

บทที่ 3

ผลการทดลอง

ส่วนที่ 1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรัม

1. การวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำสุดของ paraxanthine และ caffeine ในซีรัมตัวอย่าง (Lower Limit of Detection)

ความเข้มข้นต่ำสุดของ paraxanthine ที่วิเคราะห์ได้ในซีรัมตัวอย่างคือ 0.125 µg/ml โดยมีค่า %RSD เท่ากับ 3.72 (N=10)

ความเข้มข้นต่ำสุดของ caffeine ที่วิเคราะห์ได้ในซีรัมตัวอย่างคือ 0.25 µg/ml โดยมีค่า % RSD เท่ากับ 6.79 (N=10)

2. ความถูกต้องของการวิเคราะห์ paraxanthine และ caffeine ในซีรัมตัวอย่าง (accuracy)

ความถูกต้องของการวิเคราะห์แสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ (%recovery) แบ่งเป็น

2.1 Analytical recovery

ความถูกต้องของการวิเคราะห์ paraxanthine และ caffeine ในซีรัม ได้จากการหาค่า % analytical recovery พบว่า analytical recovery ของ paraxanthine มีค่าระหว่าง 97.73 - 105.49% มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $100.63 \pm 4.24\%$ และ analytical recovery ของ caffeine มีค่าระหว่าง 95.84-100.63 % มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 98.34 ± 2.4 % แสดงดังตารางที่ 10-11

ตารางที่ 10 แสดงค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์ paraxanthine ในซีรัม (n=5)

paraxanthine concentration µg/ml	% Analytical Recovery					range	Analytical Recovery MEAN \pm SD
	1	2	3	4	5		
1	106.57	112.62	105.84	97.1	105.31	97.1-112.62	105.49 \pm 5.54
2	95	105.59	89.91	91.75	110.8	89.91-110.8	98.67 \pm 9.19
8	97.34	109.47	91.91	92.53	97.41	91.91-109.47	97.73 \pm 7.05
Mean % Analytical Recovery = 100.63 ± 4.24							

ตารางที่ 11 แสดงค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์ caffeine ในซีรัม (N=5)

caffeine concentration $\mu\text{g/ml}$	% Analytical Recovery					range	Analytical Recovery MEAN \pm SD
	1	2	3	4	5		
1	104.08	91.09	102.54	97.64	97.47	91.09-104.08	98.56 \pm 5.1
2	94.85	95.25	92.77	96.97	99.35	92.77-99.35	95.84 \pm 2.47
8	99.75	107.13	98.54	95.77	101.97	95.77-107.13	100.63 \pm 4.27
Mean % Analytical Recovery = 98.34 \pm 2.4							

2.2 Physical recovery

ประสิทธิภาพของวิธีการสกัด paraxanthine และ caffeine ในซีรัมเพื่อการวิเคราะห์แสดงเป็น % Physical recovery พบว่า % Physical recovery ของ paraxanthine มีค่าระหว่าง 86.1 – 89.6 % มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 87.61 \pm 1.8% % Physical recovery ของ caffeine มีค่าระหว่าง 89.14 – 93.16 % มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 91.17 \pm 2.01 % แสดงดังตารางที่ 12-13

ตารางที่ 12 แสดงค่า Physical recovery ของวิธีวิเคราะห์ paraxanthine ในซีรัม (N=5)

paraxanthine concentration $\mu\text{g/ml}$	% Physical Recovery					range	Physical Recovery MEAN \pm SD
	1	2	3	4	5		
1	94.17	88.36	81.26	84.23	87.59	81.26-94.17	87.12 \pm 4.85
2	70.24	92.03	89.01	88.01	91.21	70.24-92.03	86.10 \pm 9.01
8	78.47	101.84	87.24	91.96	88.5	78.47-101.84	89.60 \pm 8.46
Mean Physical Recovery = 87.61 \pm 1.8							

ตารางที่ 13 แสดงค่า Physical recovery ของวิธีวิเคราะห์ caffeine ในซีรัม
(N=5)

caffeine concentration $\mu\text{g/ml}$	% Physical Recovery					Range	Physical Recovery MEAN \pm SD
	1	2	3	4	5		
1	89.48	84.26	86.19	92.62	93.13	84.26-93.13	89.14 \pm 3.89
2	86.16	94.99	91.79	92.12	90.95	86.16-94.99	91.2 \pm 3.2
8	85.13	104.25	91.92	91.08	93.43	85.13-104.25	93.16 \pm 6.95
Mean % Physical Recovery = 91.17 \pm 2.01							

3. ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

ความเที่ยงตรงของการวิเคราะห์ paraxanthine และ caffeine ในซีรัม แสดงดัง ตารางที่ 14-17 พบว่าค่า % RSD ของการวิเคราะห์ paraxanthine และ caffeine ในซีรัม สำหรับการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intraday precision) มีค่าเฉลี่ย 2.88% และ 3.07% ตามลำดับ การวิเคราะห์ในต่างวัน (interday precision) มีค่า % RSD เฉลี่ยสำหรับการ paraxanthine และ caffeine ในซีรัมเป็น 5.25% และ 5.78% ตามลำดับ

ตารางที่ 14 แสดงความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ paraxanthine ในซีรัม เมื่อทำการ
วิเคราะห์ในวันเดียวกัน (Intraday precision) (N=5)

concentration $\mu\text{g/ml}$	peak area ratio (Mean \pm SD)	% RSD
1	0.485 \pm 0.018	3.85
2	1.039 \pm 0.007	0.74
8	3.592 \pm 0.145	4.06
Mean % RSD		2.88

ตารางที่ 15 แสดงความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ paraxanthine ในซีรัม เมื่อทำการวิเคราะห์ต่างวัน (Interday precision) (N=3)

concentration μg/ml	peak area ratio (Mean ± SD)	% RSD
1	0.5 ± 0.03	6.08
2	0.952 ± 0.08	7.91
8	3.658 ± 0.07	1.77
	Mean %RSD	5.25

ตารางที่ 16 แสดงความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ caffeine ในซีรัม เมื่อทำการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (Intraday precision) (N=5)

concentration μg/ml	peak area ratio (Mean ± SD)	% RSD
1	0.478 ± 0.023	4.89
2	0.865 ± 0.014	1.72
8	3.675 ± 0.095	2.6
	Mean %RSD	3.07

ตารางที่ 17 แสดงความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ caffeine ในซีรัม เมื่อทำการวิเคราะห์ต่างวัน (Interday precision) (N=3)

concentration μg/ml	peak area ratio (Mean ± SD)	% RSD
1	0.434 ± 0.04	9.24
2	0.842 ± 0.026	3.06
8	3.454 ± 0.191	5.032
	Mean %RSD	5.78

4. ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

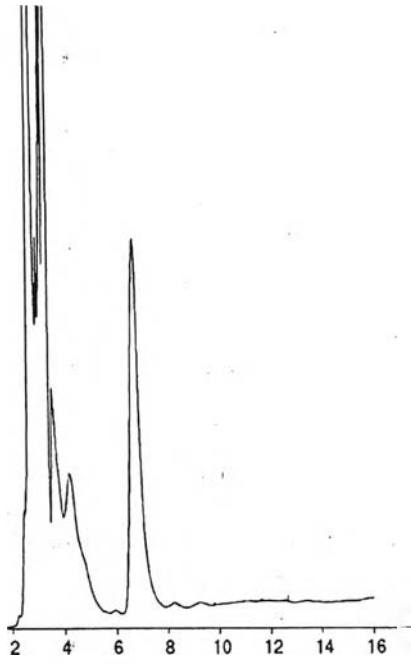
ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์แสดงโดยโครมาโตแกรมในรูปที่ 8 พบว่า retention time ของ paraxanthine ในซีรัม เมื่อฉีดแต่ละครั้งมีค่าใกล้เคียงกันคืออยู่ระหว่าง 8 และ 8.1 นาที retention time ของ caffeine อยู่ระหว่าง 14.1 และ 14.2 นาที ซึ่งตรงกับสารละลายมาตรฐานในน้ำและแยกจากพีคของ 8-chlorotheophylline ที่ใช้เป็น internal standard ซึ่งมี retention time ในช่วง 10.1 และ 10.2 นาที ทั้งนี้พีคทั้งสามไม่ถูกรบกวนด้วยสารอื่น ๆ ในซีรัมโดยเปรียบเทียบกับ blank

5. ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

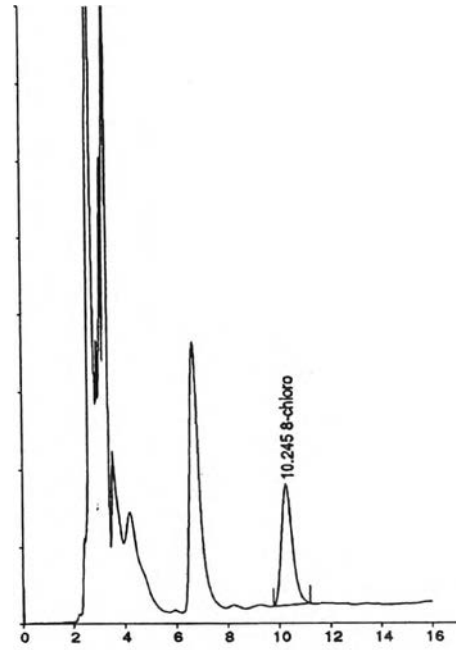
ความเป็นเส้นตรงแสดงด้วยความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ paraxanthine หรือ caffeine ในซีรัมกับ peak area ratio มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 – 8 μg/ml ดังรูป ที่ 9 และรูปที่ 10 โดยการวิเคราะห์จากสมการ $Y = ax + b$ เมื่อ Y เป็นค่า peak area ratio x เป็นความเข้มข้นของ paraxanthine หรือ caffeine ในซีรัม มีค่า Coefficient of Determination (R^2) ของ paraxanthine เท่ากับ 0.9999 และ Coefficient of Determination (R^2) ของ caffeine เท่ากับ 0.9996

6. ความคงตัวของสารละลายมาตรฐาน (stability)

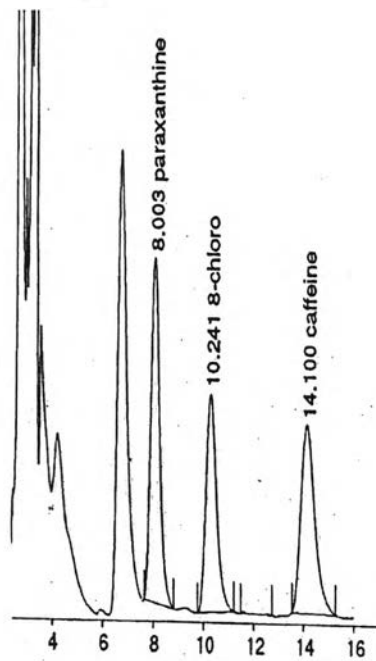
การศึกษาความคงตัวของ paraxanthine และ caffeine ในซีรัมตั้งแต่ 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 และ 24 สัปดาห์ให้ผลดังกราฟรูปที่ 11-12 และภาคผนวก ง. พบว่า paraxanthine และ caffeine มีค่าความคงตัวดี กล่าวคือตั้งแต่ 1 - 24 สัปดาห์ ค่า area ratio ในแต่ละช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่างจนถึง 24 สัปดาห์มีค่าใกล้เคียงกับค่า area ratio ที่เวลา 0



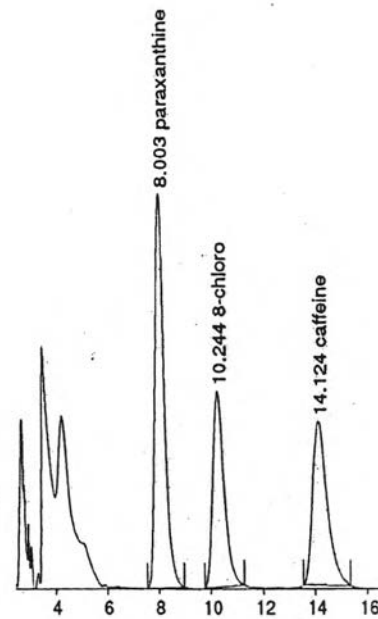
ก.



ข.



ค.



ง.

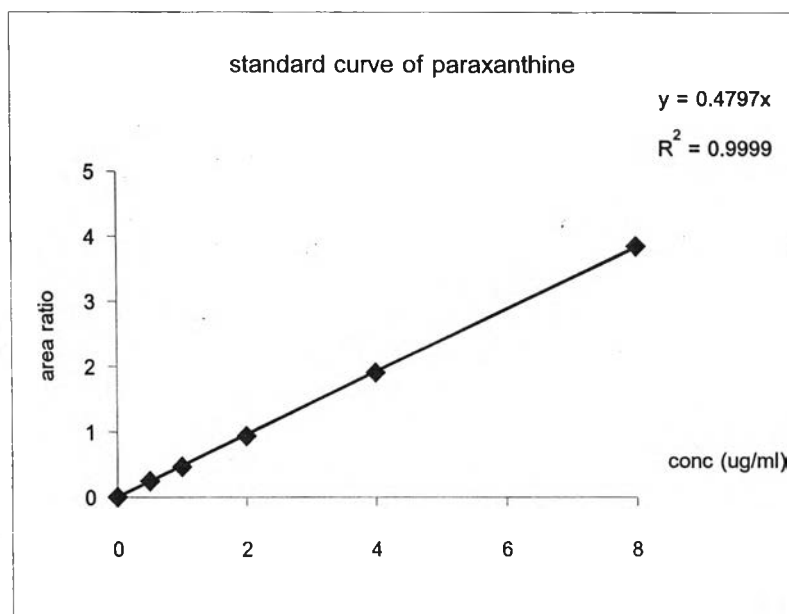
รูปที่ 8 แสดงโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ paraxanthine และ caffeine ในซีรัม

ก. blank serum

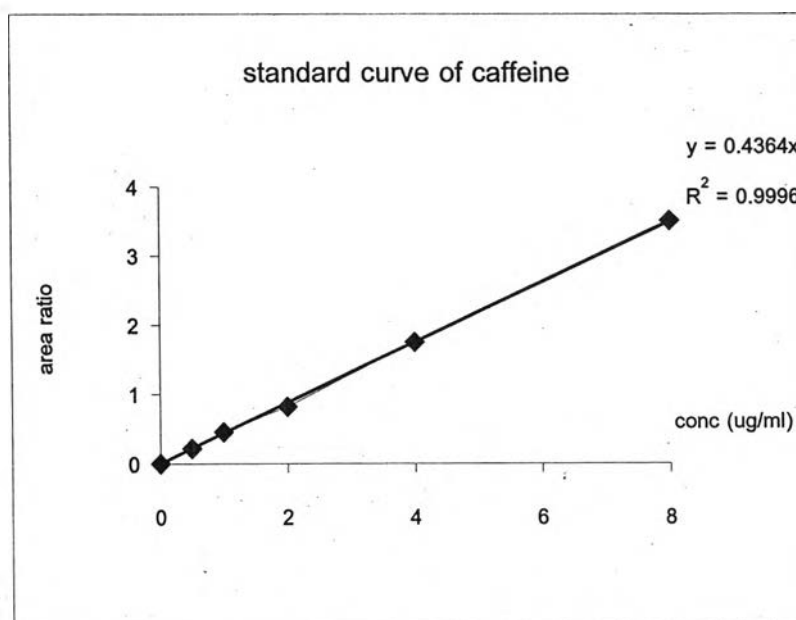
ข. blank serum + internal standard

ค. blank serum + paraxanthine + internal standard + caffeine

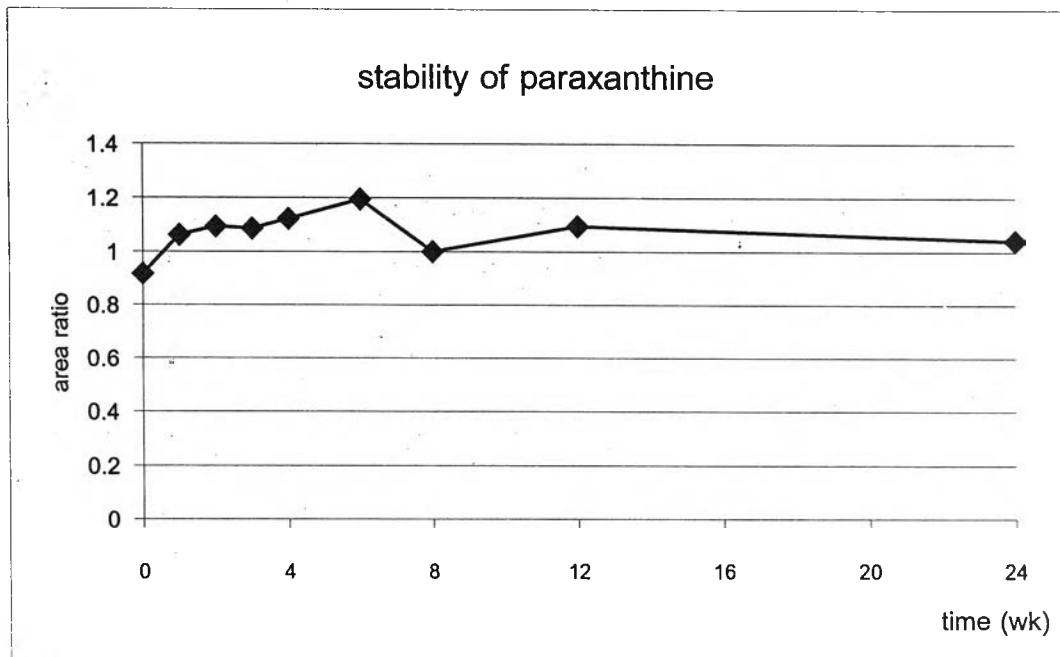
ง. สารละลายมาตรฐานของ paraxanthine + internal standard + caffeine ในน้ำ



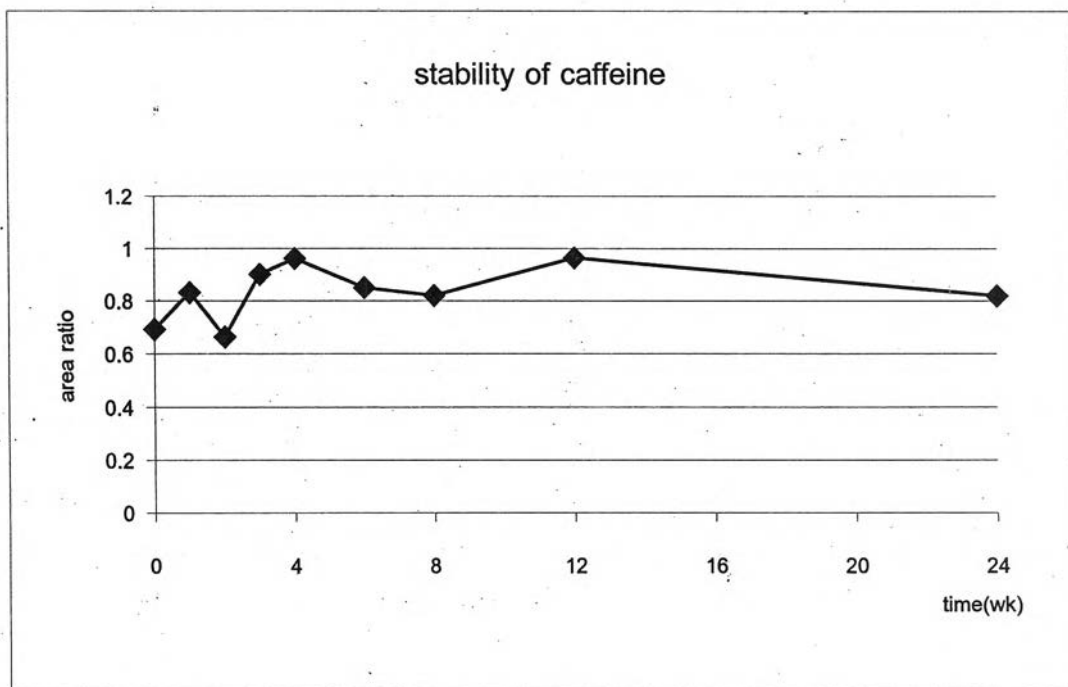
รูปที่ 9 แสดงกราฟมาตรฐานของ paraxanthine ในซีรัม



รูปที่ 10 แสดงกราฟมาตรฐานของ caffeine ในซีรัม



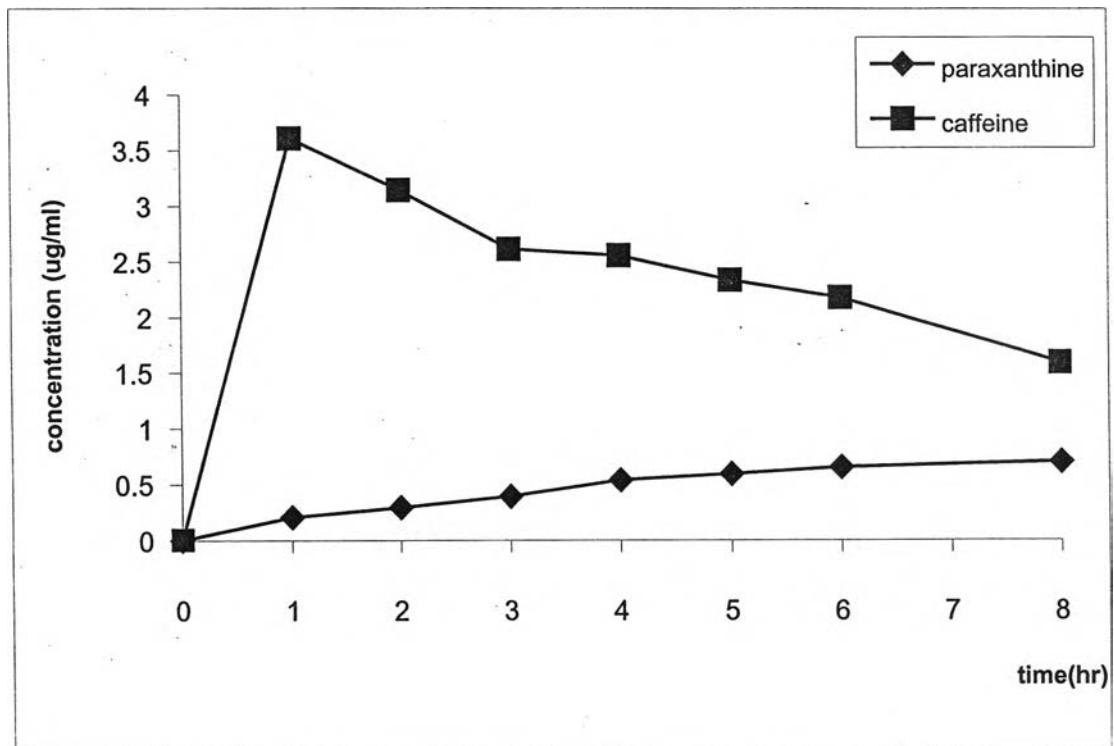
รูปที่ 11 กราฟแสดงความคงตัวของ paraxanthine ความเข้มข้น 2 $\mu\text{g/ml}$



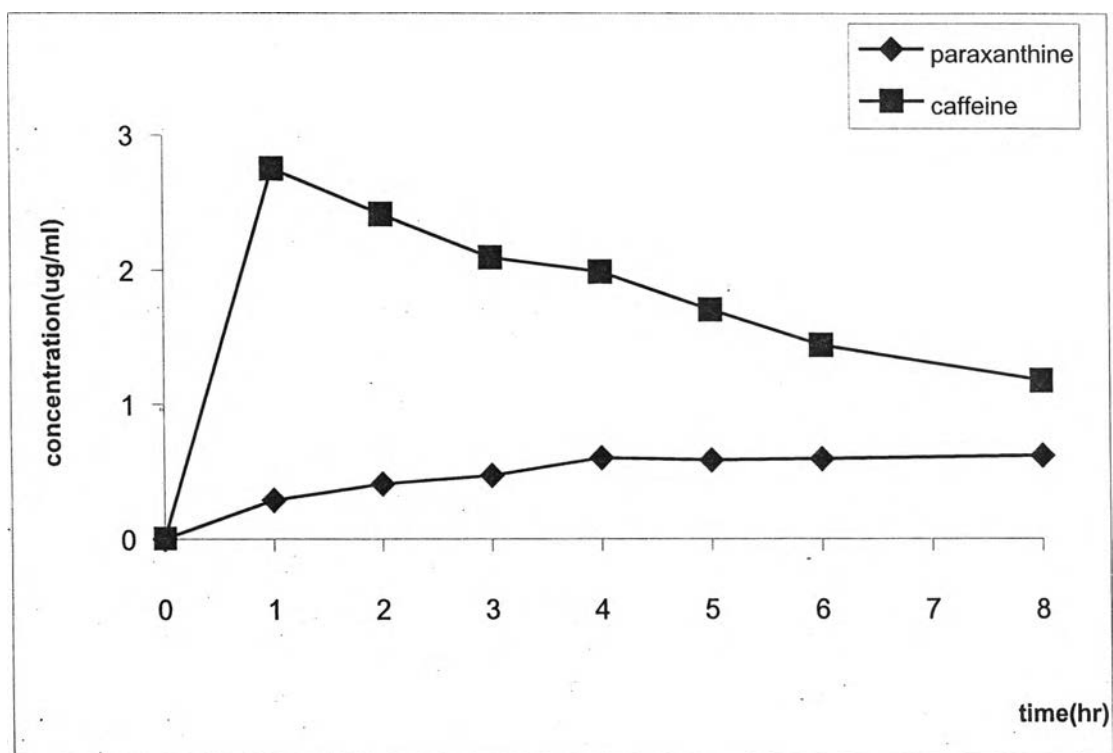
รูปที่ 12 กราฟแสดงความคงตัวของ caffeine ความเข้มข้น 2 $\mu\text{g/ml}$

ส่วนที่ 2 ผลการศึกษานำร่อง

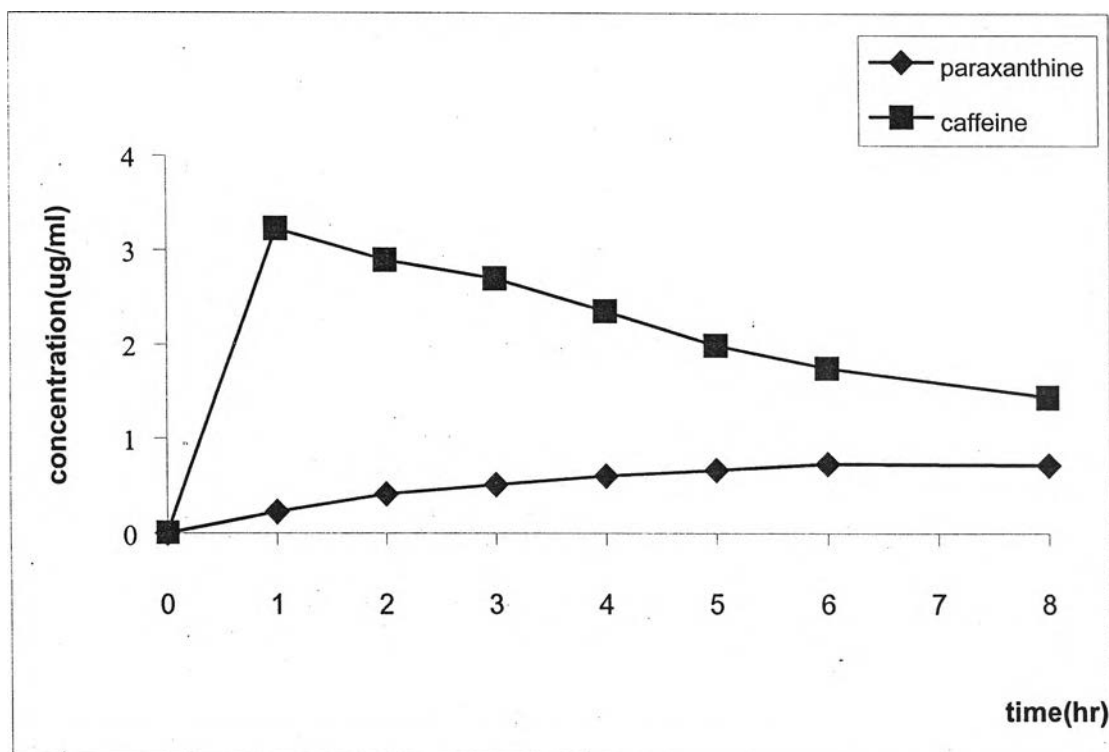
การศึกษานำร่องในอาสาสมัครสุขภาพปกติจำนวน 3 คน เพื่อหาขนาดของ caffeine และเวลาที่เหมาะสมในการเจาะเลือด พบว่าขนาดของ caffeine ที่ใช้คือ 180 mg ซึ่งเป็นขนาดที่ไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียง และสามารถตรวจวัดได้ เวลาที่เหมาะสมในการเจาะเลือดเพื่อหาอัตราส่วนระหว่าง paraxanthine และ caffeine คือ ชั่วโมงที่ 5 หลังรับประทาน caffeine อันเป็นเวลาที่เหมาะสมที่จะเจาะเลือดเพื่อหาระดับ paraxanthine ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ของ caffeine โดยเป็นเวลาในช่วงต้นและตรวจวัด paraxanthine ได้ในระดับสูงสุด ผลของระดับ paraxanthine และ caffeine ณ เวลาต่าง ๆ ของอาสาสมัคร 3 รายในการศึกษานำร่อง แสดงดังรูปที่ 13-16 และภาคผนวก จ-ฉ



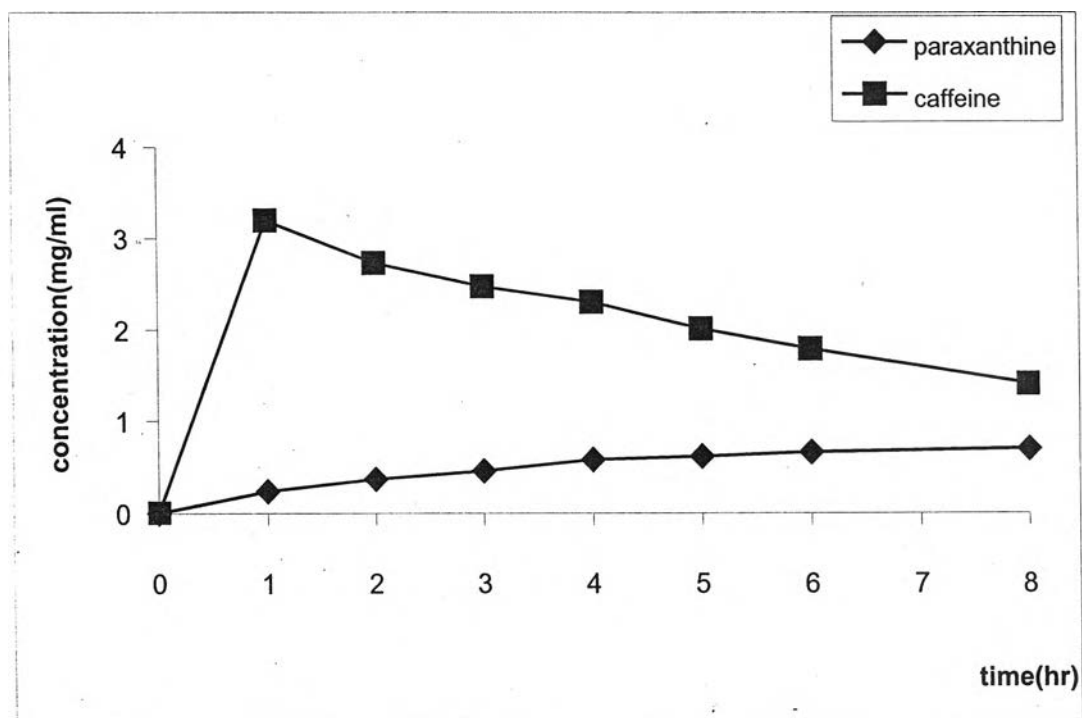
รูปที่ 13 แสดงความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในอาสาสมัครคนที่ 1 ณ เวลาต่าง ๆ



รูปที่ 14 แสดงความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรัมของอาสาสมัคร คนที่ 2 ณ เวลาต่าง ๆ



รูปที่ 15 แสดงความเข้มข้นของ paraxanthine และ caffeine ในซีรัมของอาสาสมัคร คนที่ 3 ณ เวลาต่าง ๆ



รูปที่ 16 แสดงค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ caffeine และ paraxanthine ในซีรัมของอาสาสมัคร 3 รายในการศึกษานำร่อง ณ เวลาต่าง ๆ

ส่วนที่ 3 ผลการศึกษาในกลุ่มตัวอย่าง

ลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างใช้แบบสอบถามเป็นเกณฑ์การคัดเลือก ประกอบด้วยตัวอย่าง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมเป็นชาวบ้านตำบลหนองยาวและตำบลบ้านช่อง อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา มีอายุระหว่าง 29-45 ปี (38.71 ± 4.91) น้ำหนักระหว่าง 45-74 กิโลกรัม (59.86 ± 8.78) มีอาชีพทำนา ทำสวน แม่บ้าน เป็นต้น และเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับความร้อนจากท่อไอเสียรถยนต์มาประมาณ 1 ปีขึ้นไป ส่วนกลุ่มทดลองเป็นพนักงานเก็บค่าโดยสารพิเศษหญิง รถโดยสารไม่ปรับอากาศขององค์การขนส่งมวลชนกรุงเทพ ฯ ซึ่งทำงานมาประมาณ 1 ปีขึ้นไป ทำงานสัปดาห์ละ 6 วัน วันละ 8 -12 ชั่วโมง มีอายุระหว่าง 25-40 ปี (33.13 ± 4.96) น้ำหนักระหว่าง 42-75 กิโลกรัม (54.27 ± 8.1)

ตารางที่ 18 แสดงลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

parameter	control (n=14)		exposed (n=15)	
	range	mean \pm SD	range	mean \pm SD
age (yr)	29-45	38.71 \pm 4.91	25-40	33.13 \pm 4.96
weight (kg)	45-74	59.86 \pm 8.78	42-75	54.27 \pm 8.1
height (cm)	150-168	158.79 \pm 4.17	141-165	155.8 \pm 5.6
SBP(mmHg)	100-130	115 \pm 7.6	90-120	106.67 \pm 9.76
DBP(mmHg)	60-90	74.29 \pm 8.52	60-80	68.67 \pm 7.43

ผลการตรวจสารชีวเคมีในเลือดเพื่อประเมินการทำงานของตับและไต

การตรวจสารชีวเคมีในเลือดประกอบด้วย SGOT, SGPT, TB, AP, Albumin, AP, BUN และ Cr พบว่ากลุ่มควบคุมมีค่าสารชีวเคมีในเลือดเท่ากับ 19.71 \pm 3.95, 17.14 \pm 6.21, 0.37 \pm 0.12, 3.93 \pm 0.23, 59.79 \pm 17, 10.36 \pm 2.27 และ 0.86 \pm 0.08 ตามลำดับ กลุ่มทดลองมี

ค่าสารชีวเคมีในเลือดเท่ากับ 18.4 ± 4.27 , 15 ± 6.19 , 0.47 ± 0.14 , 4.23 ± 0.23 , 68.47 ± 19.86 , 10 ± 2.62 และ 0.76 ± 0.16 ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 แสดงค่าสารชีวเคมีในเลือดของกลุ่มตัวอย่าง

parameter	control (n=14)		exposed (n=15)	
	range	mean \pm SD	Range	mean \pm SD
SGOT(U/L)	14-30	19.71 ± 3.95	14-30	18.4 ± 4.27
SGPT(U/L)	8-32	17.14 ± 6.21	8-34	15 ± 6.19
TB (mg/dl)	0.21-0.62	0.37 ± 0.12	0.29-0.79	0.47 ± 0.14
Albumin(g/dl)	3.5-4.4	3.93 ± 0.23	3.7-4.6	4.23 ± 0.23
AP (U/L)	29-93	59.79 ± 17	44-117	68.47 ± 19.86
BUN (mg/dl)	7-16	10.36 ± 2.27	7-16	10 ± 2.62
Creatinine (mg/dl)	0.7-1	0.86 ± 0.08	0.4-1	0.76 ± 0.16

ค่าปกติของสารชีวเคมีในเลือด

SGOT	= 0 – 38	U/L
SGPT	= 0 – 38	U/L
TB	= 0 – 1	mg/dl
Albumin	= 3.4 – 5.5	g/dl
AP	= 39 – 177	U/L
BUN	= 10 – 20	mg/dl
Cr	= 0.5 – 2	mg/dl

ผลการวัดความเข้มข้นของ paraxanthine(17X) และ caffeine(137X) ในซีรัม

ความเข้มข้นของ 17X และ 137X ในซีรัมของกลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $0.64 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ (0.33 - 0.79) และ $2.1 \pm 0.49 \mu\text{g/ml}$ (1.28 - 2.91) ตามลำดับ มีค่า paraxanthine / caffeine ratio เท่ากับ 0.33 ± 0.12 (0.16-0.61) ดังตารางที่ 20

ความเข้มข้นของ 17X และ 137X ในซีรัมของกลุ่มทดลองมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $0.8 \pm 0.22 \mu\text{g/ml}$ (0.50 - 1.31) และ $1.95 \pm 0.57 \mu\text{g/ml}$ (1.16 - 3.47) ตามลำดับ มีค่า paraxanthine / caffeine ratio ระหว่าง 0.18-0.70 (0.45 ± 0.18) ดังตารางที่ 20

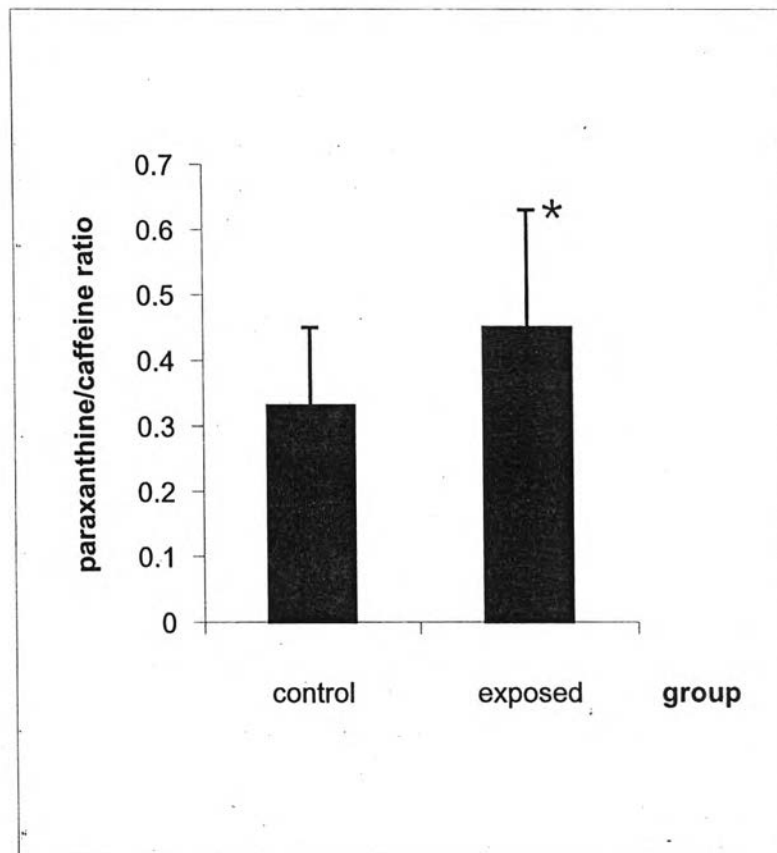
เปรียบเทียบค่า paraxanthine / caffeine ratio ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง แสดงดังรูปที่ 17

จากการทดสอบทางสถิติพบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีค่า paraxanthine/caffeine ratio ในซีรัมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P = 0.043$

ตารางที่ 20 แสดงความเข้มข้นของ paraxanthine (17X), caffeine (137X) และ paraxanthine/caffeine ratio (17X/137X) ในกลุ่มตัวอย่าง

NO	กลุ่มควบคุม (N=14)			กลุ่มทดลอง (N=15)		
	17X	137X	17X/137X	17X	137X	17X/137X
1	0.52	2.18	0.24	0.79	1.16	0.68
2	0.69	2.18	0.32	0.55	2.16	0.26
3	0.71	1.83	0.39	0.81	1.42	0.57
4	0.66	1.61	0.41	0.56	1.82	0.31
5	0.79	1.78	0.44	0.61	3.47	0.18
6	0.70	1.59	0.44	0.50	2.32	0.22
7	0.68	2.87	0.24	0.78	2.18	0.36
8	0.47	2.41	0.19	1.04	1.49	0.70
9	0.73	1.89	0.39	0.69	2.48	0.28
10	0.79	1.28	0.61	0.71	1.32	0.54
11	0.33	2.07	0.16	1.31	1.89	0.69
12	0.54	2.07	0.26	0.69	2.11	0.33
13	0.76	2.91	0.26	0.97	1.85	0.52
14	0.65	2.71	0.24	0.98	1.89	0.52
15	-	-	-	0.94	1.60	0.59
mean	0.64	2.10	0.33	0.80	1.95	0.45
SD	0.13	0.49	0.12	0.22	0.57	0.18

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ค่า P < 0.05



รูปที่ 17 แสดงค่าเฉลี่ย paraxanthine/caffeine ratio ในซีรัมของกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลอง

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ค่า $P < 0.05$

ส่วนที่ 4 ผลการตรวจวัดระดับ carbonmonoxide ในเลือด

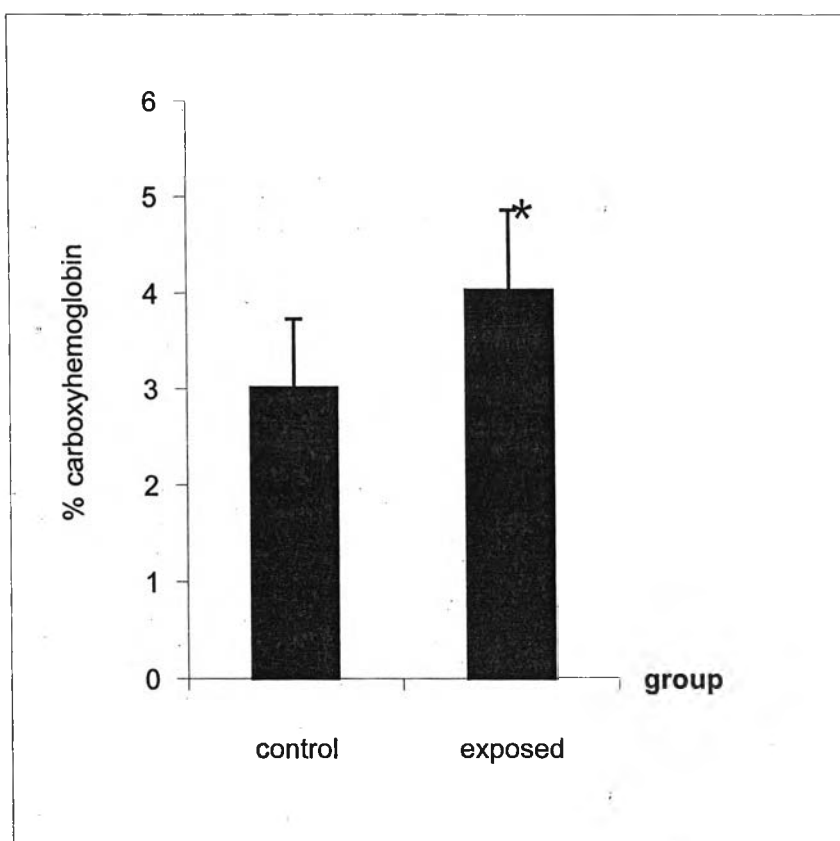
ระดับ carbonmonoxide ในเลือดแสดงในรูปของ % carboxyhemoglobin พบว่าในกลุ่มควบคุมมีค่า % carboxyhemoglobin ในเลือดเท่ากับ 3.01 ± 0.72 % (1.5 – 4.5) กลุ่มทดลองมีค่า % carboxyhemoglobin ในเลือดระหว่าง 4.03 ± 0.83 % (2.75 – 5.5) ดังตารางที่ 21 และรูปที่ 18

จากการทดลองพบว่ากลุ่มควบคุมมีระดับ carbonmonoxide ในเลือดแตกต่างจากกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ P = 0.001

ตารางที่ 21 แสดงระดับ carbonmonoxide ในเลือดเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

NO	กลุ่มควบคุม (N=15)	กลุ่มทดลอง (N=15)
1	2.63	5.13
2	3.00	4.50
3	4.00	3.00
4	3.00	4.00
5	3.25	4.75
6	3.00	5.50
7	3.25	3.75
8	4.50	4.00
9	2.25	3.38
10	3.13	4.13
11	3.00	2.75
12	3.50	3.88
13	3.00	2.75
14	2.13	4.00
15	1.50	4.88
Mean	3.01	4.03*
SD	0.72	0.83

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ค่า P < 0.05



รูปที่ 18 แสดง % carboxyhemoglobin ในเลือดระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ค่า $P < 0.05$