

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์สาร เคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีโอกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท
โดยเทคนิคแคปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

จากการวิเคราะห์สารเคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีโอกโซรูบิซินและเมทโทเทรกเซท โดยเทคนิคแคปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส กำหนดสภาวะของการทดลองคือ แคปิลารีมีความยาว 36 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 75 ไมโครเมตร ศักย์ไฟฟ้า 15 กิโลโวลต์ อุณหภูมิของ แคปิลารี 25 องศาเซลเซียส นำสารตัวอย่างเข้าสู่แคปิลารีด้วยความดัน 50 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 3 วินาที ตรวจวัดสัญญาณที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

5.1 ศึกษาผลของพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอชถือว่าเป็นตัวแปรสำคัญที่ทำให้การวิเคราะห์สารด้วยเทคนิคแคปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสสามารถแตกตัวเป็นประจุ และเกิดการแยกได้ เพราะพีเอชเป็นตัวกำหนดปริมาณการแตกตัวเป็นประจุของสารและอิเล็กโทรโมบิลิตีของสาร ทั้งหมด โดยสารที่ทำการวิเคราะห์คือ เคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีโอกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท มีค่า pK_a เท่ากับ 8.25, 8.50, 8.22 และ 4.80 ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 1 เนื่องจากสารที่วิเคราะห์มี ฟังก์ชันนอลกรุปของ $-NH_2$, $-OH$ และ $-COOH$ อยู่ในโครงสร้างโมเลกุลของสารจึงสามารถถูก โพรโทเนตทำให้ประจุโดยรวมของโมเลกุลเป็นบวกและถูกดีโพรโทเนตทำให้ประจุโดยรวมของ โมเลกุลเป็นลบที่พีเอชแตกต่างกัน (Pérez-Ruiz, Martínez-Lozano, Sanz, & Bravo, 2001, pp. 134-138) ในทางทฤษฎี พีเอชของบัฟเฟอร์มีผลทั้งค่าการแยก และไมเกรชันไทม์ การเพิ่มพีเอชทำให้ เวลาการวิเคราะห์สารสั้นลง เนื่องจากการเพิ่มพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์ ส่งผลให้หมู่ซิดีนอลที่ ฝัวยภายในหลอดแคปิลารีแตกตัวเป็นประจุลบมากขึ้นทำให้การดึงคู่ประจุบวกจากบัฟเฟอร์มา เรียงตัวในชั้นดับเบิลเลเยอร์เพิ่มมากขึ้น จึงทำให้การเคลื่อนที่แบบอิเล็กโทรออสโมติกโฟลว์เพิ่มขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ค่าไมเกรชันไทม์ลดลง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 5 พบว่าเริ่มแรกจากการเพิ่ม พีเอช 6.5-9.0 เพื่อวิเคราะห์สารผสมเคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีโอกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ไม่สามารถแยกสาร 3 ชนิดแรกออกได้และไมเกรชันไทม์ลดลง ซึ่งมีความสอดคล้องตามทฤษฎี แต่ ที่พีเอช 9.5 และ 10.0 สารทั้ง 4 ชนิด แยกได้สมบูรณ์และไมเกรชันไทม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ เพราะฟังก์ชันนอลกรุป $-OH$ และ $-COOH$ ที่อยู่ในโครงสร้างโมเลกุลของสารถูกดีโพรโทเนตและ ที่พีเอชดังกล่าวสามารถทำให้สารแตกตัวเป็นประจุลบเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ประจุโดยรวมของ โมเลกุลเป็นลบเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย ทำให้สารเคลื่อนที่ด้วยอิทธิพลของอิเล็กโทรโฟรีติกโมบิลิตี

มากขึ้น ลักษณะเช่นนี้ส่งผลให้สารมีทิศทางการเคลื่อนที่ตรงกันข้ามกับแรงอิเล็กโทรออสโมติก โฟลว์ แต่เนื่องจากอิเล็กโทรออสโมติกโฟลว์มีค่ามากกว่าอิเล็กโทรโฟรีติกโมบิลิตี ดังนั้นการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโมเลกุลจึงเกิดจากผลต่างของแรงอิเล็กโทรออสโมติกโฟลว์กับอิเล็กโทรโฟรีติกโมบิลิตี เมื่อแรงอิเล็กโทรโฟรีติกโมบิลิตีมีค่ามากทำให้ความเร็วสัมพัทธ์ที่ได้มีค่าน้อยลง ค่าไมเกรชั่นไทม์ของสารจึงมีค่ามากขึ้นเมื่อพีเอชสูงขึ้น ลำดับการแยกสารทั้ง 4 ชนิด คือ เคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีอ็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท โดยพิจารณาจากค่าการแตกตัวของสาร (pK_a) และขนาดโมเลกุลของสาร เมื่อพิจารณาจากการแตกตัวของสาร เมทโทเทรกเซท > คีอ็อกโซรูบิซิน > เคาโนรูบิซิน > ไอคารูบิซิน ตามลำดับ กล่าวคือ ที่พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับค่า pK_a ทำให้สารแตกตัวได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์สูงกว่าค่า pK_a ของสารมากขึ้น ส่งผลให้การแตกตัวของสารเพิ่มขึ้นตามไปด้วย และเมื่อพิจารณาจากขนาดโมเลกุลของสาร เมทโทเทรกเซท < ไอคารูบิซิน < เคาโนรูบิซิน < คีอ็อกโซรูบิซิน ตามลำดับ จากการแตกตัวของสาร ลำดับการแยกของสารน่าจะเป็น ไอคารูบิซิน เคาโนรูบิซิน คีอ็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท แต่จากผลการทดลองลำดับการแยกสารคือ เคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีอ็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท เหตุผลเพราะ เคาโนรูบิซิน มีขนาดใหญ่กว่า ไอคารูบิซิน ทำให้แรงดึงดูดระหว่างขั้วแอมโนและแรงผลักจากขั้วแคโทดน้อยกว่าส่งผลให้เคลื่อนที่ออกมาเป็นอันดับแรก ส่วนคีอ็อกโซรูบิซินแตกตัวได้ ดีกว่า เคาโนรูบิซิน และ ไอคารูบิซิน มาก ทำให้มีแรงดึงดูดระหว่างขั้วแอมโนและแรงผลักจากขั้วแคโทดมากกว่าสารทั้ง 2 ชนิด จึงเคลื่อนที่ออกมาเป็นอันดับที่สาม และเมทโทเทรกเซทแตกตัวเป็น ประจุลบมากที่สุดและมีขนาดเล็กที่สุดด้วย จึงมีแรงดึงดูดระหว่างขั้วแอมโนและแรงผลักจากขั้วแคโทดมากที่สุด และถูกแยกเป็นลำดับสุดท้าย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง การแยกสารผสม เคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีอ็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท เกิดขึ้นเนื่องจากการเลือกพีเอชของสารละลายบอเรนดบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่ช่วยในการแตกตัวเป็นไอออนของสารได้ดี จากภาพที่ 5 อิเล็กโทรโฟโกราฟีของสารผสม เคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีอ็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ที่พีเอชต่าง ๆ ที่พีเอช 6.5-9.0 พิกของสาร เคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน และ คีอ็อกโซรูบิซิน ซ้อนทับกันไม่สามารถแยกออกจากกันได้ เนื่องจากในช่วงพีเอชดังกล่าวสาร เคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน และ คีอ็อกโซรูบิซิน แตกตัวเป็นไอออนได้น้อยทำให้อิเล็กโทรโฟรีติกโมบิลิตีของสารมีค่าน้อย เพราะฉะนั้นการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของโมเลกุลจึงเพิ่มมากขึ้น ทำให้สารเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้นส่งผลให้ค่าไมเกรชั่นไทม์ของสารลดลงตามไปด้วย ซึ่งความเร็วในการเคลื่อนที่ของสาร เคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน และ คีอ็อกโซรูบิซิน ใกล้เคียงกันจึงไม่สามารถแยกออกจากกันได้ พบว่าเมื่อเพิ่มพีเอชสูงขึ้น แนวโน้มการแยกสาร เคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน และ คีอ็อกโซรูบิซิน มีค่าเพิ่มสูงขึ้น ดังภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ของค่า

การแยกแหว่งสารเคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน และค็อกโซรูบิซิน กับพีเอช ที่พีเอช 9.5 ค่าการแยกของสารเคาโนรูบิซิน กับไอคารูบิซิน และไอคารูบิซินกับค็อกโซรูบิซิน มีค่าเท่ากับ 1.54 และ 2.26 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาที่พีเอช 9.5 และ 10.0 สามารถแยกสารได้ทุกตัว อย่างไรก็ตามที่พีเอช 9.5 พิกที่ให้มีรูปร่างดี และใช้เวลาการวิเคราะห์น้อยที่สุด จึงเลือกใช้เป็นสภาวะที่เหมาะสม

5.2 ศึกษาผลของชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 8 การวิเคราะห์สารด้วยบอเรนบัฟเฟอร์สามารถแยกสารผสมเคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน ค็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซทออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ ขณะเดียวกันการวิเคราะห์สารด้วยคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ไม่สามารถแยกสารผสมเคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน ค็อกโซรูบิซิน เนื่องจากชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์มีผลต่อประสิทธิภาพของการเกิดอินตรกิริยาและความเฉพาะของสาร ที่สภาวะเป็นเบสบอเรนบัฟเฟอร์สามารถทำให้สารแตกตัวเป็นประจุได้ดีที่ฟังก์ชันนอลกรุป -OH (Landers, 2008, pp. 32) เมื่อสารแตกตัวเป็นประจุ จึงทำให้สามารถแยกสารได้ ซึ่งการแยกสารโดยเทคนิคแคปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสนั้นอาศัยความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสารซึ่งขึ้นอยู่กับความแตกต่างของอัตราส่วนของค่าประจุต่อขนาดของสารตัวอย่าง จากการทดลองดังภาพที่ 8 ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์สารด้วยคาร์บอเนตบัฟเฟอร์จะใช้เวลาน้อยกว่าบอเรนบัฟเฟอร์ เมื่อพิจารณาจากค่าการแยก จากภาพที่ 9 และความสูงของพิก จากภาพที่ 10 จึงเลือกใช้บอเรนบัฟเฟอร์เป็นสภาวะที่เหมาะสม

5.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายบอเรนบัฟเฟอร์ ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายบอเรนบัฟเฟอร์ ช่วงความเข้มข้น 20.0-40.0 มิลลิโมลาร์ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์สารผสมเคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน ค็อกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 11 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ไมเกรชันไทม์มีค่ามากขึ้น เนื่องจากอิเล็กโทรออสโมติกฟลักซ์โมบิลิตีมีค่าลดลง จากภาพที่ 12 เมื่อความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้นจะมีความหนืดเพิ่มขึ้น ทำให้สารเคลื่อนที่ในแคปิลารีช้าลง ดังสมการที่ 14

$$\mu_{\text{eof}} = \frac{e}{(3 \times 10^7) \eta \sqrt{C}} \quad (14)$$

เมื่อ μ_{eof} คือ อิเล็กโทรออสโมติกฟลักซ์โมบิลิตี ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{sec}^{-1}$)
 e คือ ประจุทั้งหมดในสารละลายต่อหน่วยพื้นที่
 η คือ ความหนืดของสารละลายบัฟเฟอร์ ($\text{g cm}^{-1} \text{sec}^{-1}$)

Z คือ จำนวนเวเลนซ์อิเล็กตรอน

C คือ ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ (mole cm^{-3})

พบว่าอิเล็กโทรดสโตนิกโพลีเมอร์มีผลลดลงเป็นสัดส่วนกับรากที่สองของความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ ที่ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ 20.0 มิลลิโมลาร์ใช้เวลาในการวิเคราะห์สารเร็วที่สุด ตามด้วย 25.0, 30.0, 35.0 และ 40.0 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ พบว่าถ้าความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์มีค่ามากขึ้นการแยกจะมีค่ามากขึ้นด้วย เนื่องจากสารเคลือบที่ในหลอดแคปิลารีช้าลงทำให้มีเวลาในการแยกสารมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์มีผลต่อความสูงพีคของสารคือกโซรูบิซิน เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจะช่วยป้องกันสารไม่ให้ดูดซับที่ผนังแคปิลารีได้ (Weinberger, 1993, pp. 53-54) จากภาพที่ 13 เป็นการพล็อตระหว่างความสูงของพีคกับความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 20.0 ถึง 40.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์มากขึ้นความสูงพีคของสารคือกโซรูบิซินจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย จนกระทั่งถึง 30.0 มิลลิโมลาร์ ได้ความสูงของพีคสูงสุด และความสูงของพีคจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 35.0 และ 40.0 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีผลมาจากความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มากเกินไปทำให้การกระจายความร้อนระหว่างผนังด้านในหลอดแคปิลารีและภายในศูนย์กลางไม่ดี เกิดปรากฏการณ์ความร้อนจุล (Joule heating) ภายในแคปิลารีซึ่งทำให้เกิด bandbroadening (Weinberger, 1993, pp. 31) มีผลกับความสูงและรูปร่างของพีคสาร จากผลการทดลองผลของความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์เมื่อพิจารณาค่าไมเกรชั่นโทมค่าการแยก และความสูงของพีค ของสารทั้ง 4 ชนิดสามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์พีคที่ได้มีรูปร่างดี และใช้เวลาการวิเคราะห์น้อยที่สุด ที่ความเข้มข้น 30.0 มิลลิโมลาร์ จึงเลือกเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

5.4 ศึกษาผลของความเข้มข้นของอะซิโตนไทรล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ ศึกษาผลของความเข้มข้นของอะซิโตนไทรล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ในช่วง 0.0-30.0 เปอร์เซ็นต์ที่มีผลต่อการวิเคราะห์สารผสมเคโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คือกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 14 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นอะซิโตนไทรล์ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ ค่าไมเกรชั่นโทมของสารเพิ่มมากขึ้น สาเหตุที่ไมเกรชั่นโทมของสารมีค่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์มีผลลดค่าคงที่ไดอิเล็กทริกของสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งในสารละลายบัฟเฟอร์มีน้ำเป็นตัวทำละลาย และน้ำมีค่าคงที่ไดอิเล็กทริกเท่ากับ 78 ในขณะที่อะซิโตน

ไครล์มีค่าคงที่ไดอิเล็กทริกเท่ากับ 36 ส่งผลให้ค่าศักย์ชีดามีค่าลดลง และลดอิเล็กโตรออสโมติกโฟลว์ ดังสมการที่ 5 ในบทที่ 2 เมื่ออิเล็กโตรออสโมติกโฟลว์ลดลงทำให้สารเคลื่อนที่ช้าลง จึงทำให้ค่าไมเกรชันใหม่ของสารมากขึ้น จากผลการทดลองภาพที่ 15 พบว่าค่าการแยกของสารเคาโรบินซิน ไอคารูบินซิน และค็อกโซรูบินซินเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอะซิโดไนไครล์ในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นอะซิโดไนไครล์ไปลดอิเล็กโตรออสโมติกโฟลว์ ทำให้สารเคลื่อนที่ที่อยู่ในแคปิลลารีนานขึ้น มีเวลาในการแยกสารมากขึ้น และช่วยเพิ่มการละลายของสาร (Landers, 2008, pp. 35-36) นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นอะซิโดไนไครล์ในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์มีผลต่อความสูงของพีกสาร เพราะการเพิ่มความเข้มข้นอะซิโดไนไครล์ในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมช่วยทำให้การแตกตัวของหมู่ซิลินอลที่ผนังภายในแคปิลลาริลดลง ส่งผลให้เกิดอันตรกิริยาของสารตัวอย่างกับผนังภายในหลอดแคปิลลาริลลดลง ด้วย (Weinberger, 1993, pp. 50-52) จากภาพที่ 16 เป็นการพล็อตระหว่างความสูงของพีกกับความเข้มข้นอะซิโดไนไครล์ในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 0.0 ถึง 30.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณอะซิโดไนไครล์ในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์มากขึ้นความสูงของพีกจะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึง 20.0 เปอร์เซ็นต์ ได้ความสูงของพีกสูงสุด และลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 25.0 และ 30.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นผลมาจากความเข้มข้นอะซิโดไนไครล์ในสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ที่มากเกินไป ทำให้สารมีแนวโน้มการแตกตัวเป็นประจุลดลง ส่งผลให้โมเลกุลของสารมีประจุลดลง พีกสารกระจายตัวมีฐานพีกกว้างและเกิดเป็นพีกมีหางเริ่มซ้อนทับกัน (Li, Zhang, Chen, Hu, & Hooper, 1999, pp. 1027) จากภาพที่ 15 ความเข้มข้นของอะซิโดไนไครล์ที่ 20.0 เปอร์เซ็นต์ ค่าการแยกของสารเคาโรบินซิน กับ ไอคารูบินซิน และ ไอคารูบินซินกับค็อกโซรูบินซิน มีค่าเท่ากับ 1.63 และ 2.56 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าไมเกรชันใหม่ ค่าการแยก และความสูงของพีก พบว่าที่ความเข้มข้นของอะซิโดไนไครล์ 20.0 เปอร์เซ็นต์ 25.0 และ 30.0 เปอร์เซ็นต์สามารถแยกสารได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของอะซิโดไนไครล์ 20.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าการแยก รูปร่างของพีก ความสูงของพีกสารดีที่สุด จึงเลือกใช้เป็นสภาวะที่เหมาะสม

5.5 ศึกษาผลของศักย์ไฟฟ้า ศึกษาศักย์ไฟฟ้าที่ 14.0-16.0 กิโลโวลต์ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์สารผสมเคาโรบินซิน ไอคารูบินซิน ค็อกโซรูบินซิน และเมทโทเทรกเซท ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 17 พบว่าเมื่อเพิ่มศักย์ไฟฟ้าไมเกรชันใหม่ของสารมีแนวโน้มลดลงและทำให้ค่าการแยกของสารลดลงตามไปด้วย เนื่องจากความเร็วของสารที่มีประจุแปรผันตรงกับอิเล็กโตรออสโมติกโฟลว์ โมบิลิตีและอิเล็กโตรโฟรีติกโมบิลิตีร่วมกันผูกกับความแรงของสนามไฟฟ้า ดังสมการที่ 11 ในบทที่ 2 เพราะเมื่อศักย์ไฟฟ้าเพิ่มขึ้นความเร็วในการเคลื่อนที่ของสารก็เพิ่มขึ้น

ส่งผลให้ค่าไมเกรชั่นไทม์ของสารและเวลาของการวิเคราะห์สั้นลง ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ดังภาพที่ 17 พบว่าการให้ค่าศักย์ไฟฟ้าที่สูงมีผลต่อค่าการแยกของสาร เนื่องจากเมื่อเพิ่มศักย์ไฟฟ้าจะทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าสูงขึ้นและส่งผลให้เกิดความร้อนสูง ทำให้ความหนืดของสารละลายบัฟเฟอร์ลดลงและพีกสารเกิดการกระจายตัว อีกสาเหตุหนึ่งก็เนื่องมาจากการเพิ่มค่าศักย์ไฟฟ้าทำให้อิเล็กโทรออสโมติกฟลักซ์โมบิลิตีและอิเล็กโทรโฟเรติกโมบิลิตีของสารเพิ่มมากขึ้น สารเคลื่อนที่ได้เร็วและถูกตรวจวัดในเวลาใกล้เคียงกันทำให้ค่าการแยกของสารลดลง จากภาพที่ 17, 18 และ 19 เมื่อพิจารณาจากค่าไมเกรชั่นไทม์ ค่าการแยก ความสูงของพีก ตามลำดับ พบว่าที่ศักย์ไฟฟ้า 14.0 และ 15.0 กิโลโวลต์ สารทั้ง 4 ชนิด สามารถแยกได้สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามที่ศักย์ไฟฟ้า 15.0 กิโลโวลต์ ใช้เวลาการวิเคราะห์น้อยที่สุด จึงเลือกใช้เป็นสภาวะที่เหมาะสม

5.6 ศึกษาผลของอุณหภูมิของแคปิลลารี ศึกษาผลของอุณหภูมิของแคปิลลารีในช่วง 25.0-40.0 องศาเซลเซียส ที่มีผลต่อการวิเคราะห์สารผสมเดาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีอ็อกโซรูบิซิน และเมโทเทรกเซท ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 20 พบว่าเมื่ออุณหภูมิของแคปิลลารีสูงขึ้นค่าไมเกรชั่นไทม์ของสารมีค่าน้อยลง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะมีผลต่อความหนืดของสารละลายบัฟเฟอร์ กล่าวคือที่อุณหภูมิสูงจะทำให้ความหนืดของสารละลายบัฟเฟอร์ลดลงทำให้อิเล็กโทรออสโมติกฟลักซ์และความสามารถในการเคลื่อนที่ของสารภายใต้สนามไฟฟ้าสูงขึ้น เวลาในการวิเคราะห์สั้นลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิของแคปิลลารีค่าไมเกรชั่นไทม์ของสารลดลง แต่ส่งผลทำให้ค่าการแยกของสารเดาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีอ็อกโซรูบิซิน น้อยลงด้วยดังภาพที่ 21 เนื่องจากอุณหภูมิของแคปิลลารีสูงขึ้นความร้อนภายในของแคปิลลารีก็เพิ่มสูงขึ้นด้วย ความหนืดของสารละลายบัฟเฟอร์ลดลงทำให้สารเคลื่อนที่ได้เร็วใกล้เคียงกันพีกสารจึงซ้อนทับกัน จากผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 20 ที่อุณหภูมิ 25.0 องศาเซลเซียส สามารถแยกสารผสมเดาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีอ็อกโซรูบิซิน และเมโทเทรกเซทออกจากกันที่ฐานพีกได้สมบูรณ์ จากภาพที่ 21 ที่อุณหภูมิ 25.0 องศาเซลเซียส ค่าการแยกของสารเดาโนรูบิซิน กับไอคารูบิซิน และไอคารูบิซินกับคีอ็อกโซรูบิซิน มีค่าเท่ากับ 1.55 และ 2.42 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากค่าการแยกของพีกสาร จึงเลือกอุณหภูมิ 25.0 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสม

ตารางที่ 9 สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารเคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีอกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซทโดยเทคนิคแคปปีลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส

สภาวะที่ศึกษา	สภาวะที่เหมาะสม
พีเอชของสารละลายบัฟเฟอร์	9.5
ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์	บอเรตบัฟเฟอร์
ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ (มิลลิโมลาร์)	30.0
ปริมาณอะซิโตนไนไตรล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ (เปอร์เซ็นต์)	20.0
ค่าศักย์ไฟฟ้า (กิโลโวลต์)	15.0
อุณหภูมิของแคปปีลารี (องศาเซลเซียส)	25.0

5.7 ศึกษาความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ สำหรับการวิเคราะห์สารผสมเคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีอกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท พบว่าขีดจำกัดของการตรวจวัดอยู่ในช่วง 0.3-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงผลดังตารางที่ 1 ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณอยู่ในช่วง 1.0-3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงผลดังตารางที่ 2 ความเป็นเส้นตรงแสดงผลดังตารางที่ 3 สารเคาโนรูบิซิน อยู่ในช่วง 1.0-30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ไอคารูบิซินอยู่ในช่วง 0.3-50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร คีอกโซรูบิซิน อยู่ในช่วง 0.5-30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมทโทเทรกเซทอยู่ในช่วง 0.5-30.0 มิลลิกรัมต่อลิตร กราฟความเป็นเส้นตรงของสารเคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีอกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท แสดงดังภาพที่ 26, 27, 28 และ 29 ตามลำดับ การสร้างกราฟมาตรฐานแสดงผลดังตารางที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ของสารทั้ง 4 ชนิดมากกว่า 0.998 กราฟมาตรฐานของสารเคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีอกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท แสดงดังภาพที่ 30, 31, 32 และ 33 ตามลำดับ จากการศึกษาความเที่ยงของการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกันและวิเคราะห์สารระหว่างวันโดยพิจารณาค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ พบว่าการวิเคราะห์สารภายในวันเดียวกันให้ค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของไมเกรซีนไทม์อยู่ในช่วง 0.4-1.6 พื้นที่ที่ได้พักอยู่ในช่วง 0.4-4.8 แสดงผลดังตารางที่ 5 ความเที่ยงของการวิเคราะห์สารระหว่างวัน ให้ค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของไมเกรซีนไทม์อยู่ในช่วง 1.2-4.5 พื้นที่ที่ได้พักอยู่ในช่วง 0.4-11.1 แสดงผลดังตารางที่ 6 ความแม่นยำของการวิเคราะห์สารศึกษาโดยใช้ค่าร้อยละการกลับคืน พบว่าค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 97.1-108.9 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลดังตารางที่ 7 ความเฉพาะของสารพิจารณาจากค่า peak purity ratio ซึ่งจะต้องมีค่าน้อยกว่าหนึ่งจึงถือว่าสารตัวอย่างบริสุทธิ์

จากตารางที่ 8 พบว่า peak purity ratio ของสารเคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีอกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ในตัวอย่างปัสสาวะมีค่าเท่ากับ 0.22, 0.12, 0.39 และ 0.43 ตามลำดับ การวิเคราะห์สารเคาโนรูบิซิน ไอคารูบิซิน คีอกโซรูบิซิน และเมทโทเทรกเซท ในตัวอย่างปัสสาวะแสดงอิเล็กโตรฟีโรแกรมดังภาพที่ 24 จากการวิเคราะห์ตัวอย่างยาเม็ดของเมทโทเทรกเซท แสดงอิเล็กโตรฟีโรแกรมดังภาพที่ 25 พบว่าสามารถวิเคราะห์ปริมาณเมทโทเทรกเซทได้ 2.52 มิลลิกรัม จากปริมาณของเมทโทเทรกเซทที่มีในตัวยา 2.50 มิลลิกรัมต่อเม็ด และ peak purity ratio มีค่าเท่ากับ 0.68

ตารางที่ 10 สรุปผลการศึกษานำเชื้อติดของการวิเคราะห์

สาร	ความเที่ยง							
	LOD	LOQ	Linearity	Calibration graph	วิเคราะห์วันเดียวกัน (intra-day)		วิเคราะห์ระหว่างวัน (inter-day)	
					%RSD ไม่เกิน 100	%RSD พื้นที่ใต้พีค	%RSD ไม่เกิน 100	%RSD พื้นที่ใต้พีค
	มิลลิกรัม ต่อลิตร	มิลลิกรัม ต่อลิตร	มิลลิกรัมต่อลิตร	มิลลิกรัมต่อลิตร				specificity
DNR	1.0	3.0	ความเข้มข้น 1.0-30.0 $y = 0.247x - 0.183$ $R^2 = 0.9998$	ความเข้มข้น 3.0-15.0 $y = 0.682x + 0.049$ $R^2 = 0.9997$	0.67-1.36	1.26-4.19	2.12-2.99	10.06-10.52
								98.9-105.9
IDA	0.3	1.0	ความเข้มข้น 0.3-50.0 $y = 1.165x - 0.845$ $R^2 = 0.9995$	ความเข้มข้น 1.0-15.0 $y = 1.682x - 0.766$ $R^2 = 0.9995$	0.37-1.13	3.49-4.10	1.16-3.54	0.45-1.14
								97.1-100.9
DXR	0.5	2.0	ความเข้มข้น 0.5-30.0 $y = 0.673x - 0.397$ $R^2 = 0.9999$	ความเข้มข้น 3.0-15.0 $y = 0.653x - 0.017$ $R^2 = 0.9984$	0.53-1.51	0.39-2.15	1.98-3.18	3.66-5.46
								98.5-108.9
MTX	0.5	2.0	ความเข้มข้น 0.5-30.0 $y = 1.366x + 0.183$ $R^2 = 0.9999$	ความเข้มข้น 3.0-15.0 $y = 2.262x + 0.459$ $R^2 = 0.9993$	0.68-1.58	1.63-4.28	2.16-3.63	1.15-8.56
								97.9-108.2
								0.43