# บทที่ 4

# ผลการทดลอง

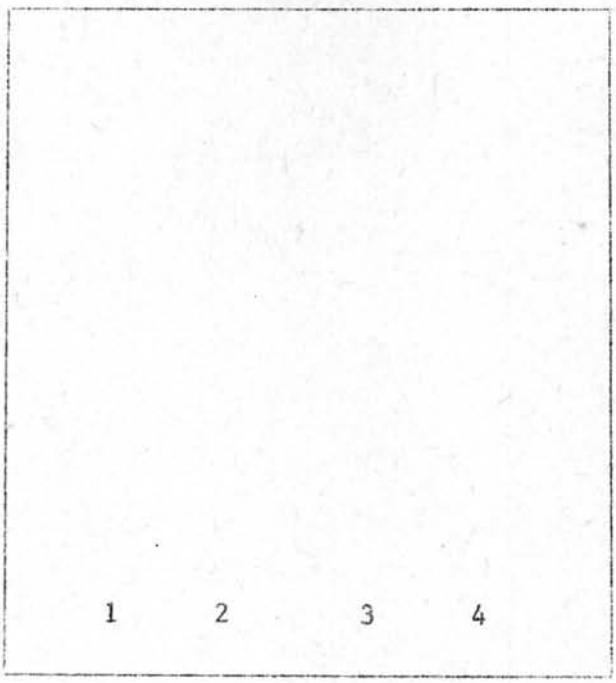
## 4.1 วิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี

### 4.1.1 ผลการศึกษาความจำเพาะของอนุพันธ์ NBD-Cl กับอะมินชนิดต่าง ๆ

ผลการทดสอบความจำเพาะของอนุพันธ์ NBD-Cl ของอะมินชนิดต่าง ๆ ทั้งสารที่มีกลุ่มอะมิโนชนิดปฐมภูมิ และทุติยภูมิ และสารที่มีกลุ่มอะไมด์ ปริมาณ 50 ไมโครกรัมในปัสสาวะคนปกติ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปรากฏว่าวิธีวิเคราะห์นี้สามารถแยกอนุพันธ์ของ phenylalanine HCl ออกจากอนุพันธ์แอมเฟตามินซัลเฟตได้ และอนุพันธ์ของ phenylpropanolamine HCl มีค่า $R_f$ ใกล้เคียงกับอนุพันธ์แอมเฟตามินมาก (รูปที่ 7) ตัวยาอื่น ๆ ในปริมาณที่ใช้ไม่ให้สารเรืองแสงกับ NBD-Cl (ตารางที่ 7)

### 4.1.2 ผลการศึกษาความไวของวิธีวิเคราะห์

ผลจากการวิเคราะห์แอมเฟตามินซัลเฟตปริมาณตั้งแต่ 0.25 0.5 1 2 และ 50 ไมโครกรัม ในปัสสาวะคนปกติ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร พบว่าปริมาณแอมเฟตามินน้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ คือ 1 ไมโครกรัม หรือเท่ากับความเข้มข้น 0.0002 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร




รูปที่ 7 โครมาโตแกรมแสดงตำแหน่งของอนุพันธ์ NBD-Cl*

1. ปัสสาวะคนปกติที่เติม phenylpropanolamine HCl 100 ไมโครกรัม
2. ปัสสาวะคนปกติที่เติม phenylpropanolamine HCl 50 ไมโครกรัม
3. ปัสสาวะคนปกติที่เติม แอมเฟตามีน 50 ไมโครกรัม
4. ปัสสาวะคนปกติ

*สารละลายที่ใช้แยกคือ ethylacetate : cyclohexane 2:3 โดยปริมาตร แล้วตรวจตำแหน่งภายใต้รังสีเหนือม่วงที่ 365 นาโนเมตร

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์อนุพันธ์ NBD-Cl ของอะมินต่าง ๆ ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี

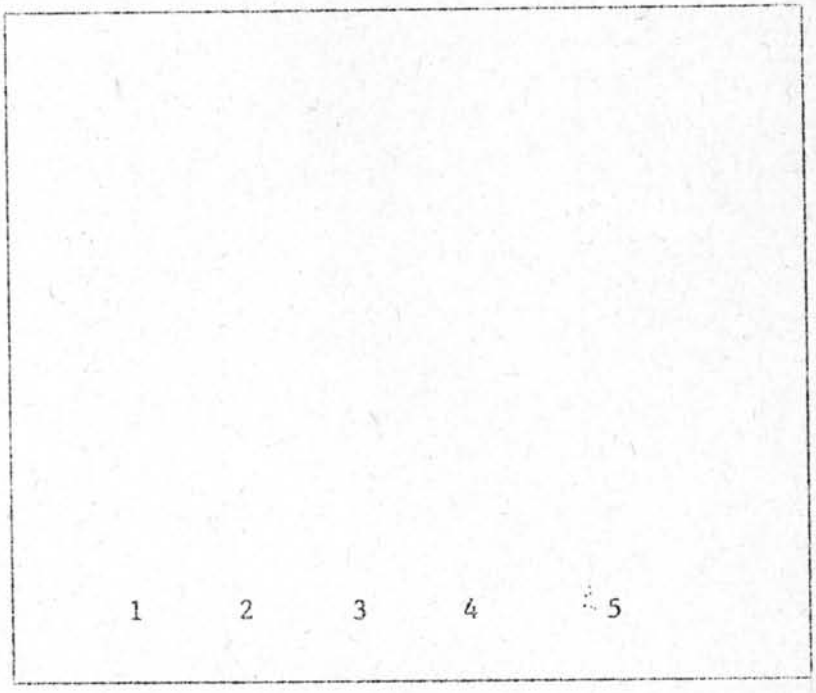
| ชนิดอะมิน* | $R_f$ |
|---|---|
| amphetamine | 0.46 |
| phenylpropanolamine HCl | 0.53, 0.46 |
| phenylalanine HCl | 0.61 |
| ephedrine HCl | - |
| meprobamate | - |
| procaine HCl | - |
| pyrazolone derivative | - |
| phenmetrazine HCl | - |

* ปริมาณอะมินที่ใช้วิเคราะห์เท่ากับ 50 ไมโครกรัมในปัสสาวะ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร สารละลายที่ใช้แยกคือ ethylacetate : cyclohexane = 2:3 โดยปริมาตร

I16718828

4.1.3 ผลการวิเคราะห์แอมเฟตามีนในปัสสาวะของอาสาสมัคร

ผลของการวิเคราะห์แอมเฟตามีนในปัสสาวะของอาสาสมัคร ก่อนรับประทานแอมเฟตามีนซัลเฟต 5 มิลลิกรัม ปรากฏดังรูปที่ 8 และหลังจากรับประทานยาแล้วปรากฏดังรูปที่ 9



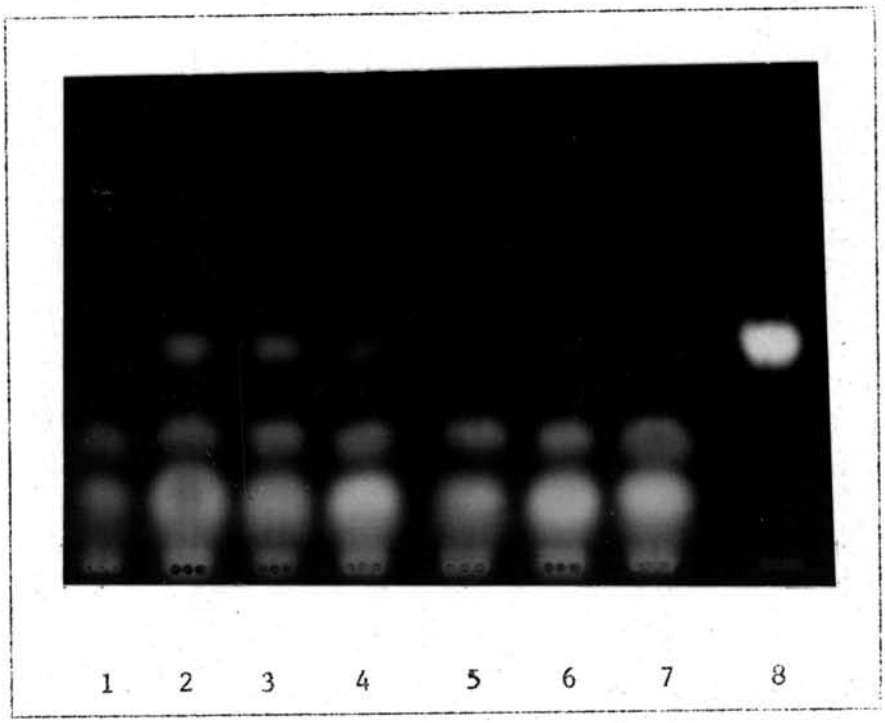

รูปที่ 8 โครมาโตแกรมของปัสสาวะตัวอย่างจากอาสาสมัครรายที่ 1 ก่อนรับประทานแอมเฟตามีนซัลเฟต *

1, 3, และ 4. ปัสสาวะก่อนรับประทานยา

2. ปัสสาวะก่อนรับประทานยาที่เติมแอมเฟตามีน 50 ไมโครกรัม

5. อนุพันธ์แอมเฟตามีนมาตราฐาน

*รายละเอียดแสดงไว้ในรูปที่ 7




รูปที่ 9 โครมาโตแกรมของอนุพันธ์แอมเฟตามีน จากปัสสาวะตัวอย่างของอาสาสมัครรายที่ 5 ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน *

1. ปัสสาวะก่อนรับประทานยา

2,3,4,5,6 และ 7 ปัสสาวะหลังรับประทานยา 10 20 30 40 50 และ 60ชั่วโมง ตามลำดับ

8. อนุพันธ์แอมเฟตามีนมาตราฐาน

*รายละเอียดแสดงไว้ในรูปที่ 7

## 4.2 วิธีสเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรี

### 4.2.1 ผลการศึกษา excitation และ emission spectrum

ผลการศึกษา excitation spectrum พบว่าเมื่อใช้ค่า emission wavelength เท่ากับ 520 นาโนเมตร ค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์จะสูงสุด ที่ excitation wavelength เท่ากับ 468 นาโนเมตร

และจากการศึกษา emission spectrum พบว่าเมื่อใช้ค่า excitation wavelength เท่ากับ 468 นาโนเมตร ค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์จะสูงสุดที่ emission wavelength เท่ากับ 520 นาโนเมตร และความเรืองแสงสัมพัทธ์ที่ emission wavelength 480 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 38% ของความเรืองแสงสัมพัทธ์ที่ emission wavelength 520 นาโนเมตร (รูปที่ 10)

### 4.2.2 ผลการศึกษาความแม่นยำของการอ่านค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์

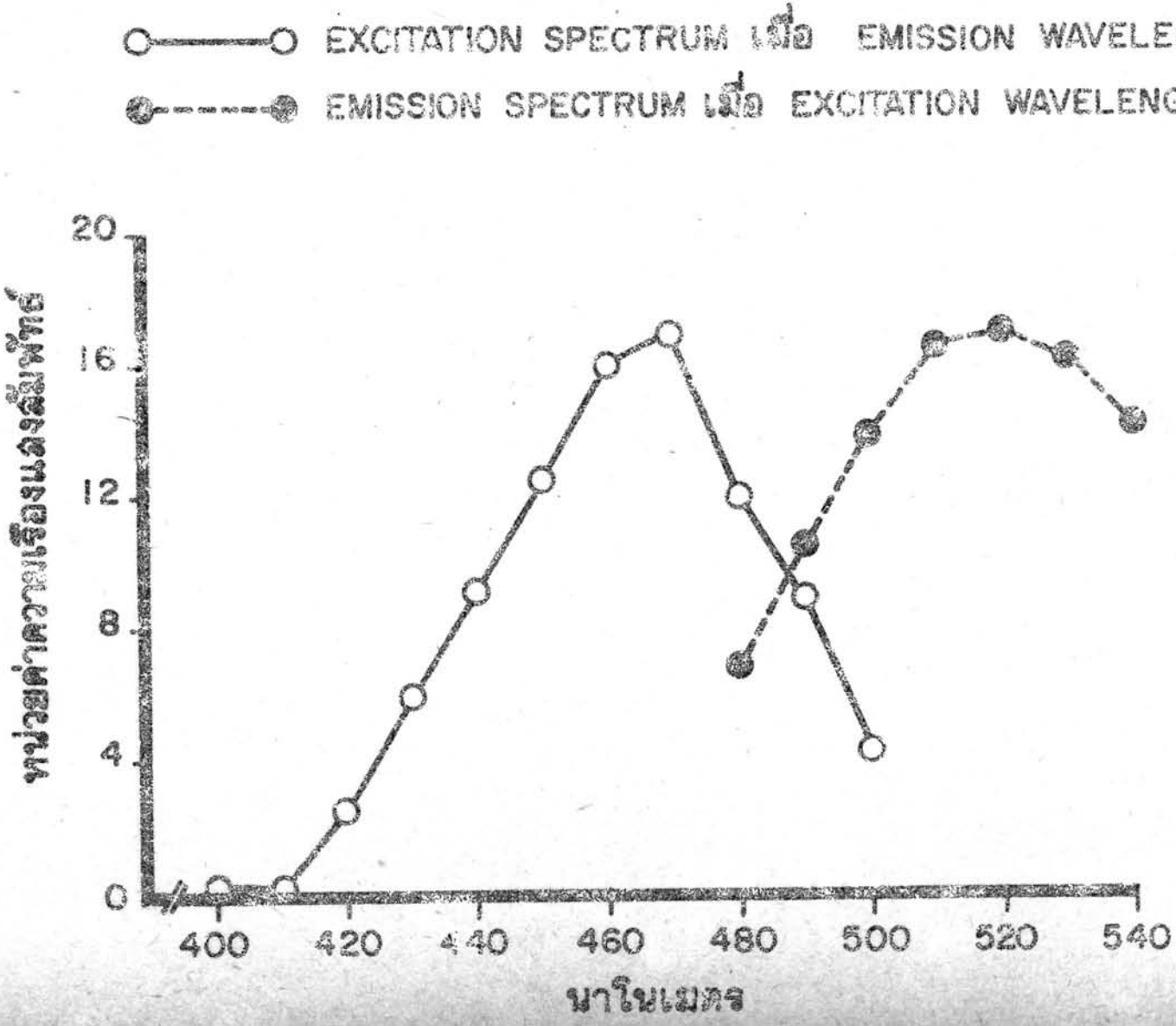
ผลการศึกษาอ่านค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์ของสารละลายแอมเฟตามินมาตราฐาน ปัสสาวะคนปกติ และปัสสาวะที่มีแอมเฟตามิน พบว่าค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของการอ่านค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์ เมื่อวิเคราะห์แอมเฟตามินเข้มข้น 0.01 ถึง 0.001 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร อยู่ระหว่าง 3.0 ถึง 22.4 (ตารางที่ 8) ค่าความแม่นยำจะน้อยเมื่อความเข้มข้นของแอมเฟตามินอยู่ในระดับต่ำ และความแม่นยำจะเพิ่มขึ้นตามหน่วยค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์ที่เพิ่มขึ้น และค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับความเข้มข้นของแอมเฟตามินในช่วงที่ศึกษา (รูปที่ 11)

### 4.2.3 ผลการศึกษาความแม่นยำและความถูกต้องของการวิเคราะห์

พบค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนในการทดลองเดียวกัน ระหว่างการทดลองเป็น 7.1 ถึง 17.8 และ 5.6 ตามลำดับ ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เมื่อคิดเทียบสารที่วัดได้เป็นร้อยละของสารที่เติมลงไปในปัสสาวะมีค่าระหว่าง 91 ถึง 122 (ตารางที่ 9)

รูปที่ 10

รูปแบบของการกระตุ้นและการคายแสงของ AMPHETAMINE – NBD



ตารางที่ 8 ความแม่นยำของการอ่านค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์

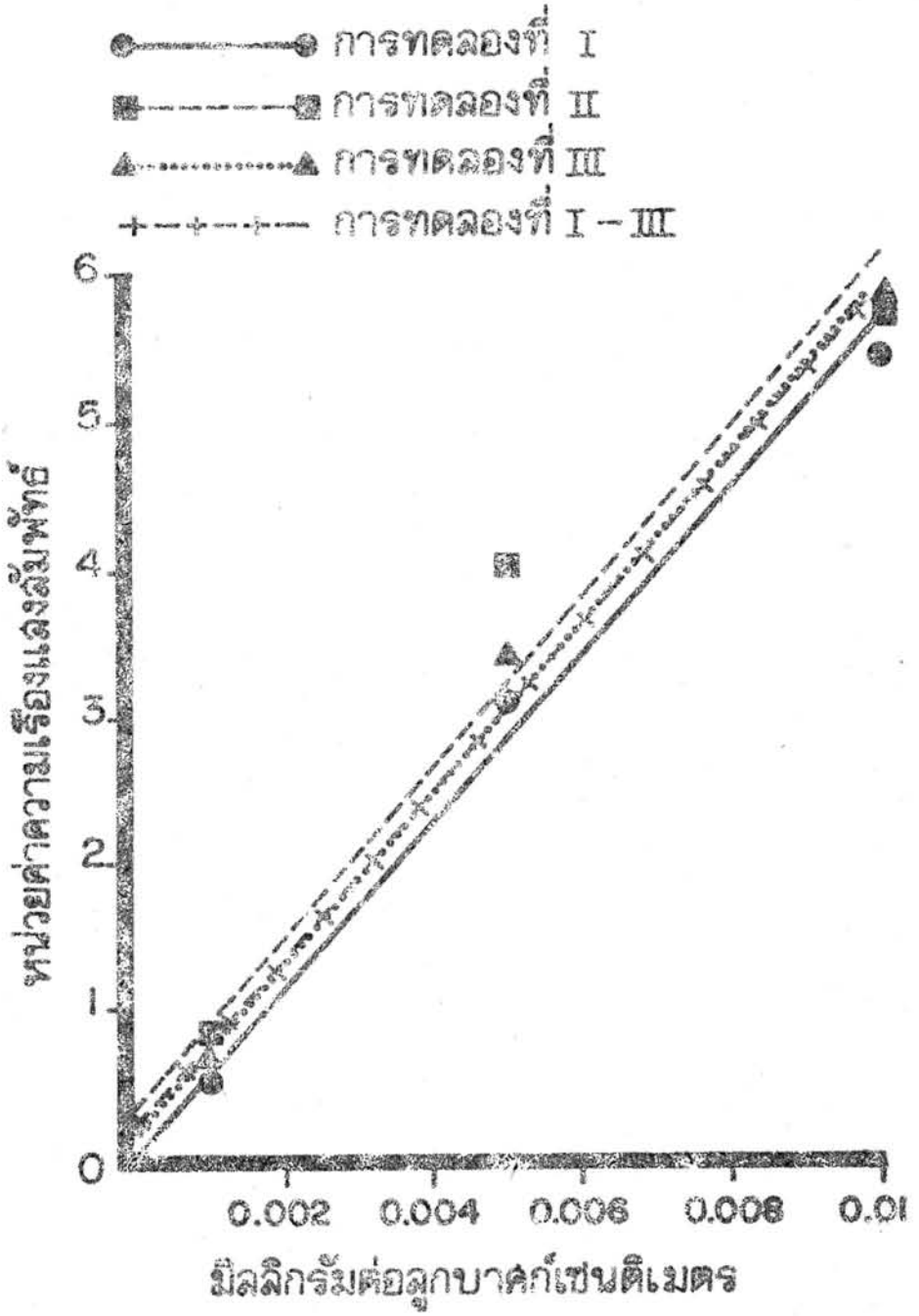
| สารละลาย | หน่วยค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์ | | |
|---|---|---|---|
| | $\bar{X}$ | S.D. | % C.V. |
| สารละลายแอมเฟตามีน * (มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) | | | |
| 0.01 | 5.60 | 0.17 | 3.0 |
| 0.005 | 3.50 | 0.46 | 13.1 |
| 0.001 | 0.67 | 0.15 | 22.4 |
| ปัสสาวะคนปกติ ** | 3.90 | 0.46 | 11.8 |
| ปัสสาวะที่มีแอมเฟตามีน ** (0.002 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) | 5.24 | 0.41 | 7.8 |

* n = 3

** n = 9

รูปที่ 11

# กราฟมาตราฐานของ AMPHETAMINE – NBD



ตารางที่ 9 ความแม่นยำและความถูกต้องของการวิเคราะห์แอมเฟตามินด้วยวิธีสเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรี

| การทดลองที่ | ความเข้มข้นของแอมเฟตามิน (มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) | | | ความถูกต้อง (Percentage recovery)** | |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\bar{X}$ * | S.D. | %CV | $\bar{X}$ | S.D. |
| I | 0.0084 | 0.0006 | 7.1 | 90.9 | 6.2 |
| II | 0.0090 | 0.0016 | 17.8 | 121.6 | 21.1 |
| III | 0.0094 | 0.0015 | 16.0 | 104.5 | 16.8 |
| I-III | 0.0089 | 0.0005 | 5.6 | - | - |

* n = 3

** การคำนวณค่าความถูกต้องของวิธีทดลอง

สมมุติความเข้มข้นของแอมเฟตามินในปัสสาวะคนปกติที่อ่านได้จากกราฟมาตราฐาน เท่ากับ x มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ความเข้มข้นของแอมเฟตามินในปัสสาวะที่เติมแอมเฟตามิน 0.002มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อ่านได้จากกราฟมาตราฐาน เท่ากับ y มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ความเข้มข้นที่คาดไว้เป็น $x + 0.002$ $mg/cm^3$ แต่วัดได้เป็น $y$ $mg/cm^3$

" " $100$ $mg/cm^3$ $\frac{100y}{x+0.002}$ $mg/cm^3$

ความถูกต้องของวิธีทดลอง เท่ากับ $\frac{100y}{x+0.002}$ %

4.2.4 ผลการศึกษาอิทธิพลของการตกตะกอนโปรตีน

ผลการใช้คอปเปอร์ซัลเฟตตกตะกอนโปรตีนก่อนการสกัด และเตรียมอนุพันธ์ แล้วจึงวิเคราะห์แอมเฟตามินโดยวิธีสเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรี พบว่าค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ของการอ่านค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์เมื่อวิเคราะห์แอมเฟตามินเข้มข้น 0.001 ถึง 0.01 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร มีค่าอยู่ระหว่าง 2.1 ถึง 45.1 (ตารางที่ 10) ความแม่นยำของการอ่าน และความสัมพันธ์ของค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์กับความเข้มข้นของแอมเฟตามินเป็นไปในทำนองเดียวกับการวิเคราะห์โดยไม่ผ่านการตกตะกอนโปรตีน (รูปที่ 12)

ผลจากการศึกษาความแม่นยำและความถูกต้องของการวิเคราะห์ ปรากฏว่า ค่าความถูกต้องภายในการทดลองแต่ละครั้ง เมื่อทำซ้ำ 3 ครั้ง และระหว่างการทดลองแต่ละครั้ง 3 ครั้ง มีค่าเท่ากับ 113.8 ถึง 157.3 และ 130.0 ตามลำดับ และมีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เป็น 7.6 ถึง 15.2 และ 9.9 ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 ความแม่นยำของการอ่านค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์

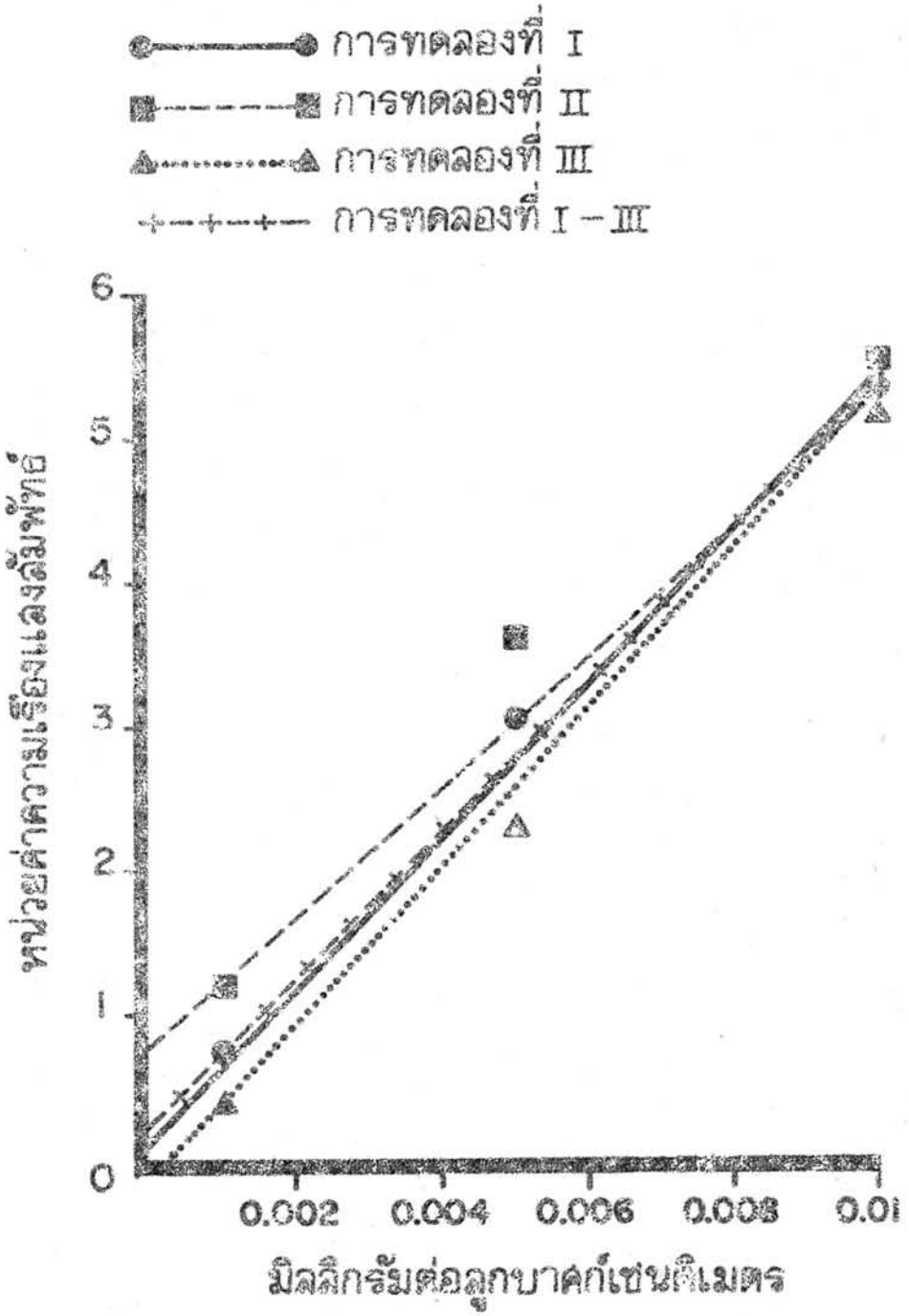
| สารละลาย | หน่วยค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์ | | |
|---|---|---|---|
| | $\bar{X}$ | S.D. | %C.V. |
| สารละลายแอมเฟตามีน * (มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) | | | |
| 0.01 | 5.43 | 0.12 | 2.1 |
| 0.005 | 2.97 | 0.65 | 21.9 |
| 0.001 | 0.80 | 0.36 | 45.1 |
| ปัสสาวะคนปกติ ** | 2.02 | 0.69 | 34.2 |
| ปัสสาวะที่มีแอมเฟตามีน ** (0.002 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) | 3.90 | 0.44 | 11.3 |

* n = 3

** n = 9

รูปที่ 12

# กราฟมาตราฐานของ AMPHETAMINE – NBD



ตารางที่ 11 ความแม่นยำและความถูกต้องของการวิเคราะห์แอมเฟตามินด้วยวิธีสเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรี

| การทดลองที่ | ความเข้มข้นของแอมเฟตามิน (มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) | | | ความถูกต้อง (Percentage recovery)** | |
|---|---|---|---|---|---|
| | $\bar{X}$ * | S.D. | %CV | $\bar{X}$ | S.D. |
| I | 0.0066 | 0.0010 | 15.2 | 113.8 | 17.9 |
| II | 0.0067 | 0.0007 | 10.5 | 119.1 | 12.5 |
| III | 0.0079 | 0.0006 | 7.6 | 157.3 | 11.6 |
| I-III | 0.0071 | 0.0007 | 9.9 | - | - |

* n = 3

** การคำนวณค่าความถูกต้องของวิธีทดลอง

สมมุติความเข้มข้นของแอมเฟตามินในปัสสาวะคนปกติที่อ่านได้จากกราฟมาตราฐาน เท่ากับ x มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ความเข้มข้นของแอมเฟตามินในปัสสาวะที่เติมแอมเฟตามิน 0.002 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อ่านได้จากกราฟมาตราฐาน เท่ากับ y มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ความเข้มข้นที่คาดไว้เป็น $x + 0.002$ mg/cm$^3$ แต่วัดได้เป็น $y$ mg/cm$^3$

$100$ mg/cm$^3$ $\quad \frac{100y}{x+0.002}$ mg/cm$^3$

ความถูกต้องของวิธีทดลอง เท่ากับ $\frac{100\ y}{x+0.002}$ %

## 4.3 วิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

### 4.3.1 ผลการศึกษาตามวิธีที่บริษัทแนะนำ

เมื่อศึกษาโดยใช้ปริมาณสารต่าง ๆ ตามที่บริษัทแนะนำไว้ ปรากฏว่าได้กราฟมาตราฐานของแอมเฟตามีน ดังรูปที่ 13 ซึ่งให้ความแตกต่างของการรวมตัวที่ความเข้มข้นของแอมเฟตามีนระหว่าง 15.6 และ 1000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ประมาณ 16% และให้ความไวของวิธีทดลองเป็น 38 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร หรือ 2 นาโนกรัมต่อหลอดทดลอง

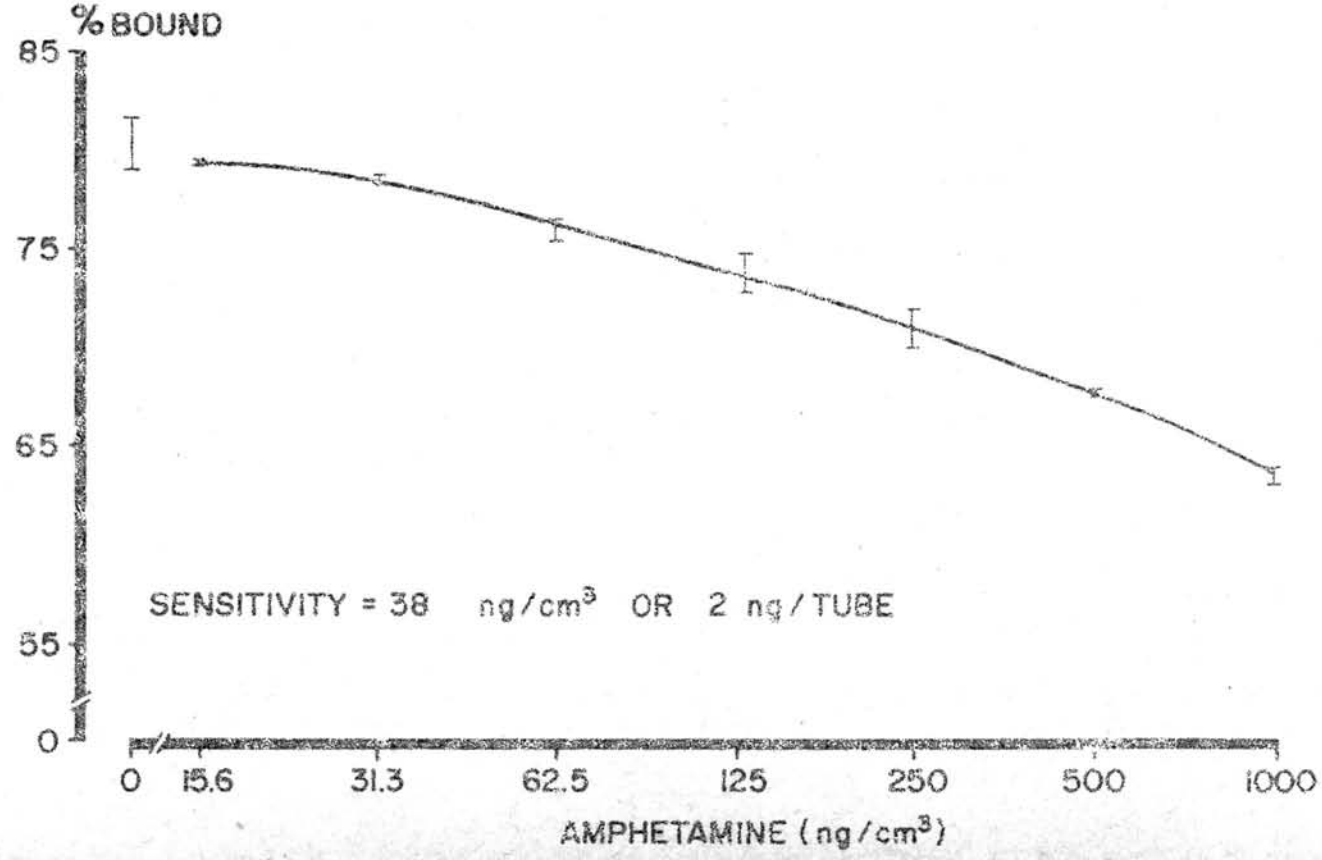
รูปที่ 13 กราฟมาตราฐานของการวิเคราะห์แอมเฟตามีนด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

ASSAY PROTOCOL

| | |
|---|---|
| STANDARD AMPHETAMINE | 100 µl |
| $^{125}I$ – AMPHETAMINE | 200 µl |
| ANTIBODY | 200 µl |

INCUBATE AT 10°C FOR 18 – 24 HOURS

SEPARATION OF BOUND AND FREE FORMS BY SATURATED $(NH_4)_2 SO_4$



4.3.2 ผลการศึกษาหารายละเอียดที่เหมาะสมในการทำราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อจะหาสภาวะที่สามารถวิเคราะห์แอ็มเฟตามินโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ โดยดัดทอนปริมาณของสารต่าง ๆ ลงไปจากที่บริษัทแนะนำ ได้ทดลองเปลี่ยนปริมาณของแอนติบอดี สารรังสี ตลอดจนอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการรวมตัว

4.3.2.1 ผลการศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของแอนติบอดี

เมื่อศึกษาโดยใช้สารติดฉลากปริมาณเศษหนึ่งส่วนสี่ (50 ไมโครลิตร) ของปริมาณที่บริษัทแนะนำทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีปริมาตรเดิมแต่เจือจางเป็น 1/2 ถึง 1/612 ปรากฏว่าแอนติบอดีที่เจือจางเป็น 1/8 ถึง 1/32 ให้การรวมตัวประมาณร้อยละ 75 ถึง 45 (รูปที่ 14) และเมื่อเติมแอมเฟตามินมาตราฐาน 250 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรไปในปฏิกิริยา การรวมตัวจะลดลงไปอยู่ระหว่างร้อยละ 55 ถึง 25 และปริมาณแอนติบอดีช่วงนี้จะให้ความแตกต่างของการรวมตัวเมื่อมีและไม่มีแอมเฟตามินมาตราฐาน มากกว่าเมื่อใช้แอนติบอดีปริมาณอื่น ๆ

ในการศึกษาต่อไปได้ทดลองลดปริมาณ ของสารละลายที่ใช้ลงจาก 200 ไมโครลิตร เป็น 50 ไมโครลิตร โดยใช้แอนติบอดีที่เจือจาง 1/2 ถึง 1/8 ดังนั้นแอนติบอดีที่ใช้จึงเป็น 1/8 ถึง 1/32 ของปริมาณที่บริษัทแนะนำ

รูปที่ 15 แสดงผลเปรียบเทียบกราฟมาตราฐานของแอมเฟตามิน เมื่อใช้แอนติบอดีปริมาณ 1/8 ถึง 1/32 ของที่บริษัทแนะนำ จะให้ความแตกต่างของการรวมตัวของแอมเฟตามินมาตราฐานเข้มข้น 156.3 ถึง 10,000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร มากกว่าเมื่อใช้แอนติบอดีที่ความเข้มข้นอื่น ๆ

ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกใช้ปริมาณแอนติบอดีที่เจือจางเป็น 1/2 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร หรือเท่ากับปริมาณ 1/8 ของปริมาณที่บริษัทแนะนำ

4.3.2.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของปริมาณแอมเฟตามินติดฉลากต่อกราฟมาตราฐาน

จากรูปที่ 16 แสดงว่าเมื่อใช้ แอมเฟตามินติดฉลากจากบริษัทโดยไม่เจือจาง และที่เจือจางเป็น 1/2 ปริมาณร้อยละของการรวมตัวของสารติดฉลากกับแอนติบอดีพิสูจน์ไม่ได้ว่าแตกต่างกัน

ในการศึกษาต่อไปจึงเลือกใช้ แอมเฟตามินติดฉลากโดยไม่เจือจางปริมาณ 50 ไมโครลิตร หรือเท่ากับ ปริมาณ 1/4 ของปริมาณที่บริษัทแนะนำ เพื่อประหยัดเวลาในการนับรังสี

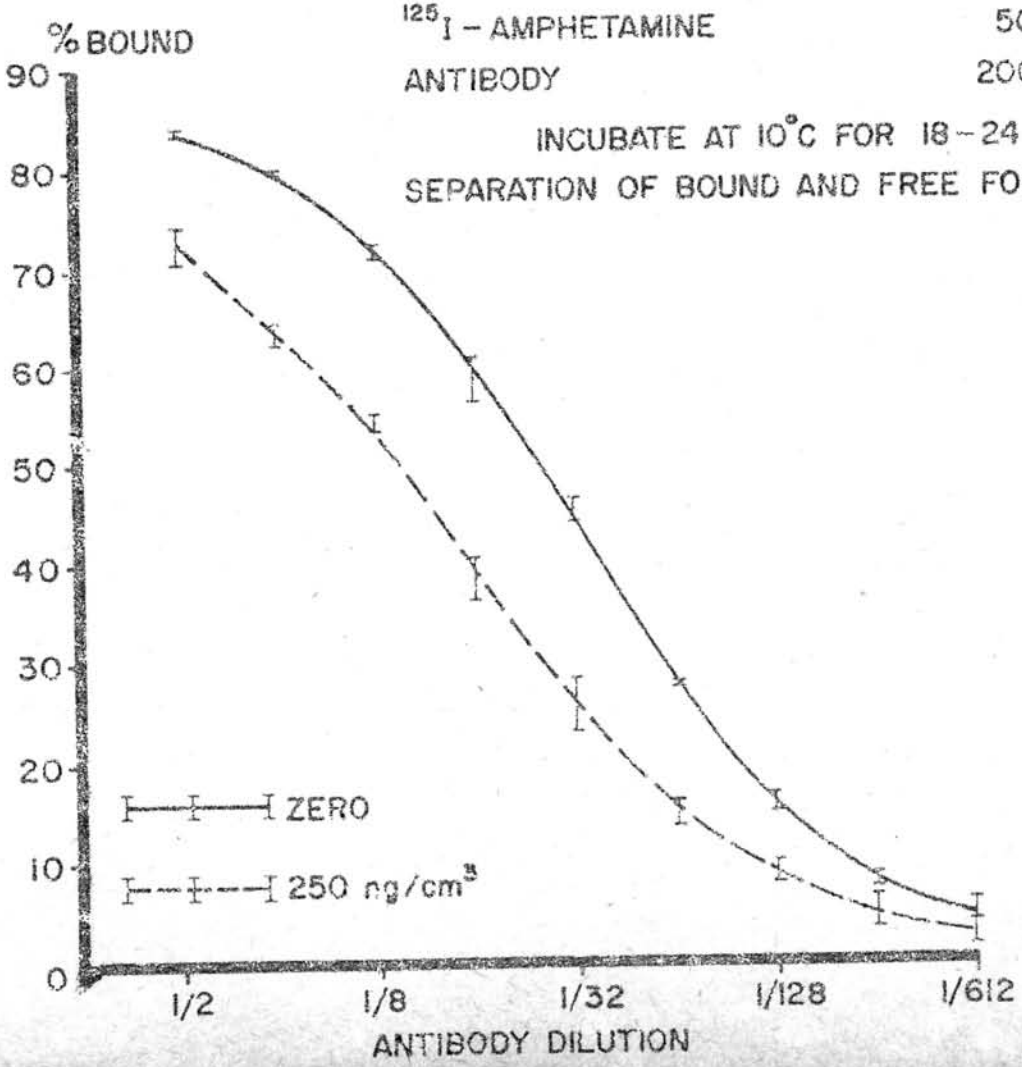
รูปที่ 14 การหาปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสม

ASSAY PROTOCOL

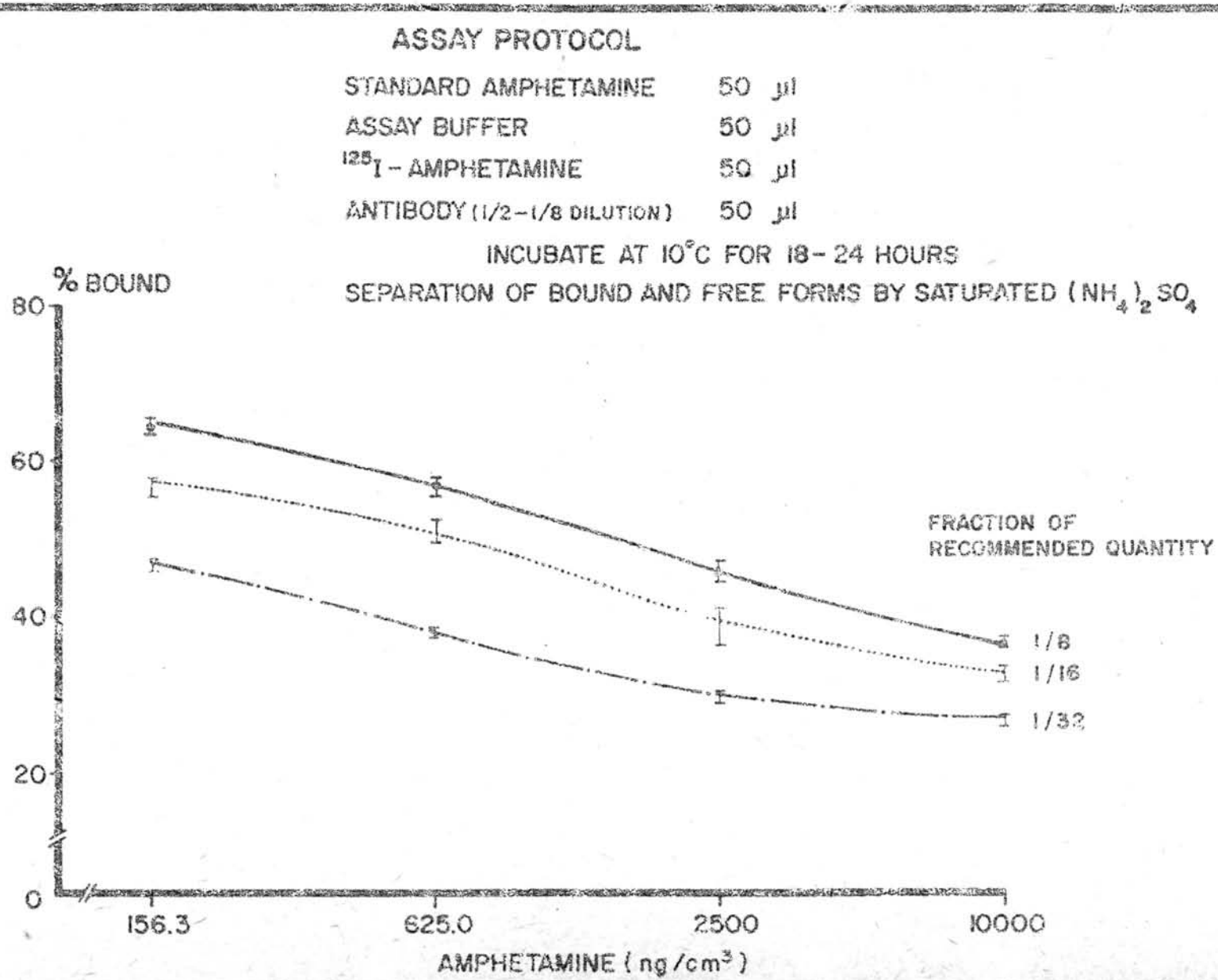
| | |
|---|---|
| STANDARD AMPHETAMINE | 100 µl |
| ASSAY BUFFER | 150 µl |
| $^{125}I$ – AMPHETAMINE | 50 µl |
| ANTIBODY | 200 µl |

INCUBATE AT 10°C FOR 18 – 24 HOURS

SEPARATION OF BOUND AND FREE FORMS OF SATURATED $(NH_4)_2 SO_4$



รูปที่ 15 อิทธิพลของปริมาณแอนติบอดีต่อกราฟมาตราฐาน



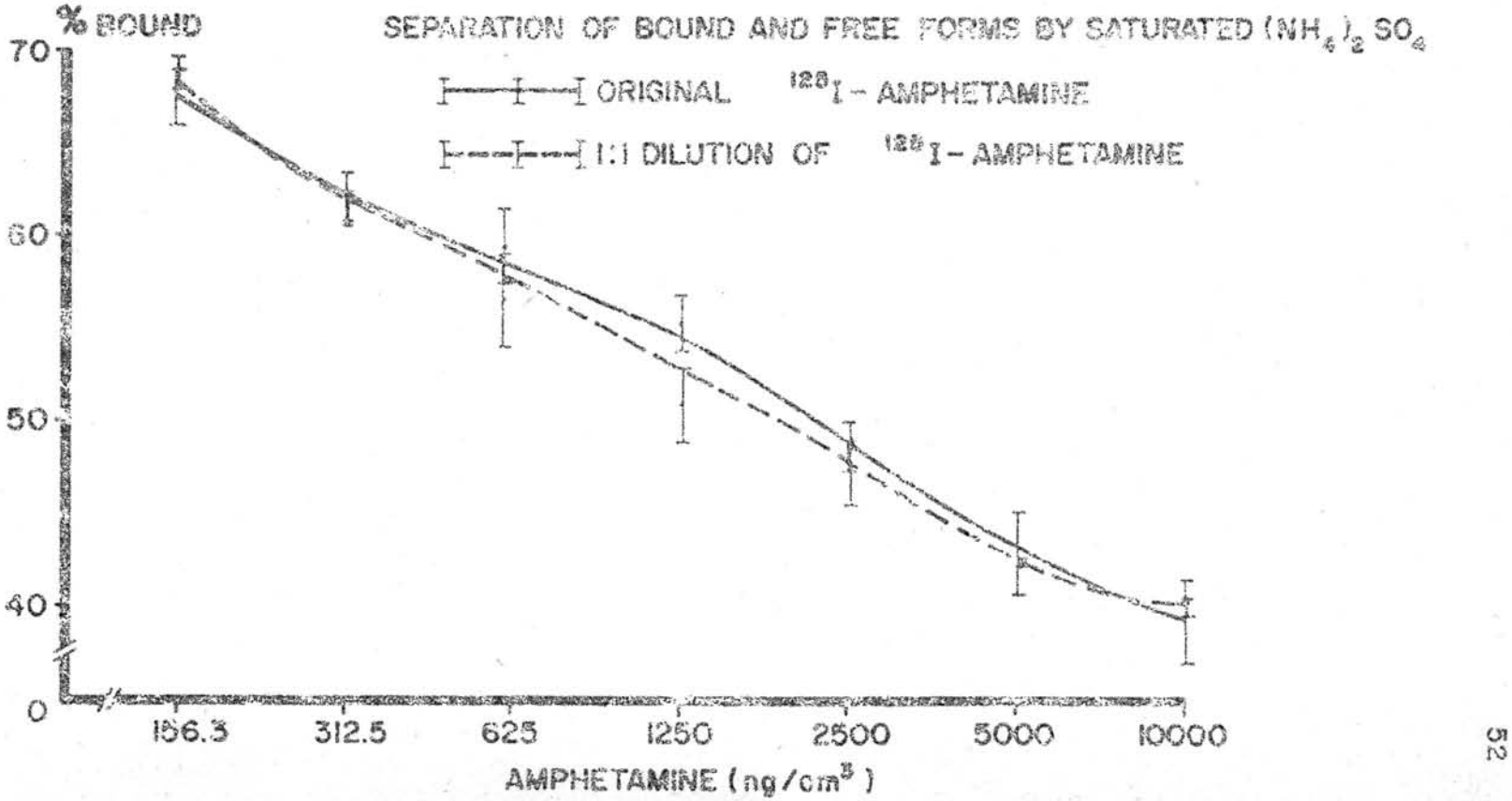
รูปที่ 16 อิทธิพลของปริมาณแอมเฟตามีนต่อการวัดมาตราฐาน

## ASSAY PROTOCOL

| | |
|---|---|
| STANDARD AMPHETAMINE | 50 µl |
| ASSAY BUFFER | 50 µl |
| $^{125}I$ - AMPHETAMINE | 50 µl |
| ANTIBODY (1/2 DILUTION) | 50 µl |

INCUBATE AT 10°C FOR 18 - 24 HOURS

SEPARATION OF BOUND AND FREE FORMS BY SATURATED $(NH_4)_2 SO_4$



4.3.2.3 ผลการศึกษาอิทธิพลของเวลาและอุณหภูมิต่อการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว

จากการศึกษาอิทธิพลของเวลาและอุณหภูมิต่อคุณสมบัติของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวในการตกตะกอนแอมเฟตามินในรูปที่จับกับแอนติบอดี พบว่า เมื่อให้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 10 และ 25 องศาเซลเซียส การทิ้งให้ตกตะกอนเพียง 5 นาที ไม่แตกต่างจากการทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง แต่การตกตะกอนที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จะให้ตะกอนมากกว่าที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 17

การทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ การตกตะกอนที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศา เซลเซียส แล้ว ทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที จึงปั่นแยกตะกอนออกจากน้ำได้

4.3.2.4 ผลการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการรวมตัวของแอมเฟตามินกับแอนติบอดี

พบว่าปฏิกิริยาการรวมตัวของแอมเฟตามินกับแอนติบอดีที่อุณหภูมิประมาณ 10 25 และ 30 องศาเซลเซียส ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 18)

การศึกษาต่อไปจึงเลือกใช้อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส สำหรับการรวมตัวซึ่งสามารถทำได้โดยสะดวกโดยการทิ้งหลอดทดลองให้เกิดปฏิกิริยาในตู้เย็น

4.3.2.5 ผลการศึกษาอิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการรวมตัวของแอมเฟตามินกับแอนติบอดี

จากรูปที่ 19 แสดงว่าการรวมตัวของแอมเฟตามินกับแอนติบอดี จะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจาก 30 นาทีถึง 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ต่อจากนั้นปฏิกิริยานี้จะคงที่ไปจนถึง 24 ชั่วโมง ปฏิกิริยาการรวมตัวของแอมเฟตามินกับแอนติบอดี น่าจะถึงจุดสมดุลย์ภายในเวลา 2 ชั่วโมง แต่เพื่อความสะดวกจึงเลือกใช้วิธีอินคิวเบทข้ามคืนคือประมาณ 18 ถึง 24 ชั่วโมง

4.3.3 ผลการศึกษาอิทธิพลของปัสสาวะคนปกติต่อกราฟมาตราฐาน

จากการศึกษาอิทธิพลของปัสสาวะต่อปฏิกิริยาการรวมตัวของแอมเฟตามินมาตราฐานกับแอนติบอดี พบว่าปัสสาวะคนปกติ 25 และ50 ไมโครลิตร นี้ไม่มีอิทธิพลต่อการรวมตัวของแอมเฟตามิน กับแอนติบอดีอย่างมีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 20

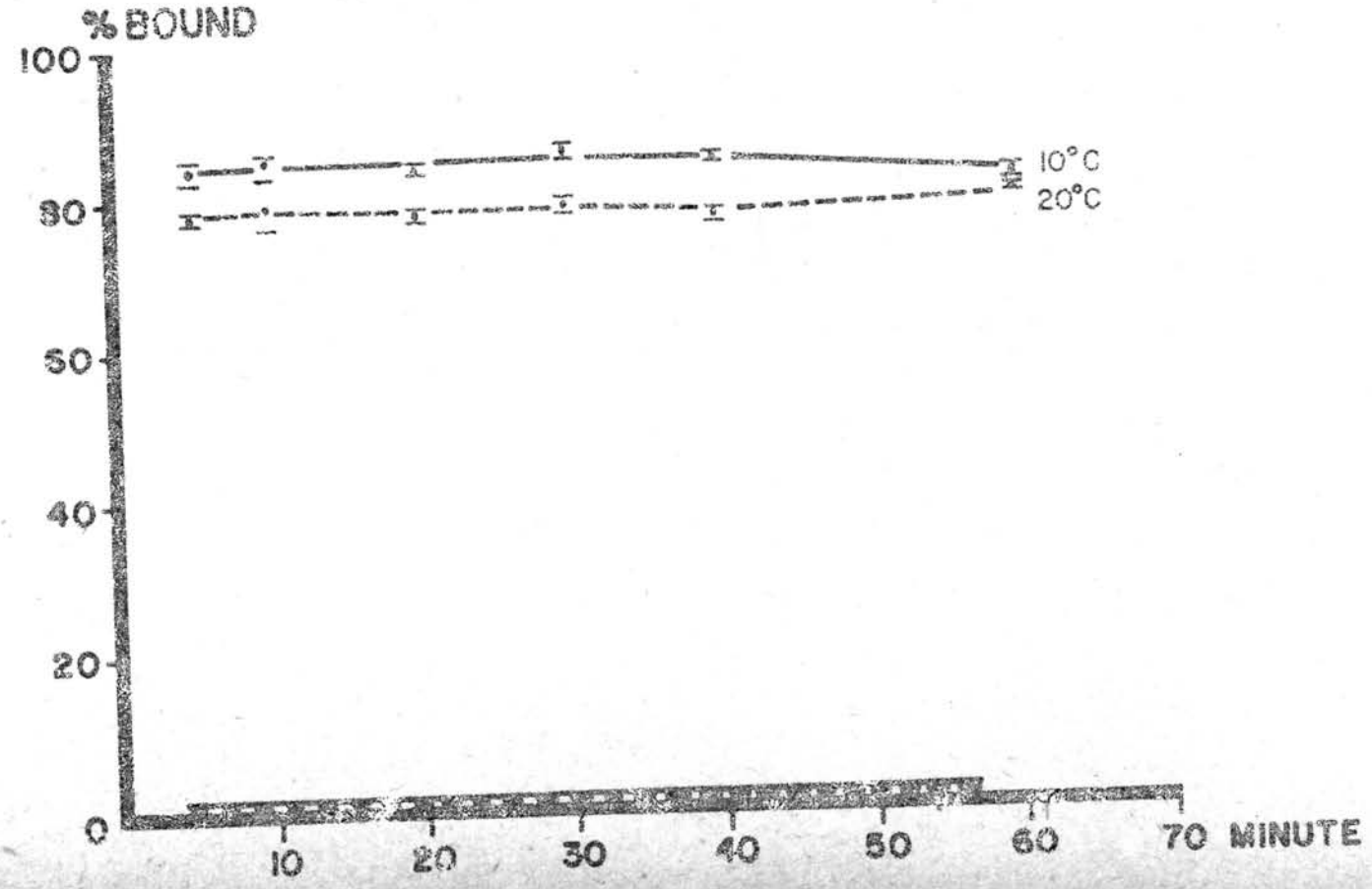
รูปที่ 17 อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาต่อการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว

ASSAY PROTOCOL

| | |
|---|---|
| $^{125}I$ – AMPHETAMINE | 50 µl |
| ANTIBODY (1/2 DILUTION) | 50 µl |
| ASSAY BUFFER | 50 µl |

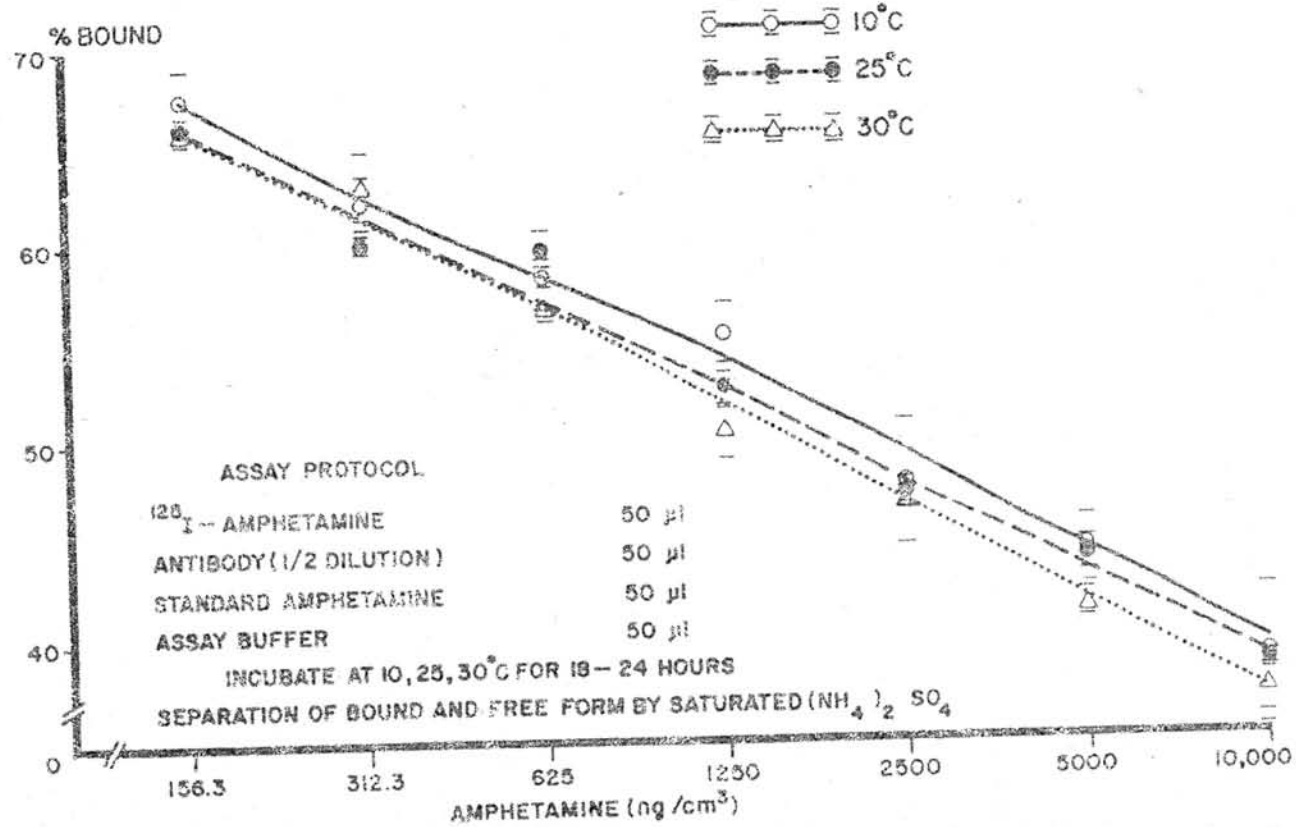
INCUBATE AT 10°C FOR 18 – 24 HOURS

SEPARATION OF BOUND AND FREE FORM BY SATURATED $(NH_4)_2 SO_4$




หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 18 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการรวมตัวของแอม เฟตามีนกับแอนติบอดี



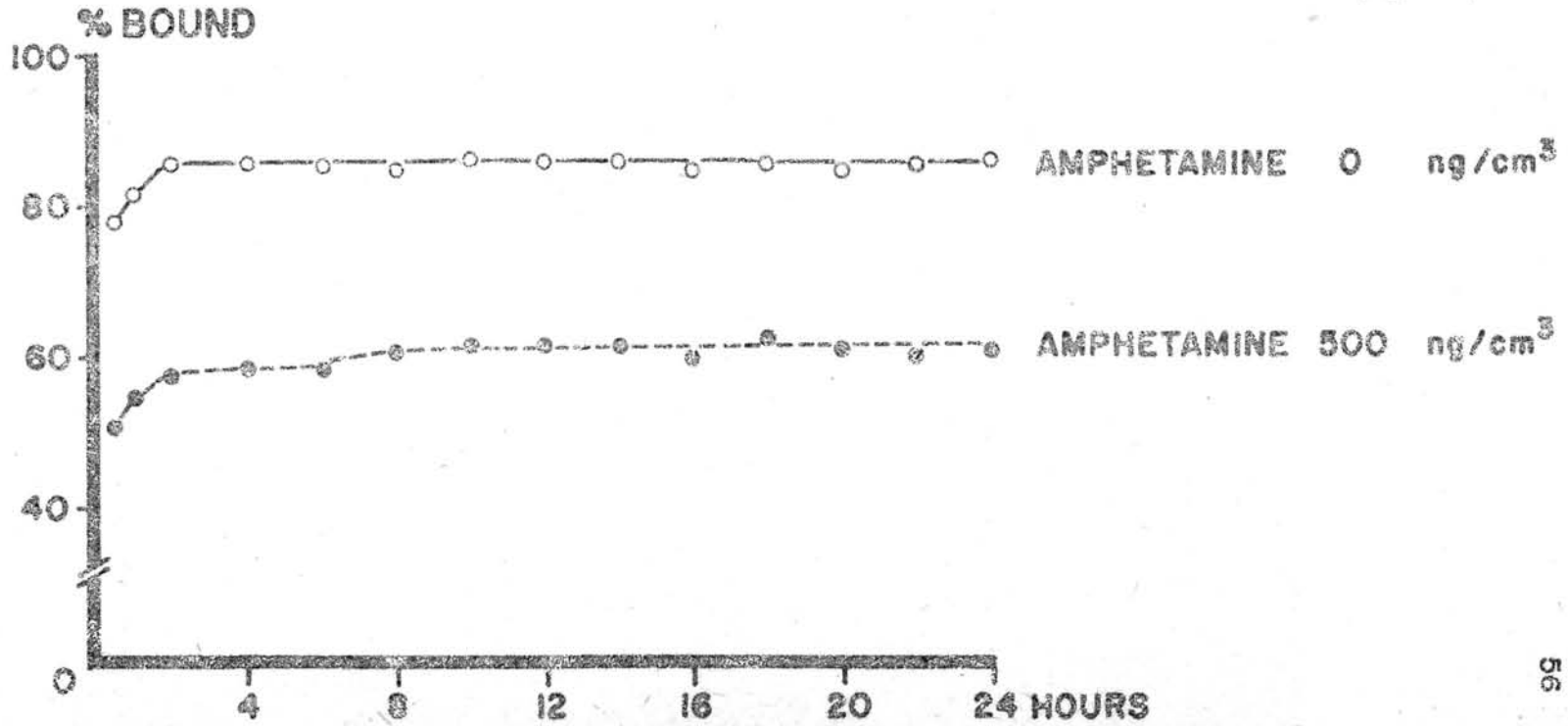
รูปที่ 19 อิทธิพลเวลาต่อการรวมตัวของแอมเฟตามีนกับแอนติบอดี

ASSAY PROTOCOL

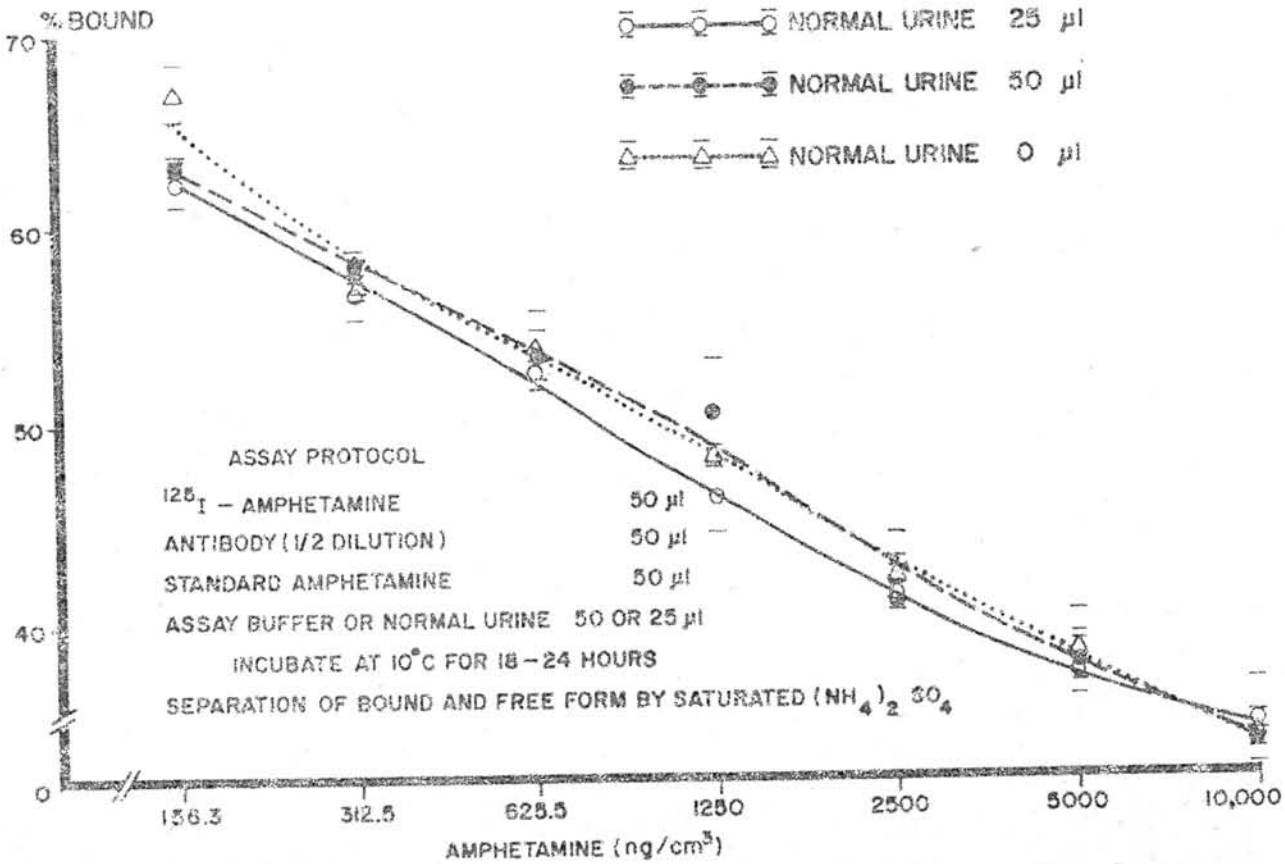
| | |
|---|---|
| STANDARD AMPHETAMINE | 50 µl |
| ASSAY BUFFER | 50 µl |
| $^{125}I$ - AMPHETAMINE | 50 µl |
| ANTIBODY ( 1/2 DILUTION ) | 50 µl |

INCUBATE AT 10°C FOR 0.5 ~ 24 HOURS

SEPARATION OF BOUND AND FREE FORM BY SATURATED $(NH_4)_2 SO_4$



รูปที่ 20 อิทธิพลของปัสสาวะคนปกติต่อกราฟมาตราฐาน



4.3.4 ผลการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีทดลอง

4.3.4.1 ความจำเพาะของแอนติบอดี

เมื่อทดสอบความจำเพาะกับ ยาชนิดต่าง ๆ คือ ยากระตุ้น ยากล่อมประสาท ยาบาบิทูเรท ยาเสพติดที่มีฤทธิ์ในการระงับปวด ยาลดความอ้วนและยาแก้แพ้ พบว่าแอนติบอดีที่ใช้มีปฏิกิริยาข้ามชนิดสูงสุดกับเมทแอมเฟตามีนเป็นร้อยละ 1.06 (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ความจำเพาะของแอนติแอมเฟตามีน

| ยาที่ทดสอบ | ปฏิกิริยาข้ามชนิด |
|---|---|
| ยากระตุ้น | |
| d-amphetamine | 100 |
| ephedrine HCl | 0.004 |
| methamphetamine HCl | 1.060 |
| phenylpropanolamine HCl | 0.610 |
| ยากล่อมประสาท | |
| chlordiazepoxide base | 0.001 |
| chlorpromazine HCl | 0.001 |
| ยาบาบิทูเรท | |
| sodium secobarbital | 0.001 |
| ยาเสพติดที่มีฤทธิ์ในการระงับปวด | |
| methadone HCl | 0.001 |
| ยาลดความอ้วน | |
| phenmetrazine HCl | 0.054 |
| ยาแก้แพ้ | |
| chlorpheniramine malate | 0.001 |

4.3.4.2 ความไว ความแม่นยำ และความถูกต้อง ของการวิเคราะห์แอมเฟตามีนระดับต่ำ

จากการศึกษาความเชื่อถือได้ของวิธีเมื่อใช้แอมเฟตามีนมาตราฐาน 15.6-1000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร พบว่าความไวของวิธีการวัดเป็น 22 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร หรือ 1 นาโนกรัมต่อหลอดทดลอง (รูปที่ 21) ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนภายในการทดลองแต่ละครั้ง ครั้งละ 5 ตัวอย่าง และระหว่างการทดลอง 3 ครั้ง อยู่ระหว่าง 13.8 ถึง 21.2 และ 23.1 ถึง 46.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 13) และค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์อยู่ระหว่างร้อยละ 83.8 ถึง 136.7 (ตารางที่ 14)

4.3.4.3 ความไว ความแม่นยำ และความถูกต้องของการวิเคราะห์แอมเฟตามีนระดับสูง

เมื่อศึกษาการวิเคราะห์ แอมเฟตามีนเข้มข้นระหว่าง 156.3 ถึง 10,000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (รูปที่ 22) พบว่าความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ดีกว่าการวิเคราะห์แอมเฟตามีนระดับต่ำ กล่าวคือ ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน ภายในการทดลองแต่ละครั้ง ครั้งละ 5 ตัวอย่าง ระหว่างการทดลอง 3 ครั้ง อยู่ระหว่าง 6.4 ถึง 19.4 และ 12.5 ถึง 16.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 13) ความถูกต้องของการทดลองดีกว่า การวิเคราะห์ระดับต่ำอย่างเห็นได้ชัด คือ มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 95.5 ถึง 108.4 (ตารางที่ 14)

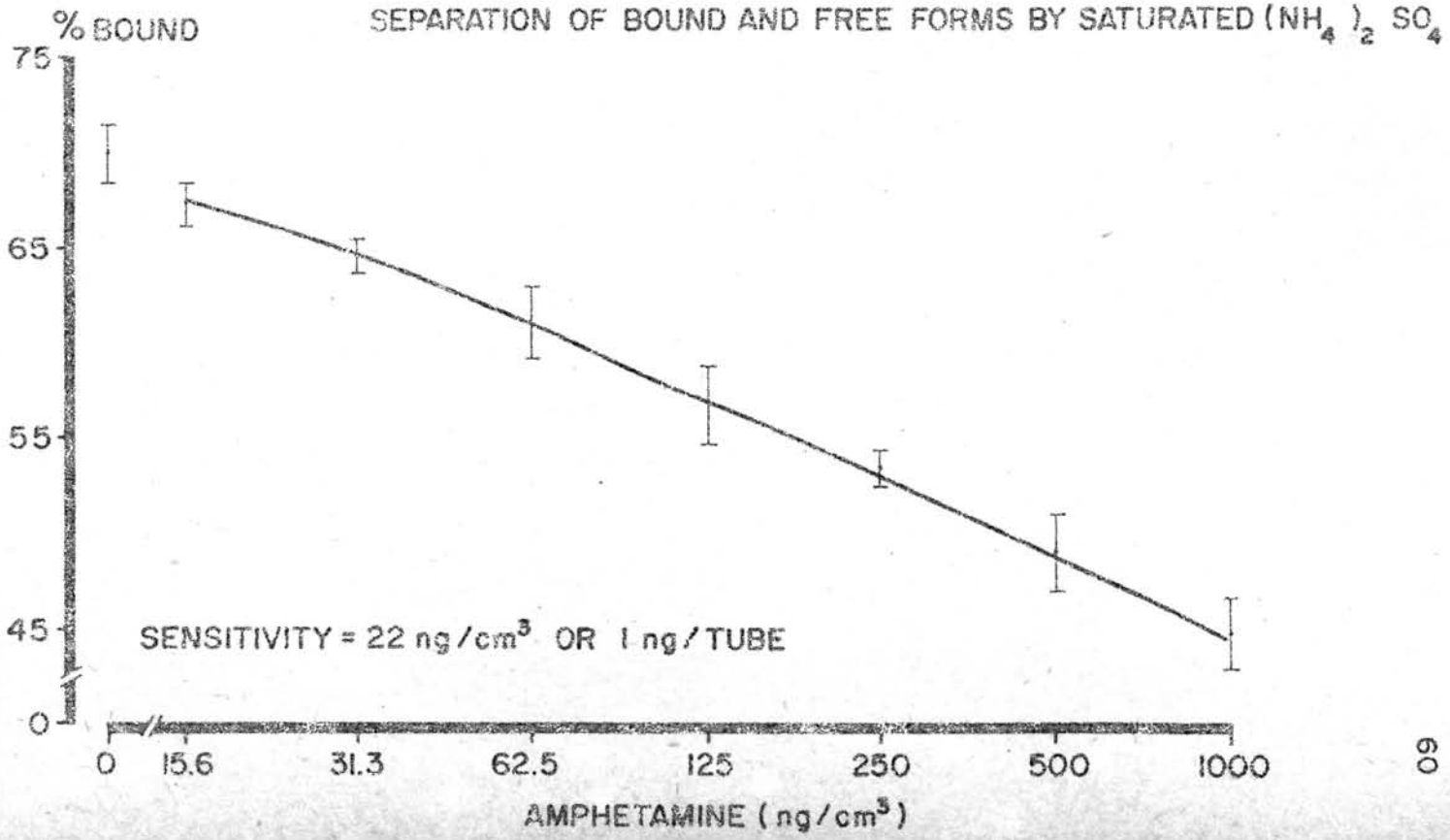
รูปที่ 21 กราฟมาตราฐานของการวิเคราะห์แอมเฟตามีนด้วยวิธี ราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

ASSAY PROTOCOL

| | |
|---|---|
| STANDARD AMPHETAMINE | 50 µl |
| ASSAY BUFFER | 50 µl |
| $^{125}I$ – AMPHETAMINE | 50 µl |
| ANTIBODY(1/2 DILUTION) | 50 µl |

INCUBATE AT 10°C FOR 18–24 HOURS

SEPARATION OF BOUND AND FREE FORMS BY SATURATED $(NH_4)_2 SO_4$



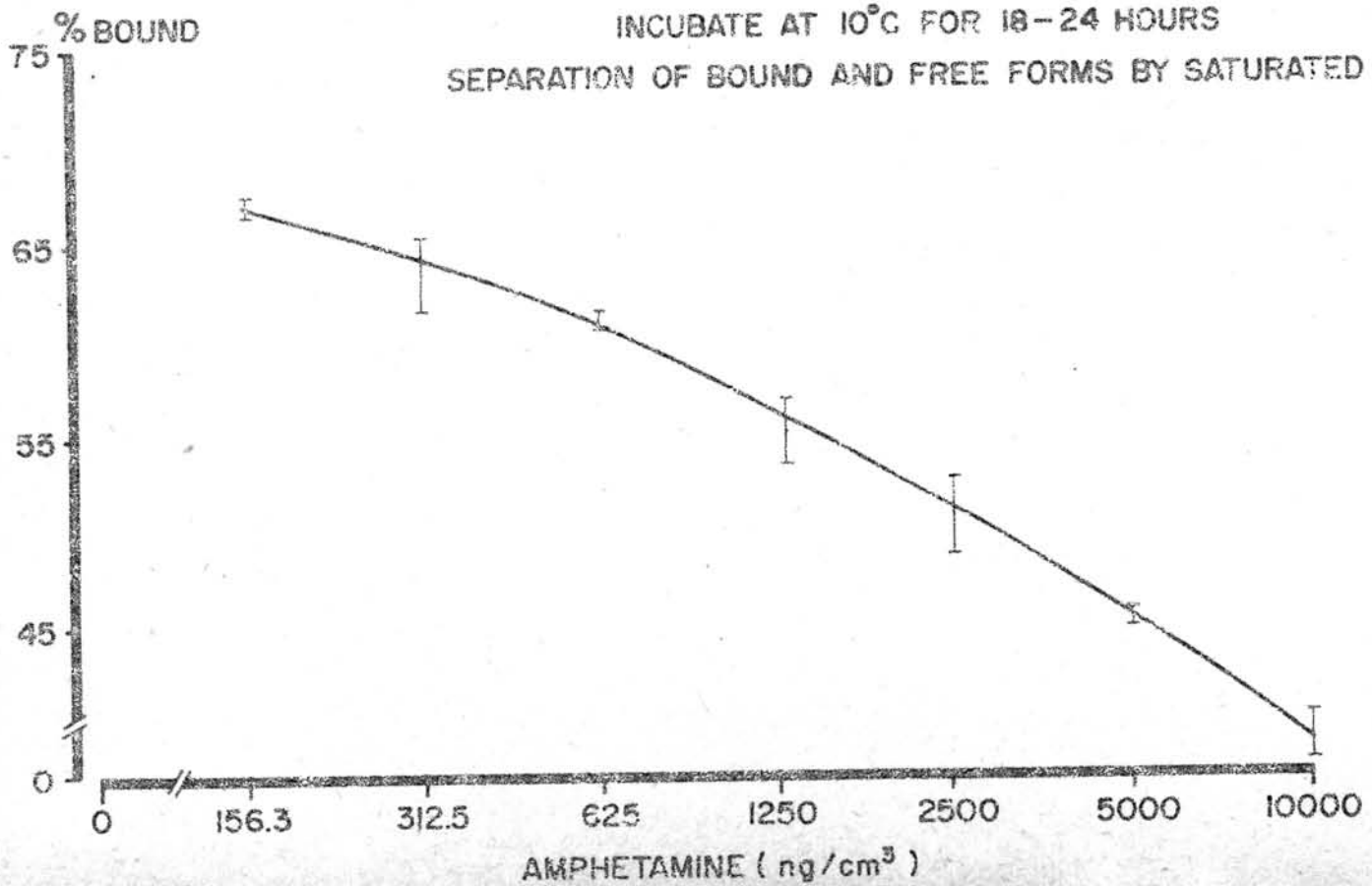
รูปที่ 22 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์แอมเฟตามินด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

ASSAY PROTOCOL

| | |
|---|---|
| STANDARD AMPHETAMINE | 50 µl |
| ASSAY BUFFER | 50 µl |
| $^{125}I$ - AMPHETAMINE | 50 µl |
| ANTIBODY (1/2 DILUTION) | 50 µl |

INCUBATE AT 10°C FOR 18-24 HOURS

SEPARATION OF BOUND AND FREE FORMS BY SATURATED $(NH_4)_2SO_4$



ตารางที่ 13 ความแม่นยำของการวิเคราะห์แอมเฟตามินด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

| Amphetamine ng/cm$^3$ | Within Assay Precision | | | Between Assay Precision | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $\bar{X}$ | S.D. (n = 3) | %CV | $\bar{X}$ | S.D. (n = 3) | %CV |
| 25 | 43.0 | 8.8 | 20.4 | 32.4 | 14.9 | 46.0 |
| 50 | 68.2 | 13.1 | 19.2 | 55.1 | 14.1 | 25.5 |
| 100 | 78.2 | 16.5 | 21.2 | 87.4 | 20.2 | 23.1 |
| 200 | 172.4 | 23.8 | 13.8 | 199.7 | 62.9 | 31.5 |
| 500 | 546.0 | 84.4 | 15.5 | 542.0 | 86.9 | 16.0 |
| 1000 | 972.0 | 62.6 | 6.4 | 1040.0 | 132.0 | 12.8 |
| 2000 | 2140.0 | 326.7 | 15.3 | 2103.3 | 263.5 | 12.5 |
| 3000 | 2937.0 | 570.6 | 19.4 | 3050.0 | 455.1 | 14.9 |

ตารางที่ 14 ความถูกต้องของการวิเคราะห์แอมเฟตามินด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

| Amphetamine Added* ($ng/cm^3$) | Amphetamine Measured ($ng/cm^3$) | Percentage Recovery |
|---|---|---|
| 25 | 34.2 | 136.7 |
| 50 | 46.0 | 92.0 |
| 100 | 103.4 | 103.4 |
| 200 | 167.6 | 83.8 |
| 500 | 542.0 | 108.4 |
| 1000 | 1038.0 | 103.8 |
| 2000 | 1910.0 | 95.5 |
| 3000 | 2910.0 | 97.0 |

* n = 5

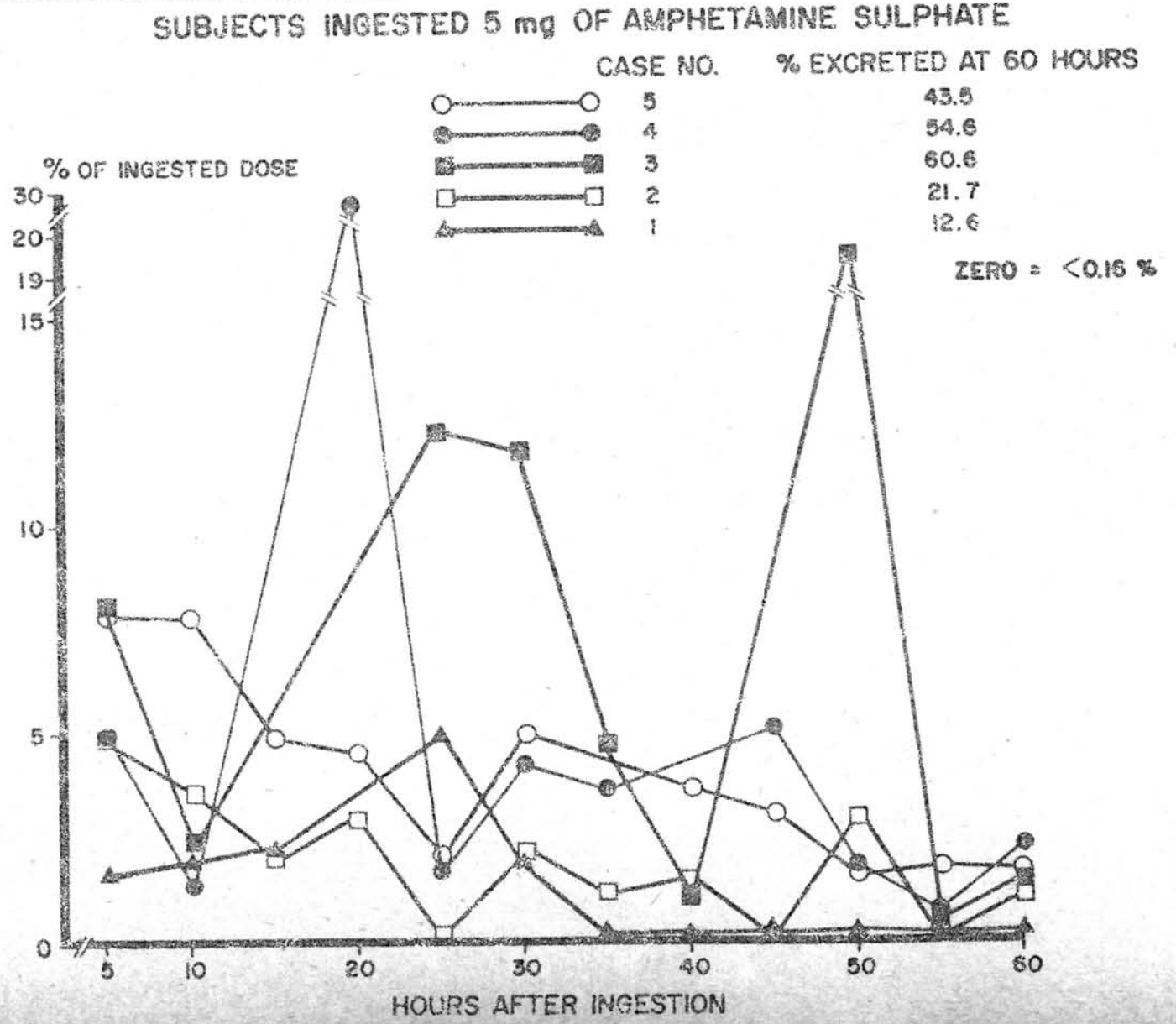
4.3.5 ผลการวิเคราะห์แอมเฟตามินในปัสสาวะตัวอย่างจากอาสาสมัคร

ลักษณะการขับถ่ายแอมเฟตามินในปัสสาวะของอาสาสมัคร 5 รายที่รับประทานแอมเฟตามินซัลเฟต 5 มิลลิกรัม แล้วเก็บปัสสาวะเป็นช่วง ๆ ละ 5 ชั่วโมง ปรากฏดังรูปที่ 23 และพบว่าหลังจากรับประทานยาแล้ว 15 และ 60 ชั่วโมง ปริมาณแอมเฟตามินสะสมที่ขับถ่ายออกมามีค่าตั้งแต่ร้อยละ 5.7 ถึง 20.7 หรือมีค่าโดยเฉลี่ยเท่ากับ 10. $\pm$ 6.0 และ 12.6 ถึง 60.0 ของปริมาณแอมเฟตามินที่รับประทานเข้าไป ตามลำดับ (รูปที่ 24) การขับถ่ายจะสูงสุดในช่วง 10 ถึง 30 ชั่วโมงแรก หลังจากรับประทานยาและมีค่าความเข้มข้นสูงสุดตั้งแต่ 707 ถึง 5500 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (ตารางที่ 15)

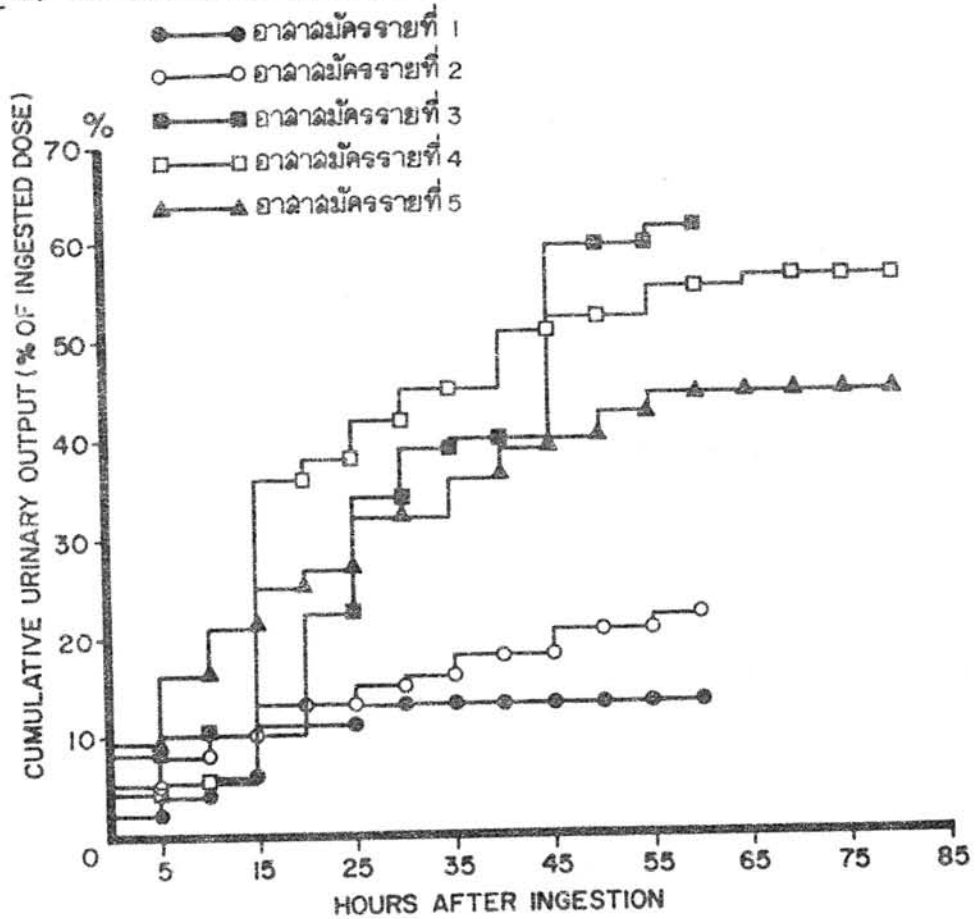
ตารางที่ 15 ปริมาณสูงสุดในปัสสาวะตัวอย่างจากอาสาสมัครที่รับประทานแอมเฟตามินซัลเฟต 5 มิลลิกรัม

| อาสาสมัคร รายที่ | เวลาหลังรับประทานยา (ชั่วโมง) | ปริมาณสูงสุดในปัสสาวะ (นาโนกรัม ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) |
|---|---|---|
| 1 | 15 | 707 |
| 2 | 30 | 860 |
| 3 | 10 | 3866 |
| 4 | 20 | 5500 |
| 5 | 15 | 1483 |

รูปที่ 23 ปริมาณของแอมเฟตามีนที่ขับถ่ายออกทางปัสสาวะของอาสาสมัคร 5 ราย



รูปที่ 24 ปริมาณสะสมของแอมเฟตามีนที่ขับถ่ายออกทางปัสสาวะของอาสาสมัคร 5 ราย



4.3.6 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์แอมเฟตามินในปัสสาวะ โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี และ ราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

ผลการวิเคราะห์แอมเฟตามินในปัสสาวะของอาสาสมัคร 5 ราย ที่รับประทานแอมเฟตามินซัลเฟต 5 มิลลิกรัม ด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ พบว่าความเข้มข้นของแอมเฟตามิน มีค่าระหว่าง 100 ถึง 6000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลของการวิเคราะห์ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี พบว่าเมื่อความเข้มข้นของแอมเฟตามินที่ตรวจพบในวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์สูงตั้งแต่ 500 นาโนกรัมต่อลูกบาสก์เซนติเมตรขึ้นไป ผลการวิเคราะห์ของทั้งสองวิธีจะสอดคล้องกัน ถ้าความเข้มข้นที่ตรวจพบอยู่ระหว่าง 401 ถึง 500 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร การตรวจโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟีจะให้ผลที่สรุปไม่ได้แน่นอนประมาณร้อยละ 39 เมื่อความเข้มข้นของแอมเฟตามินอยู่ในระดับต่ำลงไปอีก การตรวจโดยวิธีหลัง จะสรุปได้แน่นอนน้อยลงไปอีก และถ้าความเข้มข้นต่ำกว่า 200 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร การวิเคราะห์โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี จะมีโอกาสตรวจพบสารที่สงสัยเพียงร้อยละ 12 เท่านั้น (ตารางที่ 16)

4.3.7 ผลการควบคุมคุณภาพของวิธีวิเคราะห์

รูปที่ 25 แสดงให้เห็นถึงคุณภาพการวิเคราะห์ ตามวิธีของ Challand และคณะ (1973) ในการวิเคราะห์แอมเฟตามินมาตราฐานเข้มข้น 500 1000 2000 และ 3000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ที่เตรียมเก็บไว้แล้วนำมาวิเคราะห์พร้อมกับการวิเคราะห์ตัวอย่างอื่น ๆ ทุกครั้ง ผลการเปรียบเทียบ พบว่าคุณภาพของการวิเคราะห์แอมเฟตามินเข้มข้น 1000 ถึง 2000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร แม่นยำดีกว่าช่วงความเข้มข้นอื่น ๆ แต่ทุกความเข้มข้นที่ศึกษาให้ความแตกต่างของการวิเคราะห์ไม่เกิน 2 เท่าของความเบี่ยงเบนมาตราฐาน

ตารางที่ 16 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์แอมเฟตามินในปัสสาวะ โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (TLC) และราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ (RIA)

| RIA $ng/cm^3$ | จำนวนตัวอย่างและร้อยละของการตรวจพบโดยวิธี TLC | | | |
|---|---|---|---|---|
| | - | ± | + | รวม |
| 100-200 | 19(55.9) | 11(32.4) | 4(11.8) | 34 (100) |
| 201-300 | 4(40.0) | 2(20.0) | 4(40.0) | 10 (100) |
| 301-400 | 4(33.3) | 1 (8.3) | 7(58.3) | 12 (100) |
| 401-500 | 0 | 7(38.9) | 11(61.1) | 18 (100) |
| 501-600 | 0 | 0 | 4 (100) | 4 (100) |
| 601-800 | 0 | 0 | 12 (100) | 12 (100) |
| 801-1000 | 0 | 0 | 8 (100) | 8 (100) |
| 1001-6000 | 0 | 0 | 26 (100) | 26 (100) |

( ) ร้อยละ

\- ตรวจไม่พบ

± สรุปไม่ได้แน่นอน

\+ ตรวจพบ

รูปที่ 25 คุณภาพของวิธีวิเคราะห์ แอมเฟตามีนด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์