บทที่ 3

วิธีการ

3.1 การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

3.1.1 สารละลายมาตรฐานของกลุ่มแอมเฟตามีน 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ละลายแอมเฟตามีนซัลเฟต พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนไฮโดรโบรไมด์ พีนิลโปรปาโนลามีนไฮโดรคลอไรด์ เอฟฟีดรีนไฮโดรคลอไรด์ เมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ และไทรามีนไฮโดรคลอไรด์ อย่างละ 5 มิลลิกรัมในเมทานอล 10 มิลลิลิตร

3.1.2 สารละลายแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีนมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร

ละลายแอมเฟตามีนซัลเฟต พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนไฮโดรโบรไมด์ และไทรามีนไฮโดรคลอไรด์ อย่างละ 10 มิลลิกรัม ในเมทานอล หรือน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

3.1.3 สารละลายแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนมาตรฐาน 0.4 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร

นำสารละลายแอมเฟตามีน และ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน 1 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น (จากข้อ 3.1.2) มา 4 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร

3.1.4 สารละลายกรดเกลือ 2.2 โมลต่อลิตร

เติมกรดเกลือเข้มข้น (36.5 % โดยน้ำหนัก ความหนาแน่น 1.18 กรัมต่อมิลลิลิตร) 18.5 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 81.5 มิลลิลิตร

3.1.5 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมล ต่อลิตร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัม ด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

3.1.6 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลต่อลิตร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

3.1.7 สารละลายเบนซิลอามีนมาตรฐาน 0.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นำเบนซิลอามีน (ความหนาแน่น 0.983 กรัมต่อมิลลิลิตร) มา 10 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

3.2 การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดอิพพิวริคโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี

3.2.1 สารละลายกรดอิพพิวริคมาตรฐาน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายกรดอิพพิวริค 0.01 กรัมในเอทิลอะซีเตท 10 มิลลิลิตร นำสารละลายนี้มา 1 มิลลิลิตร เติมเอทิลอะซีเตท 9 มิลลิลิตร

3.2.2 สารละลายพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ในไพริดีน 0.5 % น้ำหนักต่อปริมาตร

ละลายพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ 0.5 กรัม ในไพริดีน 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้เตรียมแล้วใช้ทันที

3.2.3 สารละลายกรดเบนโซอิคมาตรฐาน 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายกรดเบนโซอิค 0.005 กรัม ในเมทานอล 10 มิลลิลิตร

3.2.4 สารละลายยูเรียมาตรฐาน 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายยูเรีย 0.005 กรัม ในเมทานอล 10 มิลลิลิตร

3.2.5 สารละลายกรดเกลือเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร

เติมกรดเกลือเข้มข้น (36.5 % โดยน้ำหนัก ความหนาแน่น 1.18 กรัมต่อมิลลิลิตร) 8.5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 91.5 มิลลิลิตร

3.3 การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณครีเอตินีนโดยวิธีอัลคาไลน์พิเครท

3.3.1 สารละลายครีเอตินีนมาตรฐาน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายครีเอตินีน 0.01 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร นำสารละลายนี้มา 1 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร

3.3.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15 % น้ำหนักต่อปริมาตร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15 กรัม ด้วยน้ำกลั่น จนครบ 100 มิลลิลิตร

3.3.3 สารละลายกรดพิคริกอิ่มตัว

ละลายกรดพิคริกในน้ำกลั่นจนสารละลายอิ่มตัว

3.4 การเตรียมสารละลายสำหรับศึกษาเมตาบอลิสมของแอมเฟตามีนในสุนัข

3.4.1 สารละลายแอมเฟตามีนซัลเฟตในซาไลน์ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งแอมเฟตามีนซัลเฟต 0.2 กรัม ใส่ในขวดแล้วปิดขวดด้วยผ้าก๊อซ นำไปอบฆ่าเชื้อโดยการอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 165 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วปิดขวดใหม่ด้วยจุกยางที่ฆ่าเชื้อโดยแช่ในแอบโซลูทแอลกอฮอล์ แล้วปิดทับด้วยฝาอะลูมิเนียม เมื่อต้องการใช้จึงนำมาทำเป็นสารละลายโดยฉีดนอร์มอลซาไลน์ 0.9 % ที่ปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตรลงในขวดแอมเฟตามีนซัลเฟตที่เตรียมไว้

3.4.2 สารละลาย เอทานอลในซาไลน์ 50 % โดยปริมาตร

ละลายแอบโซลูทเอทานอล (ความหนาแน่น 0.7876 กรัมต่อมิลลิลิตร) 50 มิลลิลิตร ในนอร์มอลซาไลน์ 0.9 % ที่ปลอดเชื้อ 50 มิลลิลิตร

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะและซีรัมโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

ใช้คอลัมน์แก้วขนาด 1500 x 4 มิลลิเมตร บรรจุด้วย 3 % OV-17 บน Gas Chrom Q, 100-120 mesh ใช้ดีเทคเตอร์แบบ Flame Ionization Detector (FID) อุณหภูมิของคอลัมน์ 175 องศาเซลเซียส และใช้แก๊สไนโตรเจน เป็นตัวพาด้วยอัตราเร็ว 40 มิลลิลิตรต่อนาที

3.5.1 การวิเคราะห์สารมาตรฐานกลุ่มแอมเฟตามีนเชิงคุณภาพ

นำสารละลายมาตรฐานของแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน เมทแอมเฟตามีน เอฟฟีดรีน ฟีนิลโปรปาโนลามีน และ ไทรามีน เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตรใน

เมทานอล (จากข้อ 3.1.1) มาอย่างละ 100 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้งโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน เติมเอทิลอะซีเตท 0.5 มิลลิลิตร เตรียมอนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามีดตามวิธีของ Javaid และ Davis (1981) โดยเติมไตรฟลูโอโรอะซีติคแอนไฮไดรด์ 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) นาน 1 ชั่วโมง แล้วระเหยไตรฟลูโอโรอะซีติคแอนไฮไดรด์ที่เหลือ โดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน ละลายอนุพันธ์ที่เตรียมได้ในเอทิลอะซีเตท 100 ไมโครลิตร ฉีดสารละลายนี้ 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ บันทึกค่า retention time ของสารแต่ละชนิดไว้

3.5.2 <u>การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ และเวลา ต่อการเตรียมอนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามีด ของแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และ ไทรามีน</u>

นำสารละลายแอมเฟตามีนมาตรฐาน 1 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตรในเมทานอล (จากข้อ 3.1.2) มา 5 ไมโครลิตร และสารละลายพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีนมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเมทานอล (จากข้อ 3.1.2) มาอย่างละ 10 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้งโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน เติมเอทิลอะซีเตท และไตรฟลูโอโรอะซีติคแอนไฮไดรด์อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่สภาวะต่าง ๆ กันคือ อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) นาน 30 และ 60 นาที หรือในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 และ 30 นาที แล้วระเหยสารละลายให้แห้ง โดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน ละลายอนุพันธ์ที่เตรียมได้ในเอทิลอะซีเตท 50 ไมโครลิตร ฉีดสารละลายของอนุพันธ์ทั้งสาม ซึ่งเตรียมที่สภาวะต่าง ๆ 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ วัดความสูงของพีคที่ได้

3.5.3 <u>การสกัดแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน จากปัสสาวะสุนัข</u>

การวิเคราะห์ปริมาณแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนทั้งหมดในปัสสาวะต้องไฮโดรไลซ์ปัสสาวะก่อน เพื่อเปลี่ยนแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในรูปกลูคิวโรไนด์ ให้อยู่ในรูปปรกติ โดยนำปัสสาวะสุนัขมาทำกลูคิวโรไนด์ ไฮโดรไลซีส (glucuronide hydrolysis) ดังนี้ ปัสสาวะ 10 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือเข้มข้น 2.2 โมลต่อลิตร 5 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมาปรับ pH เป็น 8 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 โมลต่อลิตร แล้วสกัดตามวิธีต่อไปนี้

009213

นำปัสสาวะที่ผ่านการไฮโดรไลซ์แล้ว 1.5 มิลลิลิตร (เท่ากับปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร) มาเติมสารละลายไทรามีนมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น (จากข้อ 3.1.2) 10 ไมโครลิตร เพื่อเป็น internal standard เติมผงโซเดียมคาร์บอเนต แอนไฮดรัส จนสารละลายอิ่มตัว แล้วเติมเอทิลอะซีเตท 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าตามแนวตั้ง 1 นาที ดูดชั้นเอทิลอะซีเตทมา 0.5 มิลลิลิตร นำไปเตรียมอนุพันธ์ ตามวิธีในข้อ 3.5.5

3.5.4 <u>การสกัดแอมเฟตามีนจากซีรัมสุนัข</u>

นำซีรัม 1 มิลลิลิตร มาปรับ pH ให้เป็น 11.5 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 โมลต่อลิตร เติมสารละลายไทรามีนมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น (จากข้อ 3.1.2) 5 ไมโครลิตร เพื่อเป็น internal standard แล้วสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท 2 ครั้ง ครั้งละ 2 และ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าตามแนวตั้ง ครั้งละ 1 นาที ดูดชั้นเอทิลอะซีเตทมาทั้งหมดแล้วระเหยโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน จนเหลือปริมาตรประมาณ 0.5 มิลลิลิตร นำไปเตรียมอนุพันธ์ตามวิธีในข้อ 3.5.5

3.5.5 <u>การเตรียมอนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามีด</u>

นำสารละลายแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีน ในเอทิลอะซีเตท 0.5 มิลลิลิตร มาเติมไตรฟลูโอโรอะซีติคแอนไฮไดรด์ 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วระเหยให้แห้งโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน ละลายอนุพันธ์ที่เตรียมได้ในเอทิลอะซีเตท 50 ไมโครลิตร ฉีดสารละลายนี้ 1 ไมโครลิตรเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ในกรณีที่วิเคราะห์ปัสสาวะ และฉีดสารละลาย 2 ไมโครลิตร ในกรณีที่วิเคราะห์ซีรัม

3.5.6 <u>การศึกษาเปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรีของการสกัด</u>

3.5.6.1 <u>การสร้างกราฟมาตรฐานของแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีน</u>

นำสารละลายแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีนมาตรฐาน 1 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตรในเมทานอล (จากข้อ 3.1.2) มาอย่างละ 5, 10, 15 และ 20 ไมโครลิตร ระเหยเมทานอลออกโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วละลายในเอทิลอะซีเตท 0.5 มิลลิลิตร นำไปเตรียมอนุพันธ์ และฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ตามวิธีในข้อ 3.5.5

วัดความสูงของพีคของแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีน แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของพีค กับ ความเข้มข้นของสารทั้งสาม

3.5.6.2 การสกัดแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีนมาตรฐานจากปัสสาวะ

นำสารละลายแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีนมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเมทานอล (จากข้อ 3.1.2) มาอย่างละ 10 และ 20 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้ง เติมปัสสาวะสุนัขปรกติ ที่ผ่านการไฮโดรไลซ์แล้ว ตามวิธีในข้อ 3.5.3 1.5 มิลลิลิตร สกัด เตรียมอนุพันธ์ และวิเคราะห์ ตามวิธีในข้อ 3.5.3 และ 3.5.5

3.5.6.3 การสกัดแอมเฟตามีน และไทรามีนมาตรฐานจากซีรัม

นำสารละลายแอมเฟตามีน และ ไทรามีนมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเมทานอล (จากข้อ 3.1.2) มาอย่างละ 10 และ 20 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้ง เติมซีรัมสุนัขปรกติ 1 มิลลิลิตร สกัด เตรียมอนุพันธ์และวิเคราะห์ ตามวิธีในข้อ 3.5.4 และ 3.5.5

คำนวณหาปริมาณแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีน จากกราฟมาตรฐานในข้อ 3.5.6.1 แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรีของการสกัดดังนี้

$$\% \text{ รีคอบเวอรีของการสกัด} = \frac{\text{ปริมาณสารที่คำนวณได้}}{\text{ปริมาณสารที่เติมลงไป}} \times 100$$

3.5.7 การศึกษาอิทธิพลของขั้นตอนการทำกลูคิวโรไนด์ ไฮโดรไลซิส ต่อการวิเคราะห์ปริมาณ แอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะ

เปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนมาตรฐานในปัสสาวะสุนัขปรกติ ที่เติมสารมาตรฐานก่อนทำกลูคิวโรไนด์ ไฮโดรไลซิส กับปริมาณที่วิเคราะห์ได้จากการเติมสารมาตรฐานลงในปัสสาวะที่ทำกลูคิวโรไนด์ ไฮโดรไลซิส ทิ้งไว้ โดยนำสารละลายแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเมทานอล (จากข้อ 3.1.2) มาอย่างละ 10 ไมโครลิตร ระเหยเมทานอลออก แล้วเติมปัสสาวะสุนัขปรกติ 1 มิลลิลิตร นำไปไฮโดรไลซ์ตามวิธีในข้อ 3.5.3 หรือเติมปัสสาวะสุนัขปรกติที่ผ่านการไฮโดรไลซ์แล้ว 1.5 มิลลิลิตร สกัดเตรียมอนุพันธ์และวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 3.5.3 และ 3.5.5 คำนวณ

หาปริมาณแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน จากกราฟมาตรฐานในข้อ 3.5.6.1

3.5.8 การสร้างกราฟมาตรฐานของแอมเฟตามีนในซีรัม

เตรียมซีรัมที่มีแอมเฟตามีนมาตรฐาน 1, 2, 4, 6 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำสารละลายแอมเฟตามีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (จากข้อ 3.1.3) มา 5, 10, 20, 30 และ 40 ไมโครลิตร เติมซีรัมลุ่นัยปรกติที่ปรับ pH เป็น 11.5 แล้ว 2 มิลลิลิตร นำซีรัมนี้มา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายไทรามีนมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น (จากข้อ 3.1.2) 5 ไมโครลิตร เพื่อเป็น internal standard สกัด เตรียมอนุพันธ์ และฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ตามวิธีในข้อ 3.5.4 และ 3.5.5 วัดความสูงของพีคของแอมเฟตามีน และไทรามีน แล้วหาอัตราส่วนระหว่างความสูงของพีคของสารทั้งสอง เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความสูงของพีคแอมเฟตามีนต่อไทรามีนกับความเข้มข้นของแอมเฟตามีน

3.5.9 การสร้างกราฟมาตรฐานของแอมเฟตามีนและพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะ

เตรียมปัสสาวะที่มีแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนมาตรฐาน 2, 4, 5, 8, 10, 15 และ 20 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร โดยนำสารละลายแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนมาตรฐาน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่น (จากข้อ 3.1.2) มาอย่างละ 5, 10, 15 และ 20 ไมโครลิตร และสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (จากข้อ 3.1.3) มา 5, 10 และ 20 ไมโครลิตร เติมปัสสาวะลุ่นัยปรกติที่ผ่านการไฮโดรไลซ์แล้ว 1.5 มิลลิลิตร (เท่ากับปัสสาวะปริมาตร 1 มิลลิลิตร) และเติมสารละลายไทรามีนมาตรฐาน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น (จากข้อ 3.1.3) 10 ไมโครลิตร เพื่อเป็น internal standard สกัด เตรียมอนุพันธ์ และฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ตามวิธีในข้อ 3.5.3 และ 3.5.5 วัดความสูงของพีคของแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนและไทรามีน แล้วหาอัตราส่วนระหว่างความสูงของพีคของแอมเฟตามีน หรือพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนกับไทรามีน เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความสูงของพีค แอมเฟตามีน หรือ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน ต่อไทรามีน กับความเข้มข้นของสารทั้งสอง

3.5.10 การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมเฟตามีนในซีรัม

3.5.10.1 การศึกษาความไว (Sensitivity)

เตรียมซีรัมที่มีแอมเฟตามีนมาตรฐาน 0-2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์หาปริมาณแอมเฟตามีนตามวิธีในข้อ 3.5.4 และ 3.5.5 โดยทำการทดลองซ้ำกัน 4 ครั้ง อ่านค่าปริมาณแอมเฟตามีนจากกราฟมาตรฐานในข้อ 3.5.8 ในการศึกษาครั้งนี้กำหนดให้ความเข้มข้นของแอมเฟตามีน ที่ให้ความสูงของพีค 1 เซนติเมตร เป็นความไวของการวัดปริมาณแอมเฟตามีน โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

3.5.10.2 การศึกษาความแม่นยำ (Precision)

เตรียมซีรัมที่มีแอมเฟตามีนมาตรฐาน 2, 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์หาปริมาณแอมเฟตามีน ตามวิธีในข้อ 3.5.4 และ 3.5.5 โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ครั้ง ในการทดลองเดียวกัน และทำการทดลองความเข้มข้นละ 1 ครั้ง ทั้งหมด 10 การทดลอง อ่านค่าปริมาณแอมเฟตามีนจากกราฟมาตรฐาน ในข้อ 3.5.8 แล้วคำนวณหาค่าความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ เป็นร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% Coefficiency of Variation) ดังนี้

$$\text{สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน} = \frac{\text{ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ค่ามัชฌิมเลขคณิต}} \times 100$$

3.5.10.3 การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy)

นำซีรัม 1 มิลลิลิตร ที่มีแอมเฟตามีนมาตรฐาน 2 ไมโครกรัม มาวิเคราะห์หาปริมาณแอมเฟตามีน ตามวิธีในข้อ 3.5.4 และ 3.5.5 โดยอ่านค่าปริมาณแอมเฟตามีนจากกราฟมาตรฐานในข้อ 3.5.8 แล้วเติมสารละลายแอมเฟตามีนมาตรฐาน (จากข้อ 3.1.3) ลงไป 2 และ 6 ไมโครกรัม นำไปวิเคราะห์หาปริมาณแอมเฟตามีนอีกครั้งหนึ่ง โดยทำการทดลองซ้ำกัน 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาคำนวณความถูกต้องของวิธีทดลอง (percentage recovery) ดังนี้

$$\% \text{ รีคอบเวอรี} = \frac{\text{ปริมาณสารที่วัดได้}}{\text{ปริมาณสารที่มีอยู่จริง}} \times 100$$

3.5.11 การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะ

3.5.11.1 การศึกษาความไว

เตรียมปัสสาวะที่มีแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนมาตรฐาน 0-4 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์หาปริมาณแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน ตามวิธีในข้อ 3.5.3 และ 3.5.5 โดยทำการทดลองซ้ำกัน 4 ครั้ง อ่านค่าปริมาณสารจากกราฟมาตรฐาน ในข้อ 3.5.9 ในการศึกษาครั้งนี้กำหนดให้ความเข้มข้นของแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน ที่ให้ความสูงของพีค 1 เซนติเมตร เป็นความไวของการวัดปริมาณโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

3.5.11.2 การศึกษาความแม่นยำ

เตรียมปัสสาวะที่มีแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนมาตรฐานอย่างละ 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์หาปริมาณสารทั้งสอง ตามวิธีในข้อ 3.5.3 และ 3.5.5 โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ครั้งในการทดลองเดียวกัน และทำการทดลองความเข้มข้นละ 1 ครั้ง ทั้งหมด 10 การทดลอง อ่านค่าปริมาณของสารทั้งสอง จากกราฟมาตรฐานในข้อ 3.5.9 แล้วคำนวณหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ เป็นร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

3.5.11.3 การศึกษาความถูกต้อง

นำปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร ที่มีแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนมาตรฐาน อย่างละ 5 ไมโครกรัม มาวิเคราะห์หาปริมาณสารทั้งสองตามวิธีในข้อ 3.5.3 และ 3.5.5 โดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐานในข้อ 3.5.9 แล้วเติมสารละลายมาตรฐานของสารทั้งสองในน้ำกลั่น (จากข้อ 3.1.2) ลงไป 5 และ 15 ไมโครกรัม นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารดังกล่าว อีกครั้งหนึ่ง โดยทำการทดลองซ้ำกัน 3 ครั้ง และนำค่าที่ได้มาคำนวณความถูกต้องของวิธีทดลอง (percentage recovery)

3.5.12 การวิเคราะห์หาปริมาณแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะ และซีรัม

3.5.12.1 การเก็บตัวอย่างซีรัม

เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่ข้อพับ ประมาณ 10 มิลลิลิตร ทิ้งให้เลือดแข็งตัว แล้วนำมาปั่นแยกซีรัมด้วยความเร็ว 1500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

3.5.12.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะ และซีรัม

สกัดแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน จากปัสสาวะและซีรัม ตามวิธีในข้อ 3.5.3 และ 3.5.4 ตามลำดับ แล้วเตรียมอนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามีด ตามวิธีในข้อ 3.5.5 หาปริมาณแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน โดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน ในข้อ 3.5.8 และ 3.5.9 ในกรณีที่จำเป็นต้องเจือจางปัสสาวะก่อนวิเคราะห์ ก็เจือจางด้วยปัสสาวะสุนัขปกติ

3.5.13 การตรวจเพื่อยืนยันการวิเคราะห์ แอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน ในรูปอนุพันธ์เฮปตาฟลูโอโรบิวไทรามีด

สกัดแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน จากปัสสาวะด้วยเอทิลอะซีเตท ตามวิธีในข้อ 3.5.3 แล้วระเหยเอทิลอะซีเตทโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนจนเหลือปริมาตรประมาณ 0.2 มิลลิลิตร เตรียมอนุพันธ์เฮปตาฟลูโอโรบิวไทรามีด ตามวิธีของ Terada และคณะ (1982) โดยเติมเฮปตาฟลูโอโรบิวไทริคแอนไฮไดรด์ 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ระเหยให้แห้งโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนละลายอนุพันธ์ที่เตรียมได้ในเอทิลอะซีเตท 100 ไมโครลิตร ฉีดสารละลายนี้ 1 ไมโครลิตรเข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟโดยใช้คอลัมน์ และสภาวะเดียวกันกับการวิเคราะห์อนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามีด เปรียบเทียบ retention time ของพีคที่ได้กับ อนุพันธ์ของแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนมาตรฐาน

3.5.14 การตรวจเพื่อยืนยันการวิเคราะห์ แอมเฟตามีน โดยไม่เตรียมอนุพันธ์

สกัดแอมเฟตามีนจากปัสสาวะ ด้วยเอทิลอะซีเตท ตามวิธีในข้อ 3.5.3 แต่ใช้เบนซิลอามีน 0.98 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร (จากข้อ 3.1.7) 50 ไมโครลิตร เป็น internal

standard แทนไทรามีน ฉีดเอทิลอะซีเตท 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ โดยใช้คอลัมน์แก้วขนาด 1500 x 4 มิลลิเมตร บรรจุด้วย 10 % Apiezon L + 10 % KOH บน 80 - 100 mesh Chromosorb W-HP ใช้ดีเทคเตอร์ แบบ FID อุณหภูมิคอลัมน์ 175 องศาเซลเซียส และใช้แก๊สไนโตรเจน เป็นตัวพาด้วยอัตราเร็ว 40 มิลลิลิตรต่อนาที เปรียบเทียบ retention time ของพีคที่ได้กับผลการสกัดแอมเฟตามีนมาตรฐาน

3.6 การวิเคราะห์ปริมาณกรดฮิพพิวริคในปัสสาวะโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี

3.6.1 การศึกษาความสามารถในการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของกรดฮิพพิวริค

นำกรดฮิพพิวริคมาทำปฏิกิริยาการเกิดสี ตามวิธีของ Ohmori และคณะ (1977) โดยนำสารละลายกรดฮิพพิวริคมาตรฐาน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทิลอะซีเตท (จากข้อ 3.2.1) มา 50 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้งโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน เติมอะซีติคแอนไฮไดรด์ 1 มิลลิลิตร และ พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ 0.5 % ในไพริดีน (จากข้อ 3.2.2) 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อ่านค่า Absorbance ของสารละลายที่ความยาวคลื่นแสง ตั้งแต่ 380 - 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectronic 20 ใช้สารละลายอะซีติคแอนไฮไดรด์ และพาราไดเมทิลอะมิโน-เบนซาลดีไฮด์ 0.5 % ในไพริดีน เป็น blank

3.6.2 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ และเวลาต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของกรดฮิพพิวริค

นำสารละลายกรดฮิพพิวริคมาตรฐาน 0.1 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ในเอทิลอะซีเตท (จากข้อ 3.2.1) มา 50 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้งโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน เติมอะซีติค-แอนไฮไดรด์ 1 มิลลิลิตร และ พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ 0.5 % ใน ไพริดีน 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) อ่านค่า Absorbance ของสารละลายที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร หลังจากทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 105 และ 120 นาที ใช้น้ำกลั่นเป็น blank และเปรียบเทียบกับสารละลายอะซีติคแอนไฮไดรด์ และพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ 0.5 % ในไพริดีน ซึ่งทำการทดลองในสภาวะเดียวกัน

3.6.3 การสกัดกรดฮิพพิวริคจากปัสสาวะ

นำปัสสาวะ 0.1 มิลลิลิตร มาเติมกรดเกลือเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร 60 ไมโครลิตร โซเดียมคลอไรด์ 0.02 กรัม และเอทิลอะซีเตท 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าตามแนวตั้ง เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้สารละลายแยกชั้น นำชั้นเอทิลอะซีเตทมา 0.2 มิลลิลิตร ระเหยให้แห้งโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน

3.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดฮิพพิวริค

นำกรดฮิพพิวริคที่สกัดและระเหยแห้งแล้วมาเติม อะซีติคแอนไฮไดรด์ 1 มิลลิลิตร และ พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ 0.5 % ในไพริดีน 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อ่านค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

3.6.5 การสร้างกราฟมาตรฐานของกรดฮิพพิวริค

นำสารละลายกรดฮิพพิวริคมาตรฐาน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทิลอะซีเตท (จากข้อ 3.2.1) มา 10, 50, 100, 150, และ 200 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้งโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้ววิเคราะห์ปริมาณตามวิธีในข้อ 3.6.4 อ่านค่า Absorbance ของสารละลายที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร แล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Absorbance กับปริมาณกรดฮิพพิวริค

3.6.6 การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดฮิพพิวริค

3.6.6.1 การศึกษาความไว

นำสารละลายกรดฮิพพิวริคมาตรฐานในเอทิลอะซีเตท (จากข้อ 3.2.1) มา 0-50 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้งโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนแล้ววิเคราะห์หาปริมาณตามวิธีในข้อ 3.6.4 ทำการทดลองซ้ำกัน 5 ครั้ง อ่านค่าปริมาณกรดฮิพพิวริคจากกราฟมาตรฐานในข้อ 3.6.5 โดยกำหนดให้ปริมาณสารที่ให้ค่า Absorbance เท่ากับ 0.05 เป็นความไวของการวัดปริมาณกรดฮิพพิวริค

3.6.6.2 การศึกษาความแม่นยำ

วิเคราะห์ปริมาณกรดฮิพพิวริค 5 , 10 และ 20 ไมโครกรัม ตามวิธีในข้อ 3.6.4 โดยทำการทดลองปริมาณละ 10 ครั้ง ในการทดลอง-

เดียวกัน และทำการทดลองปริมาณ 1 ครั้ง ทั้งหมด 10 การทดลอง อ่านค่าปริมาณกรดฮิพพิวริคจากกราฟมาตรฐาน ในข้อ 3.6.5 แล้วคำนวณหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์เป็นร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

3.6.6.3 การศึกษาความถูกต้อง

วิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิพพิวริคในปัสสาวะ 0.1 มิลลิลิตร และปัสสาวะที่เติมกรดฮิพพิวริคมาตรฐาน (จากข้อ 3.2.1) 10, 50 และ 100 ไมโครกรัม ตามวิธีในข้อ 3.6.3 และ 3.6.4 โดยทำการทดลองซ้ำกัน 2 ครั้ง อ่านค่าปริมาณกรดฮิพพิวริคจากกราฟมาตรฐานในข้อ 3.6.5 แล้วคำนวณความถูกต้องของวิธีทดลอง (percentage recovery) ซึ่งแสดงถึงเปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรีของการสกัดด้วย

3.6.6.4 การศึกษาความจำเพาะ (Specificity)

นำสารละลายกรดเบนโซอิค และยูเรียมาตรฐาน 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเมทานอล (จากข้อ 3.2.3 และ 3.2.4) มาอย่างละ 100 และ 200 ไมโครลิตร ระเหยให้แห้งโดยเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วทำปฏิกิริยาตามวิธีในข้อ 3.6.4

3.6.7 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิพพิวริคในตัวอย่างปัสสาวะ

สกัดกรดฮิพพิวริคจากปัสสาวะตามวิธีในข้อ 3.6.3 แล้ววิเคราะห์หาปริมาณตามวิธีในข้อ 3.6.4 หาปริมาณโดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน ข้อ 3.6.5

3.7 การวิเคราะห์ปริมาณครีเอตินีนในปัสสาวะโดยวิธีอัลคาไลน์พิเครท

หาปริมาณครีเอตินีนตามวิธีของ Jaffé โดยให้ครีเอตินีนทำปฏิกิริยากับกรดพิคริกในสภาวะที่เป็นด่าง จะได้สารละลายสีเหลืองอำพัน (Toro และ Ackerman, 1975)

3.7.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของครีเอตินีน

นำสารละลายครีเอตินีนมาตรฐาน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (จากข้อ 3.3.1) มา 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดพิคริกอิ่มตัว 0.6 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 15 % (น้ำหนักต่อปริมาตร) 0.4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 4 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ 20 นาที แล้วอ่านค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectronic 20 ใช้สารละลายกรดพิคริกและโซเดียม

ไฮดรอกไซด์เป็น blank เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างค่า Absorbance กับปริมาณครีเอตินีน

3.7.2 การวิเคราะห์หาปริมาณครีเอตินีนในปัสสาวะ

นำปัสสาวะมา 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาตามวิธีในข้อ 3.7.1 หาปริมาณโดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน ข้อ 3.7.1

3.8 การศึกษาเมตาบอลิสมของแอมเฟตามีนในสุนัข

3.8.1 ฉีดเพนโทบาร์บิทาลโซเดียม (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 30 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าทางกระแสเลือด เพื่อให้สุนัขหลับ เจาะเลือดและส่วนปัสสาวะ แล้วฉีดแอมเฟตามีนซัลเฟต เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน 0.9 % นอร์มอลซาไลน์ (จากข้อ 3.4.1) 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าทางช่องท้อง (Intraperitoneal injection) และให้น้ำเกลือที่มีเดคโตรส 5 เปอร์เซ็นต์ ในอัตรา 10 หยดต่อนาที เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

3.8.2 เจาะเลือดหลังจากได้รับแอมเฟตามีน $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4 และ 6 ชั่วโมง และส่วนปัสสาวะหลังจากได้รับแอมเฟตามีน 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง ภายหลัง 8 ชั่วโมง นำสุนัขใส่ในกรงสำหรับเก็บปัสสาวะ และเก็บปัสสาวะเป็นเวลา 3 วัน

3.8.3 วิเคราะห์หาปริมาณแอมเฟตามีนในซีรัมตามวิธีในข้อ 3.5.12 แล้วคำนวณค่าครึ่งชีวิตของแอมเฟตามีนในซีรัม (half-life, $t_{\frac{1}{2}}$) ดังนี้

$$t_{\frac{1}{2}} = - 0.693 / 2.303 \frac{(\log x_1 - \log x_2)}{t_2 - t_1}$$

เมื่อ x_1, x_2 คือ ความเข้มข้นของแอมเฟตามีนในซีรัมเมื่อเวลา t_1 และ t_2 ตามลำดับ (Goldstein et al, 1969)

3.8.4 วิเคราะห์หาปริมาณแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน ในปัสสาวะตามวิธีในข้อ 3.5.12 และยืนยันผลการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ตามวิธีในข้อ 3.5.13 และ 3.5.14

3.8.5 วิเคราะห์หาปริมาณกรดฮิพพิวริคในปัสสาวะ ตามวิธีในข้อ 3.6.7

3.8.6 วิเคราะห์หาปริมาณครีเอตินีนในปัสสาวะ ตามวิธีในข้อ 3.7.2

3.9 <u>การศึกษาอิทธิพลของเอทานอลต่อเมตาบอลิสมของแอมเฟตามีนในสุนัข</u>

หลังจากศึกษาเมตาบอลิสมของแอมเฟตามีนในข้อ 3.8 แล้ว เป็นเวลา 1 เดือน นำสุนัขตัวเดิม มาทำการทดลองดังกล่าวซ้ำอีกครั้ง แต่ฉีดเอทานอล 50% โดยปริมาตรใน 0.9% นอร์มอลซาไลน์ (จากข้อ 3.4.2) 1 กรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าทางช่องท้อง 15 นาที ก่อนฉีดแอมเฟตามีนซัลเฟต