรือของเฟสเคลื่อนที่

เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในเทคนิคไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ ลิดวิด โครมาโทกราฟี(HPLC)นั้น สามารถมีได้ทั้งสารละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้ว โดยถ้าใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารมีขั้วและเฟสอยู่กับที่เป็นสารไม่มีขั้ว จะเรียกเทคนิคHPLC นี้ว่า reverse phase liquid chromatography แต่ถ้าใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นสารไม่มีขั้วและเฟสอยู่กับที่เป็นสารมีขั้ว จะเรียกเทคนิคHPLC นี้ว่า normalise phase liquid chromatography

หลักการขั้นพื้นฐานของเทคนิคไมเซลล์าร์ ลิควิด โครมาโทกราฟี

Armstrong (1975: 2160-2163) เป็นบุคคลแรกที่นำสารละลาย surfactant ที่มีความเข้มข้นมากกว่าค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์(critical micell concentration, CMC) มาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ในเทคนิคลิควิด โครมาโทกราฟี ความจำเพาะเจาะจง(selectivity)ของเฟสเคลื่อนที่ดังกล่าว มีผลทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ได้แตกต่างจากเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบอื่นๆ โดยเฉพาะคุณสมบัติของการละลายของsurfactant ที่สามารถละลายโปรตีนได้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้วิเคราะห์สารประกอบทางชีวภาพโดยเทคนิคHPLC ได้โดยตรง ไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการกำจัดเอาโปรตีนออกก่อนทำการวิเคราะห์ โดยกลไกการทำงานของไมเซลล์ที่เกิดขึ้นในเฟสเคลื่อนที่ ของเทคนิคไมเซลล์าร์ ลิควิด โครมาโทกราฟีสามารถอธิบายได้ในทอมของการ partitioning ซึ่งมีด้วยกัน 3 สมดุล ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงกลไกการทำงานของไมเซลล์ที่เกิดขึ้นในเฟสเคลื่อนที่

บทที่ 3

การทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. graduate cylinder
2. beaker
3. pipette
4. beaker
5. stirring rod
6. volumetric flask
7. vial
8. micropipette
9. ชุดกรอง mobile phase
10. ชุดกรอง sample

เครื่องมือ

1. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography ของ Separation Products รุ่น SN 4000 ประกอบด้วย
 - 1.1 pump รุ่น constra metric 3500
 - 1.2 constra metric 3200 detector. ใช้ UV-VIS spectra focus (FORWARD OPTICAL SCANNING DETECTOR)
 - 1.3 เครื่อง Autosampler Spectrasystem AS 3000
2. เครื่อง Ultrasonic bath (BRANSON รุ่น 3210)
3. เครื่องกรองน้ำชนิด MILLIPORE
4. เครื่องกรองแบบลดความดัน
5. เครื่อง Vertex รุ่น
6. เครื่อง Centrifuge รุ่น
7. เครื่องวัดพีเอช

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน *N*-acetyl-*p*-acetaminophenol 99.9%
2. Zincsulfate : AR Grade
3. Bariumhydroxide : AR Grade
4. Heparin
5. Methanol : HPLC Grade
6. *n*-propanol : AR Grade
7. ตัวอย่างพลาสมา

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างพลาสมา

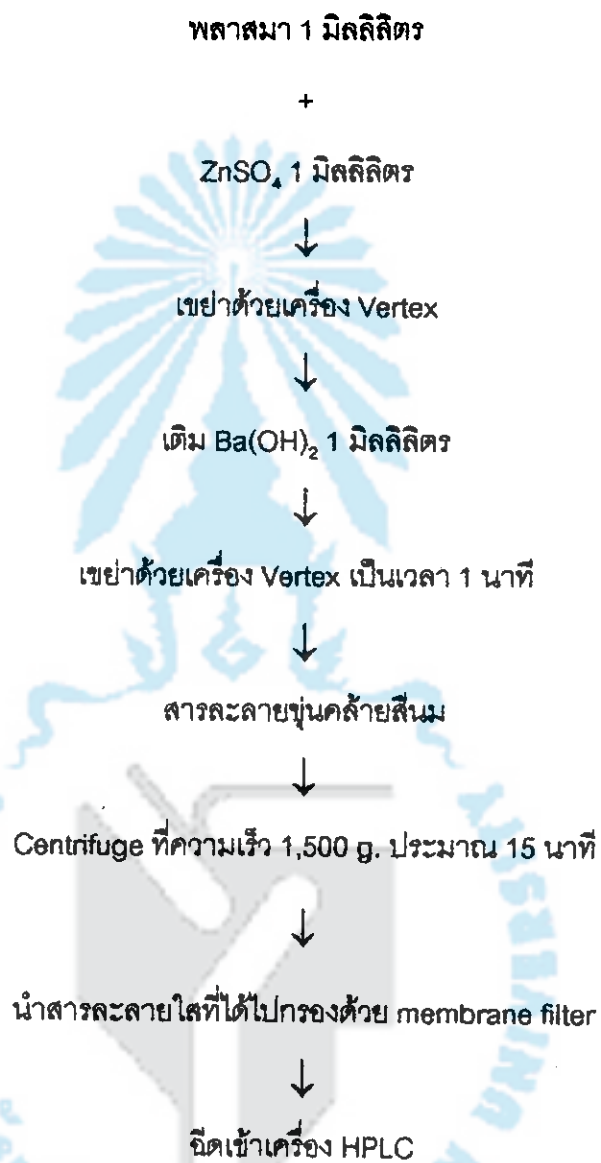
- 1.1 การแยกพลาสมาออกจากตัวอย่างเลือด ทำตามแผนภาพที่ 1



แผนภาพที่ 1

แสดงวิธีการแยกพลาสมาออกจากตัวอย่างเลือด

1.2 การสกัดโปรตีนออกจากพลาสมาในเทคนิครีเวอร์สเฟส ลิควิด โครมาโทกราฟี สามารถทำได้ตามแผนภาพที่ 2



แผนภาพที่ 2 แสดงวิธีการสกัดโปรตีนออกจากพลาสมา

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนในน้ำ

2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานตั้งต้น (Stock Standard Solution) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่งอะเซตามิโนเฟน 10.00 มิลลิกรัม เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.2 นำสารละลายมาตรฐานตั้งต้น ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำ ให้มีความเข้มข้น 80, 60, 40, 20 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา

เตรียมสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา ความเข้มข้น 40, 20, 10, 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยนำสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนในน้ำความเข้มข้น 80, 40, 20 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยพลาสมา ในอัตราส่วน 1:1 ตามลำดับ

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์อะเซตามิโนเฟน

4.1 เทคนิคไมเซลล์าร์ ลิควิด โครมาโทกราฟี

4.1.1 การหาองค์ประกอบที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

1. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

ทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นสารละลายโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต ซึ่งใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ จากความเข้มข้น 0.01, 0.25, 0.05, 0.75, 0.10, 0.125, 0.15 โมลาร์ โดยใช้ อัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ 1.0 มิลลิลิตร/นาที ความยาวคลื่นที่หาได้จากข้อ 4 และนำข้อมูลมาเปรียบเทียบหาค่า capacity factor และค่า HETP (Height Equivalent to a Theoretical plate)

2. ศึกษาผลของ pH ของเฟสเคลื่อนที่ต่อการเคลื่อนที่ของอะเซตามิโนเฟน

4.1.2 การหาอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

ทำการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ตั้งแต่ 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5 1.75 มิลลิลิตร/นาที โดยใช้ความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่และสภาวะการทดลองที่หาได้จากข้อ 4.1.1

4.1.3 การหาความยาวคลื่นที่เหมาะสม

1. นำสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ละลายในสารละลายโซเดียมไดดีคิลซัลเฟต มาหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200 - 300 นาโนเมตร โดยเครื่อง UV - Visible Spectrophotometer และใช้สารละลายโซเดียมไดดีคิลซัลเฟตเป็นสารละลายเปรียบเทียบ(blank) เพื่อหาค่าความยาวคลื่นที่อะเซตามิโนเฟนดูดกลืนแสงได้สูงสุด
2. ศึกษาผลของพลาสมาต่อการดูดกลืนแสงของอะเซตามิโนเฟนในช่วงความยาวคลื่นต่างๆ

4.2 เทคนิครีเวิร์สเฟส ลิกวิด โครมาโทกราฟี

4.2.1 การหาองค์ประกอบที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

1. นำสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้ความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตร/นาาที และทำการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วนต่างๆ คือ ใช้เมทานอลต่อ น้ำ 10%, 15%, 20%, 25%, 30% และ 35%(V/V) ตามลำดับ
2. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าcapacity factorกับอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่

4.2.2 การหาอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

1. นำสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC/UV detector ใช้ความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่เป็น 35%เมทานอล แล้วทำการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ดังนี้ 0.5, 0.75, 1.00, 1.25 และ 1.50 มิลลิลิตร/นาาที ตามลำดับ
2. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าHETP กับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ เพื่อหาอัตราเร็วที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์

4.2.3 การหาความยาวคลื่นที่เหมาะสม

1. นำสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นช่วง 200 - 300 นาโนเมตร โดยเครื่องUV-Visible Spectrophotometer ใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายเปรียบเทียบ(blank) เพื่อหาค่าความยาวคลื่นที่อะเซตามิโนเฟนดูดกลืนแสงได้สูงสุด

2. ศึกษาผลของพลาสมาต่อการดูดกลืนแสงของอะเซตามิโนเฟนในช่วงความยาวคลื่นต่างๆ

5. การหาเปอร์เซ็นต์การสกัดในเทคนิครีเวิร์สเฟส ลิกวิด โครมาโทกราฟี

1. นำสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนในน้ำ ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC/UV detector แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของอะเซตามิโนเฟน
2. นำสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนในน้ำ ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปผ่านการสกัดตามแผนภาพที่ 2 ในวิธีข้อ 1.2
3. นำสารละลายส่วนใสที่สกัดได้ ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC/UV detector แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของอะเซตามิโนเฟน
4. นำค่าการดูดกลืนแสงของอะเซตามิโนเฟนที่ได้แต่ละความเข้มข้นในข้อ 1 และข้อ 3 มาเปรียบเทียบกับหาเปอร์เซ็นต์การสกัดตามสมการข้างล่าง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

$$\text{เปอร์เซ็นต์การสกัด} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของอะเซตามิโนเฟนหลังการสกัด}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของอะเซตามิโนเฟนก่อนการสกัด}} \times 100$$

6. การทำ Recovery ในเทคนิคไมเซลล์าร์ ลิกวิด โครมาโทกราฟี

1. นำสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนในน้ำ ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วิเคราะห์หาปริมาณอะเซตามิโนเฟนด้วยเครื่อง HPLC/UV detector
2. นำสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วิเคราะห์หาปริมาณอะเซตามิโนเฟนด้วยเครื่อง HPLC/UV detector
3. นำความเข้มข้นของอะเซตามิโนเฟนในน้ำและพลาสมาที่ได้แต่ละความเข้มข้นจากข้อ 2 และข้อ 3 มาหาเปอร์เซ็นต์ recovery ตามสูตรข้างล่าง แล้วนำค่าเปอร์เซ็นต์ recovery แต่ละความเข้มข้นที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

$$\% \text{recovery} = \frac{\text{ความเข้มข้นของอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา}}{\text{ความเข้มข้นของอะเซตามิโนเฟนในน้ำ}} \times 100$$

7. การทำกราฟมาตรฐาน(calibration curve)

1. นำสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา ความเข้มข้น 1.0, 5.0, 10.0, 15.0 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC/UV detector แล้ววัดความสูงของพีคที่ได้แต่ละความเข้มข้น

2. นำความสูงของพีคที่ได้มาเขียนกราฟ โดยให้ความเข้มข้นของอะเซตามิโนเฟนเป็นแกนนอน แล้วให้ความสูงของพีคเป็นแกนตั้ง

8. การหาปริมาณความเข้มข้นของตัวอย่างอะเซตามิโนเฟน

8.1 เทคนิคไมเซลล์าร์ ลิควิด โครมาโทกราฟี

1. นำตัวอย่างเลือดมาแยกเอาพลาสมาตามแผนภาพที่ 1 ข้อ 1.2
2. นำพลาสมาที่ได้มากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC/UV detector
3. วัดความสูงของพีคที่ได้ แล้วนำไปหาปริมาณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

8.2 เทคนิครีเวสเฟส ลิควิด โครมาโทกราฟี

1. นำตัวอย่างเลือดมาแยกเอาพลาสมาตามแผนภาพที่ 1 ข้อ 1.1
2. นำพลาสมาที่ได้มาสกัดตามแผนภาพที่ 2 ข้อ 1.2
3. นำสารละลายส่วนใสที่ได้มากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC/UV detector
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของอะเซตามิโนเฟนที่ได้ แล้วนำไปหาปริมาณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

บทที่ 4

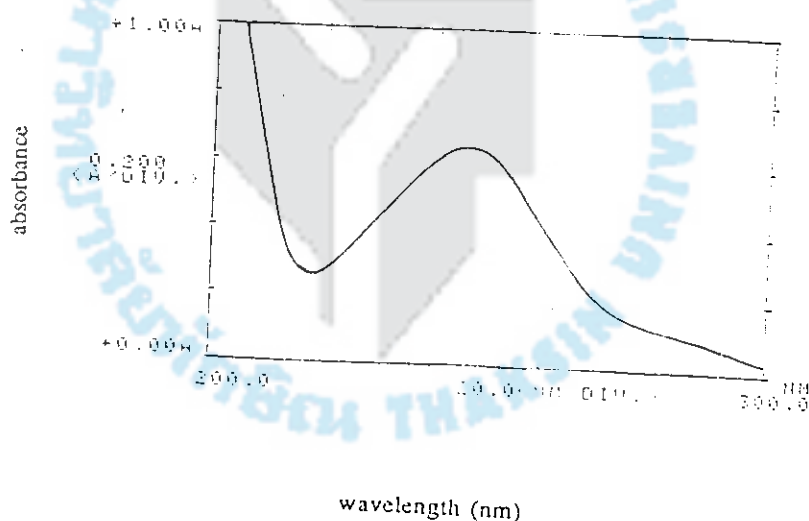
ผลการทดลอง

ผลการทดลองสามารถแยกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นการวิเคราะห์หาอะเซตามิโนเฟน โดยเทคนิคไมเซลล์าร์ ลิควิด โครมาโทกราฟี และส่วนที่ 2 เป็นการวิเคราะห์อะเซตามิโนเฟนใน เทคนิครีเวอร์เฟส ลิควิด โครมาโทกราฟี

เทคนิคไมเซลล์าร์ ลิควิด โครมาโทกราฟี

1. การหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสม

ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงของอะเซตามิโนเฟนสูงสุดคือ 245 นาโนเมตร ซึ่งได้จากการนำสารละลายอะเซตามิโนเฟนความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 200 - 300 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4 ส่วนการวิเคราะห์อะเซตามิโนเฟนใน พลาสมา พบว่าพีคของพลาสมาไม่รบกวนพีคของอะเซตามิโนเฟน ดังแสดงในรูปที่ ดังนั้นในการวิเคราะห์จึงสามารถใช้ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร วิเคราะห์ได้จริง



รูปที่ 4 แสดงการดูดกลืนแสงของอะเซตามิโนเฟนที่ความยาวคลื่น 200 - 300 นาโนเมตร โดย UV-VIS spectrophotometer

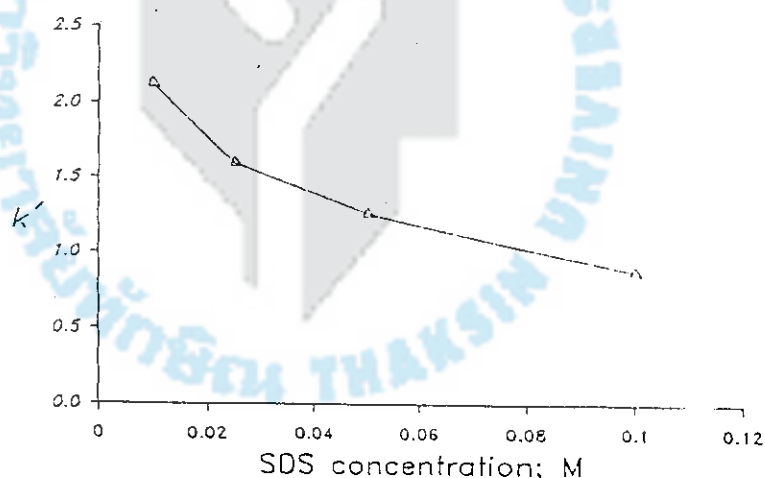
2. การหาค่าประกอบที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

2.1 การศึกษาความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่

จากการทดลองเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ คือ สารละลายไซโตคิลลัสเฟต เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่จาก 0.01 - 0.10 โมลาร์ พบว่าอะเซตามิโนเฟนเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้เร็วขึ้น โดยแสดงได้จากค่า capacity factor ตามตารางที่ 1 และจากการทดลองสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่กับค่า capacity factor ดังรูปที่ 5

ตารางที่ 1 แสดงค่า capacity factor ของอะเซตามิโนเฟน เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายไซโตคิลลัสเฟต สภาวะการทดลอง : C_{18} คอลัมน์ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.1 มิลลิลิตร/นาที ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร ($t_m = 2.43$ นาที)

[SDS], M	capacity factor(k')
0.010	2.12
0.025	1.60
0.050	1.26
0.100	0.88



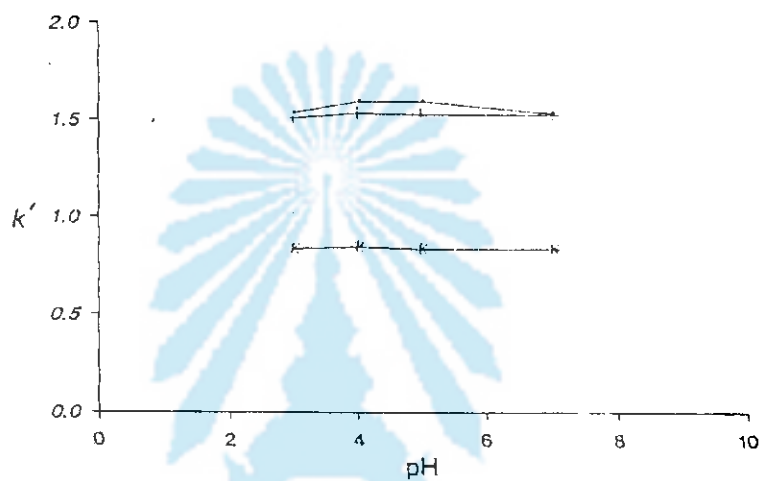
รูปที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่กับการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ของอะเซตามิโนเฟน(capacity factor) ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที

2.2 การศึกษาผลของpH

จากการทดลองเมื่อเปลี่ยนแปลงสภาพความเป็นกรดของเฟสเคลื่อนที่จาก pH 3 – 7 ที่ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1 โมลาร์ สารละลายไซเตียมโคดีคิลซัลเฟต พบว่าความเป็นกรดไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ของอะเซตามิโนเฟน ดังแสดงได้ในตารางที่ 2 และจากการทดลองสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสภาพความเป็นกรด(pH)ที่ความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ต่างๆกับอัตราการเคลื่อนที่ออกของอะเซตามิโนเฟส(capacity factor) ดังรูปที่ 6

ตารางที่ 2 แสดงค่าcapacity factor ของอะเซตามิโนเฟน เมื่อเปลี่ยนแปลงสภาพความเป็นกรดของสารละลายไซเตียมโคดีคิลซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ สภาพการทดลอง: C_{18} คอลัมน์ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.1 มิลลิลิตร/นาที ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร ($t_m = 2.43$ นาที)

[SDS], M	pH	capacity factor(k')
0.025	3.0	1.54
	4.0	1.60
	5.0	1.60
	6.2	1.60
	7.0	1.54
0.05	3.0	1.51
	4.0	1.54
	5.0	1.53
	6.2	1.26
	7.0	1.53
0.10	3.0	0.84
	4.0	0.85
	5.0	0.84
	6.2	0.86
	7.0	0.84



รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสภาพความเป็นกรด(pH)ที่ความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ต่างๆกับอัตราการเคลื่อนที่ออกของอะเซตามิโนเฟน(capacity factor) ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที

2.3 การหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

การหาอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่โดยเทคนิคนี้ไม่สามารถหาได้ตามทฤษฎีของVan Dee Plot เนื่องจากสารละลายโอดีซิลซิลเฟตที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่นั้นมีความหนืดสูง ดังนั้นเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ทำให้เกิดแรงดันกลับ(back pressure)ในคอลัมน์สูงมาก ประกอบกับเมื่อทำการทดลองหาอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาแล้วพบว่าความดันของปั๊มจะมีค่าสูงกว่าเมื่อทำการทดลองในตัวกลางน้ำ จนเกินขีดความสามารถของปั๊ม ดังนั้นในการทดลองนี้จึงพิจารณาเลือกใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ โดยพิจารณาจากอัตราการเคลื่อนที่ออกของอะเซตามิโนเฟนที่เหมาะสม นั่นคือเลือกใช้อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที



3. Recovery

การหาค่า recovery ของการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนโดยเทคนิคนี้ ทำได้โดยนำสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนในน้ำและในพลาสมาความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาวิเคราะห์หาปริมาณ แล้วเอาข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ recovery ของเทคนิคไมเซลลาร์ ลิควิด โครมาโทกราฟี

จากการทดลองพบว่าเทคนิคนี้มีค่า recovery เฉลี่ย 81% ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ recovery ของเทคนิคไมเซลลาร์ ลิควิด โครมาโทกราฟี

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ความสูงเฉลี่ยของพีคอะเซตามิโนเฟน(เซนติเมตร)		%recovery
	น้ำ	พลาสมา	
1.0	0.63	0.53	84
5.0	2.65	2.33	88
10.0	5.38	4.10	76
15.0	8.20	6.27	76

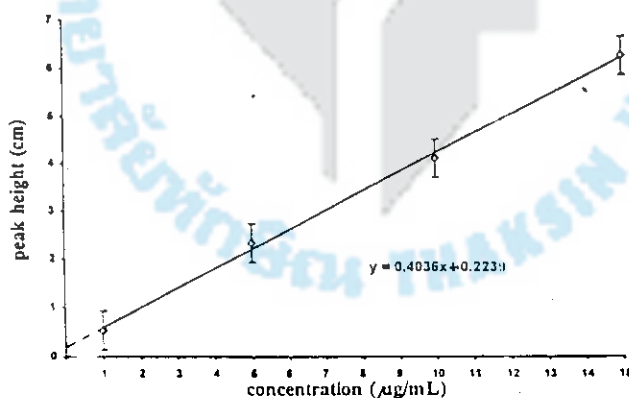
4. การหาปริมาณอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา

นำสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา ความเข้มข้น 1.0, 5.0, 10.0, 15.0 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC/UV detector โดยใช้ 0.05 ไมลาร์ โซเดียมไดอิติลซัลเฟตเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร/นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร จะได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4 จากนั้นนำความสูงของพีคของแต่ละความเข้มข้นที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอะเซตามิโนเฟนกับความสูงของพีค ดังรูปที่ 7 แล้วนำตัวอย่างอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา มาวิเคราะห์ โดยใช้สภาวะการทดลองเดียวกันกับการทำกราฟมาตรฐาน สามารถหาปริมาณอะเซตามิโนเฟนได้โดยนำข้อมูลไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

จากสภาวะการทดลองข้างต้นสามารถวิเคราะห์หาปริมาณอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาได้ตามโครมาโทแกรมรูปที่ 8

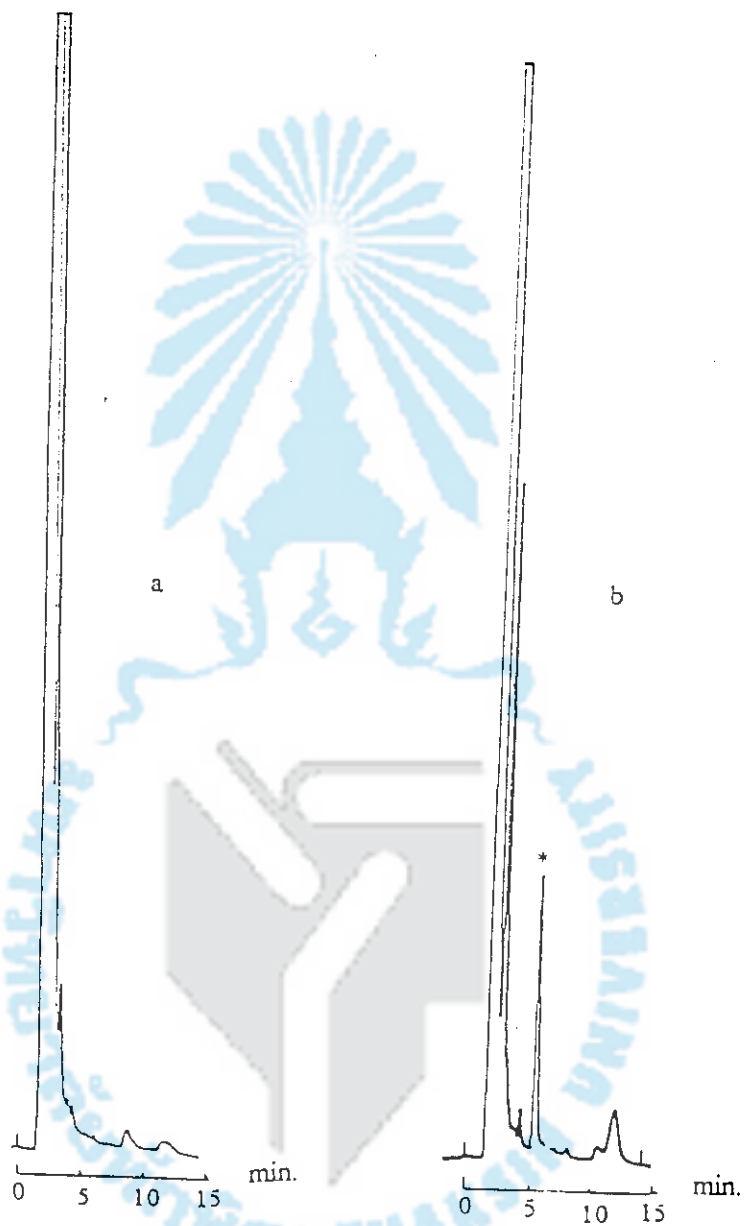
ตารางที่ 4 แสดงความสูงพีคของสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ความสูงของพีค (เซนติเมตร)
1.0	0.53
5.0	2.33
10.0	4.10
15.0	6.27



รูปที่ 7 แสดงกราฟมาตรฐานของอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา

สภาวะการทดลอง : คอลัมน์ C_{18} เฟสเคลื่อนที่ : 0.05 ไมลาร์ โซเดียมไดอิติลซัลเฟต, อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร



รูปที่ 8 แสดงโครมาโทแกรมในการวิเคราะห์หาปริมาณของอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาที่ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ : 0.05 โมลาร์ โซเดียมไดโอดิลซัลเฟต อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที (a) blank plasma (b) acetaminophen in plasma

เทคนิครีเวิร์สเฟส อิลลิวิด โครมาโทกราฟี

1. การหาค่าความยาวคลื่นที่เหมาะสม

ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ได้จากการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 200 - 300 นาโนเมตร พบว่าสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6

ตารางที่ 5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ความยาวคลื่น 200-300 นาโนเมตร โดยเครื่อง UV/Visible Spectrophotometer

ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
200	0.136
210	0.175
220	0.035
230	0.026
240	0.020
250	0.016
260	0.014
270	0.010
280	0.008
290	0.008
300	0.005

ตารางที่ 6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ความยาวคลื่น 240-250 นาโนเมตร โดยเครื่อง Spectrophotometer UV/Visible

ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
241	0.193
242	0.209
243	0.218
244	0.223
245	0.221
246	0.213
247	0.200
248	0.123
249	0.157

2. การหาองค์ประกอบที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

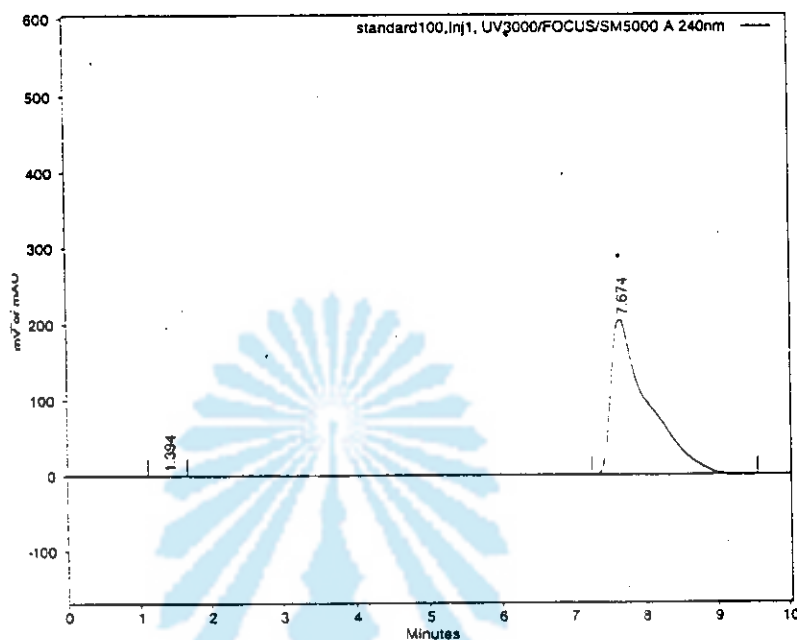
2.1 การศึกษาความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่

จากการทดลองใช้อัตราส่วนระหว่างเมทานอลกับน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ การวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเมทานอลเพิ่มขึ้น ค่าcapacity factor จะมีค่าลดลงตามลำดับ และจำนวนเพลตจากคอลัมน์ในการทดลองแต่ละครั้งพบว่าเฟสเคลื่อนที่ 10%MeOH ให้จำนวนเพลตสูงสุด รองลงมาคือเฟสเคลื่อนที่ 15%MeOH, 35%MeOH, 30% MeOH, 20%MeOH และ 25%MeOH ส่วนค่าสมมาตรของพีคที่ได้ คือ 1.82, 1.93, 1.94, 2.08, 2.18, 2.22 เมื่อใช้ 35%MeOH, 30%MeOH, 15%MeOH, 20%MeOH, 10%MeOH และ 25%MeOH ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 9-14

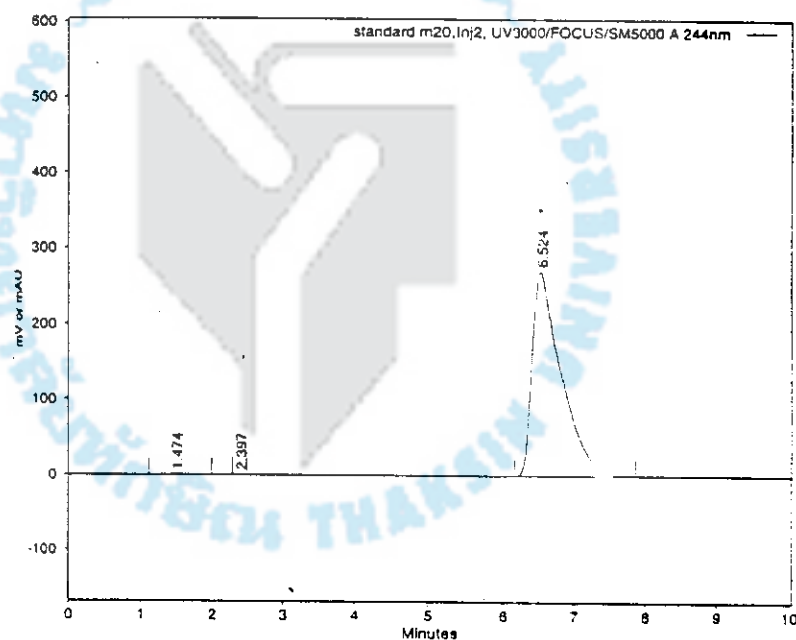
จากผลการทดลองที่ได้ เมื่อพิจารณาค่า capacity factor จะเห็นว่าองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ 35%MeOH เหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้ค่าcapacity factor ที่ต่ำ และความสมมาตรของพีคก็มีความสมมาตรมากที่สุด แต่ในการวิเคราะห์หาปริมาณอะเซตามิโนเฟนจริง จะเลือกใช้อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ 30%MeOH เนื่องจากที่เฟสเคลื่อนที่ 35%MeOH พีคของพลาสมา(blank)จะซ้อนทับกับพีคของอะเซตามิโนเฟน ดังแสดงในรูปที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่กับค่า capacity factor

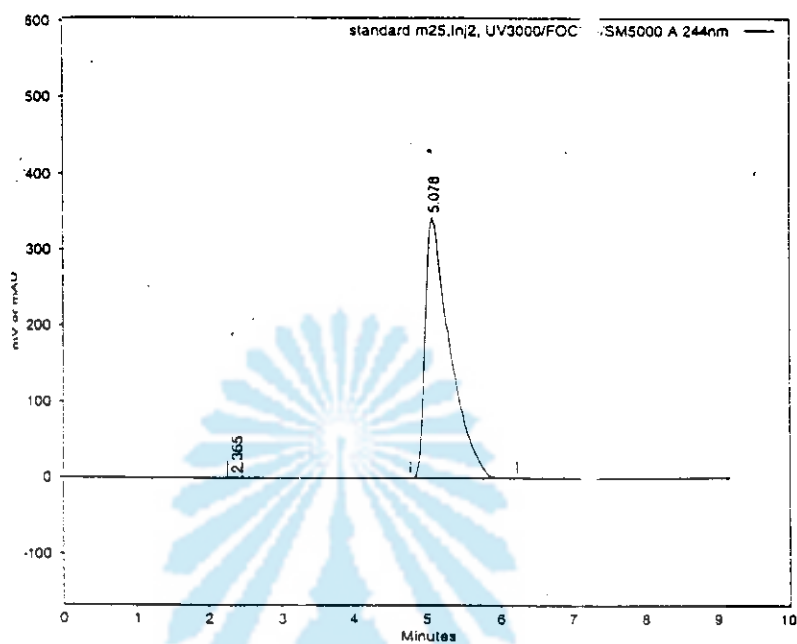
เฟสเคลื่อนที่(%เมทานอล)	Capacity factor	Symmetry
10	6.544	2.18
15	4.126	1.94
20	2.351	2.08
25	2.005	2.22
30	1.540	1.92
35	1.242	1.82



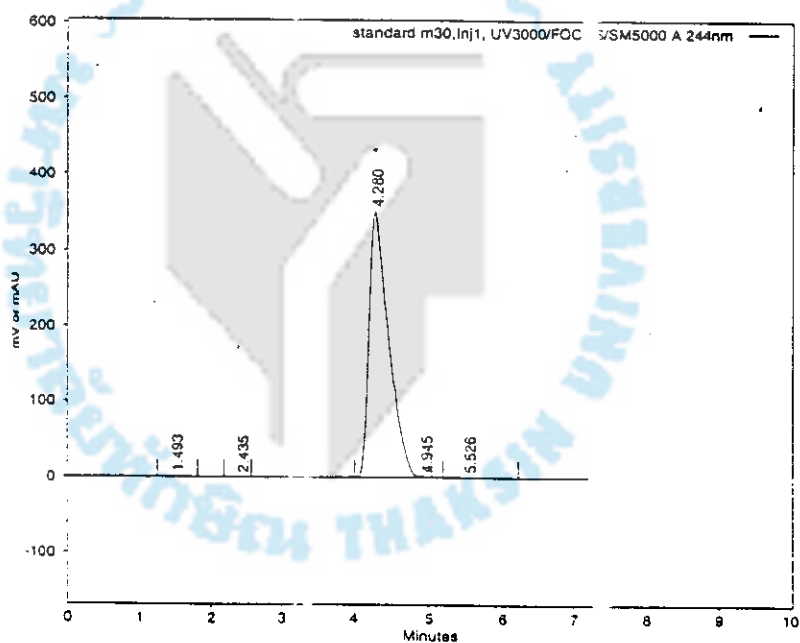
รูปที่ 9 แสดงโครมาโทแกรมการหาปริมาณของอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาที่ ความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที เฟสเคลื่อนที่ : 15% MeOH



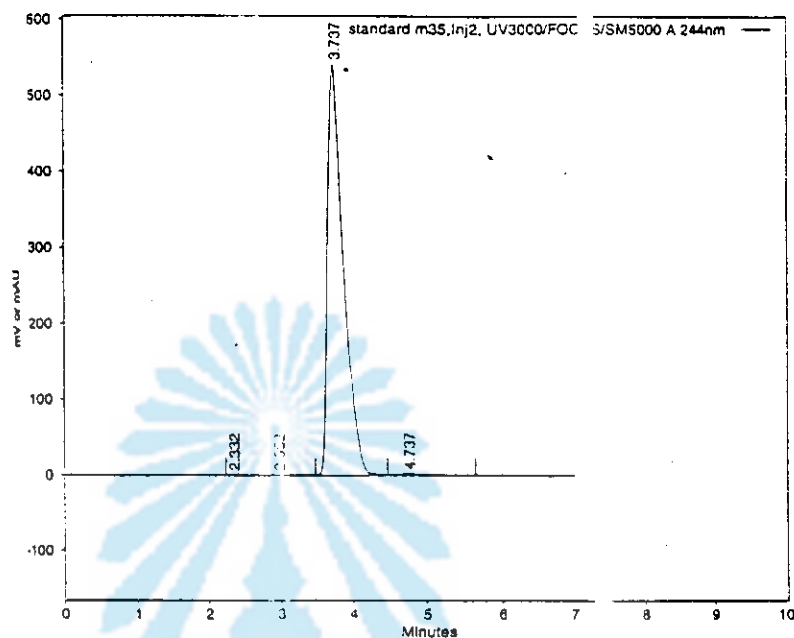
รูปที่ 10 แสดงโครมาโทแกรมการหาปริมาณของอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาที่ ความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที เฟสเคลื่อนที่ : 20%MeOH



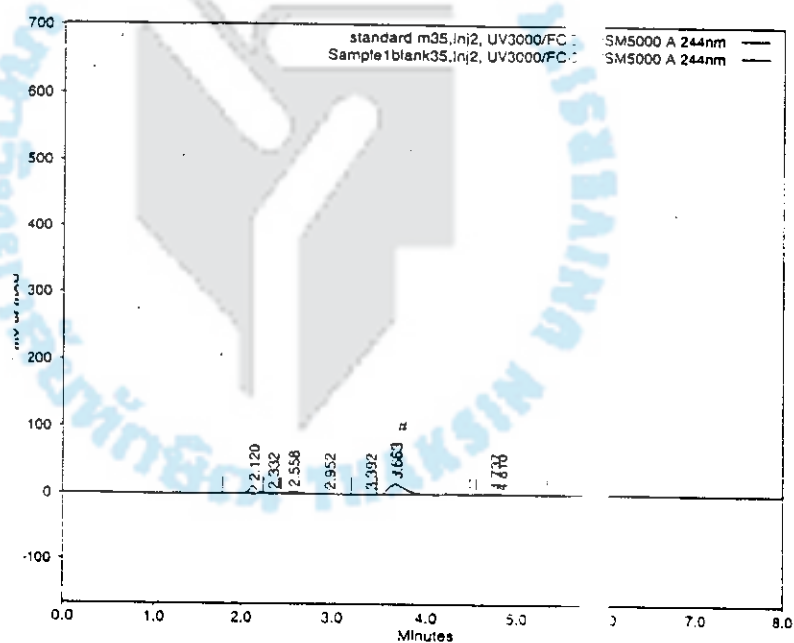
รูปที่ 11 แสดงโครมาโทแกรมการหาปริมาณของอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาที่ ความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที เฟสเคลื่อนที่ : 25%MeOH



รูปที่ 12 แสดงโครมาโทแกรมการหาปริมาณของอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาที่ ความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที เฟสเคลื่อนที่ : 30%MeOH



รูปที่ 13 แสดงโครมาโทแกรมการหาปริมาณของอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาที่ ความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที เฟสเคลื่อนที่ : 35%MeOH



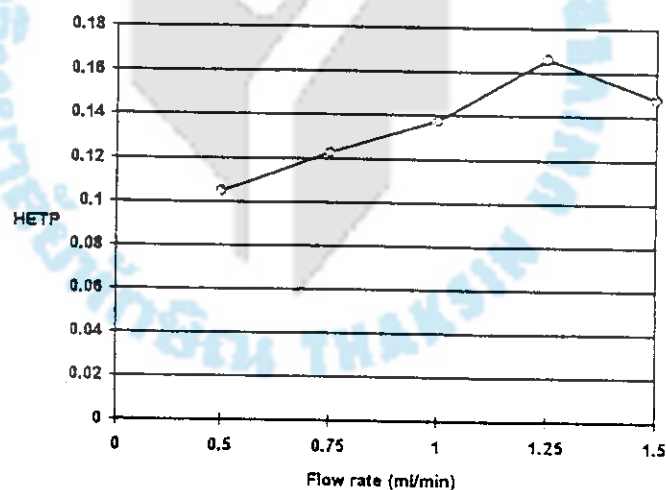
รูปที่ 14 แสดงโครมาโทแกรมของพลาสมาที่ความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที เฟสเคลื่อนที่ : 35%MeOH

2.2 การหาอัตราเร็วในการไหลที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

จากการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มอัตราเร็วในการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ค่า retention time จะมีค่าลดลง ซึ่งจำนวนเพลตมีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 8 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่ทำให้ประสิทธิภาพในการแยกของคอลัมน์ดีที่สุด สำหรับการวิเคราะห์ คือ 0.75 มิลลิลิตร/นาที อัตราการไหลนี้จะให้ค่า HETP ต่ำสุด และจำนวนเพลตในการแยกก็สูง ดังรูปที่ 15

ตารางที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วในการไหล จำนวนเพลต retention time และ ค่า HETP

อัตราการไหล(มิลลิลิตร/นาที)	Retention time	จำนวนเพลต	HETP
0.50	7.491	2379	0.105
0.75	4.781	2032	0.123
1.00	3.747	1813	0.138
1.25	3.006	1510	0.166
1.50	2.492	1688	0.148



รูปที่ 15 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า HETP กับอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่

3. การหาเปอร์เซ็นต์การสกัด

จากการทดลอง ใช้สารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาทำการสกัดโดยวิธีในแผนภาพที่ 2 แล้วนำสารสกัดไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC/UV-Visible เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟน 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่ยังไม่ผ่านการสกัด พบว่าโดยวิธีการสกัดดังกล่าวให้เปอร์เซ็นต์สกัดเฉลี่ยเท่ากับ 96.9 ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงเปอร์เซ็นต์การสกัดสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟน

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง(mV)		เปอร์เซ็นต์การสกัด
	ก่อนการสกัด	หลังการสกัด	
10	67146	28350	96.7
20	94337	40561	97.1

จากข้อมูลในตารางที่ 8 สามารถหาเปอร์เซ็นต์การสกัดได้ดังนี้

สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เมื่อผ่านการสกัด จะได้ปริมาตรเพิ่มขึ้นเป็น 2.25 มิลลิลิตร

ก่อนการสกัด สารละลายอะเซตามิโนเฟน 1 มิลลิลิตร มีเนื้อสารอยู่ $20 \times 1 = 20$ ไมโครกรัม

หลังการสกัด อะเซตามิโนเฟนมีความเข้มข้นเหลือ $= 20 \times (40561/94337)$
 $= 8.599$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ดังนั้นอะเซตามิโนเฟนหลังการสกัดปริมาตร 2.25 มิลลิลิตร มีเนื้อสาร $= 2.25 \times 8.599$

$= 19.3775$ ไมโครกรัม

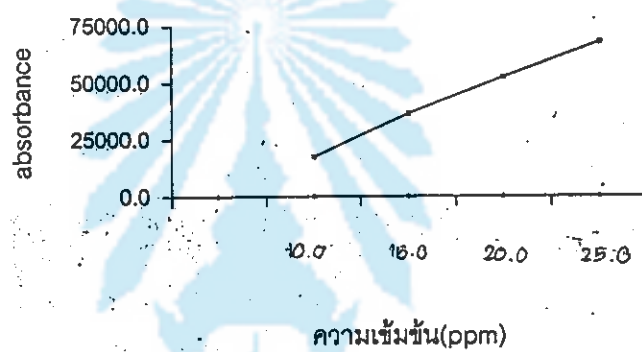
4. การวิเคราะห์หาปริมาณอะเซตามิโนเฟนในตัวอย่างพลาสมา

นำสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา ความเข้มข้น 10.0, 15.0, 20.0 และ 25.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC/UV detector โดยใช้ 30% เมทานอล เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลเท่ากับ 0.75 มิลลิลิตร/นาที และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร จะได้ผลการทดลองดังตารางที่ 10 จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงแต่ละความเข้มข้นที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอะเซตามิโนเฟนกับค่าการดูดกลืนแสงของอะเซตามิโนเฟน ดังรูปที่ 16

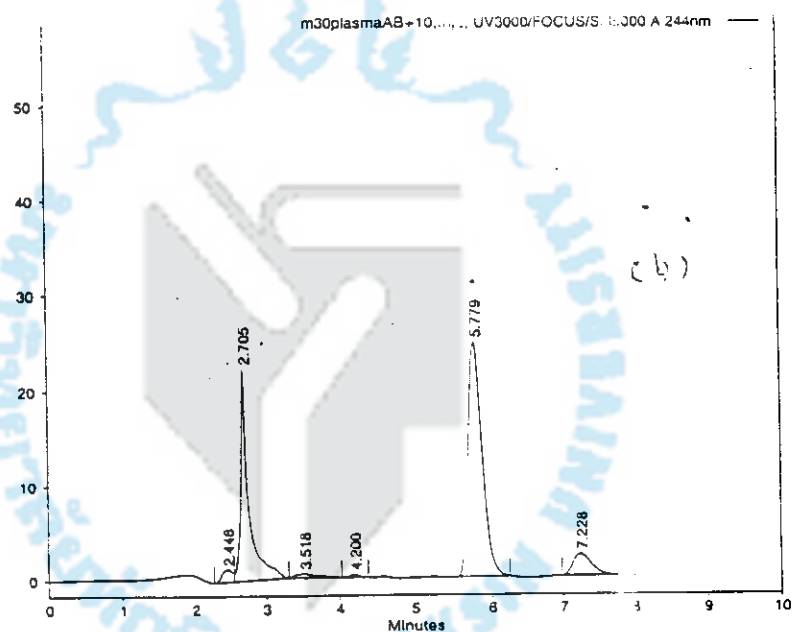
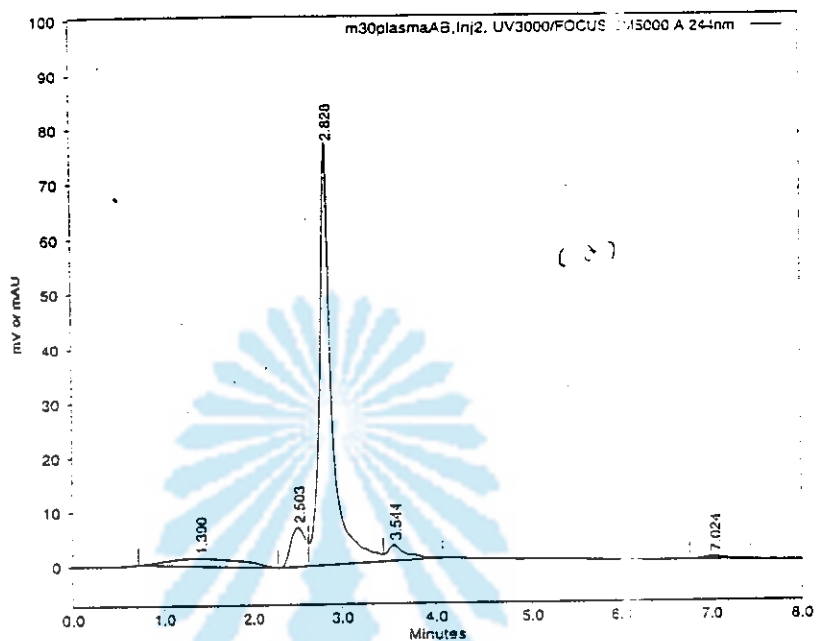
นำตัวอย่างเลือดมาแยกเอาพลาสมาตามแผนภาพที่ 2 ใช้สภาวะการทดลองเหมือนการทำกราฟมาตรฐานข้างต้น วัดความสูงของพีคที่ได้ แล้วนำไปหาปริมาณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยสามารถวิเคราะห์หาปริมาณอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาได้ตามโครมาโทแกรมรูปที่ 17

ตารางที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอะเซตามิโนเฟนกับค่าการดูดกลืนแสงของอะเซตามิโนเฟน

ความเข้มข้น(ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	absorbance
10.0	17528
15.0	36243
20.0	52435
25.0	67825



รูปที่ 16 แสดงกราฟมาตรฐานของอะเซตามิโนเฟนในพลาสติกมา
สภาวะการทดลอง : คอลัมน์ C_{18} เฟสเคลื่อนที่ : 30%เมทานอล,
อัตราการไหล : 0.75 มิลลิลิตร/นาที , ความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร



รูปที่ 17 แสดงโครมาโทแกรมในการวิเคราะห์หาปริมาณของอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาที่มีความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร โดยใช้ 30%เมทานอล เฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 0.75 มิลลิลิตร/นาที (a) blank plasma (b) 10 ppm acetaminophen in plasma

การเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์อะเซตามิโนเฟนในพลาสมา

นำสารละลายมาตรฐานอะเซตามิโนเฟนในพลาสมาไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยเทคนิค MLC และ RPLC แล้วนำผลที่ได้มาตรวจสอบทางสถิติแบบ F-test ตามตารางที่ 11 พบว่าค่า F จากการคำนวณมีค่าน้อยกว่าค่า F จากตาราง ดังนั้นผลการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณโดยเทคนิคทั้งสองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบการหาปริมาณของอะเซตามิโนเฟนโดยเทคนิค RPLC และเทคนิค MLC

ครั้งที่	ปริมาณอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา (มก./มล.)	
	RPLC	MLC
1	19.7	17.6
2	18.8	18.1
3	19.2	19.4
4	18.5	18.3
5	18.0	18.9
ค่าเฉลี่ย	18.8	18.9
S	0.65	0.70
S ²	0.423	0.493
ค่า F จากการคำนวณ	1.17	
ค่า F จากตาราง	5.05	

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์ปริมาณอะเซตามิโนเฟนในพลาสมา โดยเปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ 2 เทคนิคคือ

1. เทคนิคไมเซลล์าร์ ลิกวิด โครมาโทกราฟี
2. เทคนิครีเวอร์เฟส ลิกวิด โครมาโทกราฟี

เทคนิคไมเซลล์าร์ ลิกวิด โครมาโทกราฟี สามารถวิเคราะห์อะเซตามิโนเฟนในพลาสมาได้โดยตรง ไม่ต้องผ่านกระบวนการสกัดโปรตีนออกจากพลาสมา มีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดลองดังนี้

- ★ คอลัมน์ C_{18} (25)
- ★ ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร
- ★ เฟสเคลื่อนที่ใช้ 0.01 โมลาร์ โซเดียมไดโอดีลซัลเฟต
- ★ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร/นาที

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและความสูงของพีคมีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้น 1.0 – 15.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยมีสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงเท่ากับ 0.9990

เทคนิครีเวอร์เฟส ลิกวิด โครมาโทกราฟี สามารถวิเคราะห์อะเซตามิโนเฟนในพลาสมาได้โดยผ่านกระบวนการสกัดโปรตีนออกจากพลาสมา มีสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดลองดังนี้

- ★ คอลัมน์ C_{18} (25cm x 4.6mm I.D.)
- ★ ความยาวคลื่น 244 นาโนเมตร
- ★ เฟสเคลื่อนที่ใช้ 30%(V/V) เมทานอล
- ★ อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.75 มิลลิลิตร/นาที

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและความสูงของพีคมีลักษณะเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้น 10.0 – 25.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยมีสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงเท่ากับ 0.99896

จากการทดลองเมื่อนำผลการทดลองการวิเคราะห์อะเซตามิโนเฟนในพลาสมาเปรียบเทียบกันพบว่า เทคนิค RPLC ไม่เหมาะที่จะใช้วิเคราะห์อะเซตามิโนเฟนในปริมาณต่ำมากๆ เพราะมีปัญหาเรื่องการกำจัดโปรตีนออก เนื่องจากพบว่าเมื่ออะเซตามิโนเฟนมีความเข้มข้นต่ำลงเปอร์เซ็นต์การสกัดของสารมีแนวโน้มลดลงด้วย ซึ่งส่งผลให้ ปริมาณอะเซตามิโนเฟนมีปริมาณน้อยลง อาจเพิ่มความผิดพลาดในการวิเคราะห์ได้ แต่ถ้าต้องการวิเคราะห์อะเซตามิโนเฟนปริมาณ

ความเข้มข้นต่ำมากๆ อาจทำได้โดยใช้วิธีการหาปริมาณสารด้วยวิธี standard addition ซึ่งจะดีกว่าวิธีcalibration curve แต่วิธี standard addition ก็ไม่เหมาะกับสารตัวอย่างจำนวนมากๆ หรือลองเปลี่ยนวิธีการสกัดโปรตีนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด

สำหรับเทคนิค MLC สามารถใช้ได้ดีกับการวิเคราะห์อะเซตามิโนเฟนในปริมาณต่ำ ไม่มีปัญหาการสูญเสียปริมาณอะเซตามิโนเฟนในการกำจัดโปรตีน แต่พบว่าคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์มีปัญหาการอุดตันเกิดขึ้น โดยสังเกตจากความดันกลับของคอลัมน์มีค่าสูงขึ้น เนื่องจากโปรตีนในพลาสมา โปรตีนในพลาสมานั้นจะถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่(สารละลายโซเดียมไดอิติลซัลเฟต) เมื่อใช้สารละลายโซเดียมไดอิติลซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่ำ อาจมีโปรตีนบางส่วนที่ไม่ละลายตกค้างและถูกสะสมในคอลัมน์ แต่ถ้าใช้สารละลายโซเดียมไดอิติลซัลเฟตที่ความเข้มข้นสูงๆ ก็จะมีปัญหาในเรื่องความดันของคอลัมน์ที่สูง เพราะสารละลายโซเดียมไดอิติลซัลเฟตเป็นสารที่มีความหนืดสูง

เทคนิคMLC เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่เป็นทางเลือกให้กับการวิเคราะห์ยาในพลาสมา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิเคราะห์ยาในพลาสมาของผู้ป่วยที่มีโรคติดเชื้อ โดยสามารถลดกระบวนการวิเคราะห์ที่ต้องสัมผัส หรือมีความเสี่ยงในการติดเชื้อของผู้ทำการวิเคราะห์ได้

เอกสารอ้างอิง

1. Berthod, A., Roussel, A. 1988. "The Role of Stationary Phase in Micellar Liquid Chromatography", J.Chromatogr. 449 , 349-360.
2. Berthod, A., Girard, I. and Gonnet, C. 1986. "Micellar Liquid Chromatography Adsorption Isotherms of Two Ionic Surfactant on Five Stationary Phase", Anal.Chem. 58 , 1356-1358.
3. Berthod, A., Girard, I. and Gonnet, C. 1986. "Micellar Liquid Chromatography: Retention Study of Solutes of Various Polalities", Anal.Chem. 58, 1359-1362
4. Berthod, A., Girard, I. and Gonnet, C. 1986. "Additive Effects on Surfactant Adsorption and Ionic Solute Retention in Micellar Liquid Chromatography" , Anal.Chem. 58 , 1362-1367.
5. Borgerdin, M.F. and Hinze, W.L. 1989. "Inveatigation of Stationary Phase Modification by the Mobile Phase Surfactant in Micellar Liquid Chromatography" , Anal.Chem. 61 , 1353-1358.
6. Borgerdin, M.F., Quina, F.H. and Hinze, W.L. 1988. "Investigation of the Retention Mechanism in Nonionic Micellar Liquid Chromatography Using an Alkylbenzene Homologous Series", Anal.Chem. 60 , 2520-2527.
7. Cline Love, L.J., Habarta,J.G. and Dorsey, J.G. 1984. "The Micelle - Analytical Chemistey Interface", Anal.Chem. 56, 1132A-1148A.
8. DeLuccia, F.J., Arunyanart, M. and Cline Love, L.J. 1985. "Direct Serum Injection with Micellar Liquid Chromatography for Therapeutic Drug Monitoring " , Anal.Chem. 57 , 1564-1568.
9. Domigo, E.B., et al. 1992. "Evaluation of Dirutics in Pharmaceuticals by High-performance Liquid Chromatography with a 0.05 mol dm⁻³ Sodium Dodecyl Sulfate-3%Propanol Mobile Phase " , Analyst , 117 , 843-847.
10. Dorsey, J.G., DeEchegaray, M.T. and Landy, J.S. 1983. "Efficiency Enhancement in Micellar Liquid Chromatography " , Anal.Chem. 55 , 924-928.
11. Dorsey, J.G., et al. 1984. "Gradient Elution Micellar Liquid Chromatography", J.Chromatogr. 316 , 183-191.

12. Flurer, C.L. and Novotny, M. 1993. "Dual Microcolumn Immunoaffinity Liquid Chromatography: An Analytical Application to Human Plasma Protein", Anal.Chem. 65, 817-821.
13. Frivulzio, C., Pinelli, A. 1985. , "Determination of Glibenclamide, Chlorpropamide and Tolbutamide in Plasma by High-performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detector", J Chromatogr. 339 , 203-209.

