บทที่ 3

วิธีการ

3.1 การเตรียมสารละลาย

3.1.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์

เตรียมบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ pH 7.4 ที่มีโซเดียมเอไซด์ 0.1% โดยนำไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.01 โมลาร์ (ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.41 กรัมด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร) มาปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วยโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.01 โมลาร์ (ละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.56 กรัมด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร)

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 9 กรัม และโซเดียมเอไซด์ 1 กรัม ด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้จนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.1.2 สารละลายแอมเฟตามีนมาตราฐานสำหรับวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี

เตรียมสารละลายมาตราฐานที่มีแอมเฟตามีนเข้มข้น 1% โดยละลายแอมเฟตามีนซัลเฟต 136.28 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่น 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเจือจางลงอีกด้วยน้ำกลั่นจนได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของแอมเฟตามีน 0.1% หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

3.1.3. ปัสสาวะสำหรับทดสอบความจำเพาะของวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี

เตรียมสารดังรายการข้างล่างนี้ให้มีความเข้มข้น 1% โดยละลายสารเหล่านี้ชนิดละ 100 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่น 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเจือจางลงอีกด้วยน้ำกลั่นจนได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของสารเหล่านี้ 0.1%

รายชื่อสารที่ใช้ทดสอบความจำเพาะของวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี

Phenylpropanolamine	Hydrochloride
Phenylalanine	Hydrochloride
Ephedrine	Hydrochloride
Meprobamate	
Procaine	Hydrochloride
Pyrazole Derivative	(Spaslar)
Phenmetrazine	Hydrochloride

นำสารละลายเหล่านี้ 50 ไมโครลิตร (50 ไมโครกรัม) เติมลงในปัสสาวะจากคนปกติ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร แยกจากกัน

3.1.4 <u>ปัสสาวะสำหรับทดสอบความไวของวิธีฟินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี</u>

เตรียมปัสสาวะที่มีแอมเฟตามินเบสเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 0.01 0.2 และ 10 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร โดยนำสารละลายแอมเฟตามินมาตราฐาน 0.1% (จากข้อ 3.1.3 หน้า 17) มาเจือจางอีกด้วยน้ำกลั่นจนได้สารละลายแอมเฟตามินมาตราฐาน 0.01% แล้วเติมสารละลายนี้ปริมาณ 500 20 10 5 และ 2.5 ไมโครลิตรหรือเท่ากับ ปริมาณแอมเฟตามินเบส 50 2 1 5 และ 0.25 ไมโครกรัม ลงในปัสสาวะจากคนปกติ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ

3.1.5 <u>สารละลายแอมเฟตามินมาตราฐานสำหรับวิธีสเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรี</u>

นำสารละลายแอมเฟตามินมาตราฐานเข้มข้น 0.1 % หรือ 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (จากข้อ 3.1.2 หน้า 17) มาเจือจางลงอีกด้วยน้ำกลั่นจนได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของแอมเฟตามิน 0.001 0.005 0.01 และ 0.02 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

3.1.6 <u>ปัสสาวะแอมเฟตามินสำหรับวิธีสเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรี</u>

เตรียมปัสสาวะที่มีแอมเฟตามินเบสเข้มข้น 0.002 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร โดยเติมสารละลายแอมเฟตามินมาตราฐานเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (จากข้อ 3.1.2 หน้า 17) ปริมาณ 10 และ 25 ไมโครลิตร ลงในปัสสาวะคนปกติ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ

3.1.7 <u>สารละลายแอมเฟตามินมาตราฐานสำหรับวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์</u>

เตรียมสารละลายมาตราฐานที่มีแอมเฟตามินเบสเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร โดยละลายแอมเฟตามินซัลเฟต 136.28 มิลลิกรัมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (จากข้อ3.1.1 หน้า 17) 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วทำให้เจือจางลงอีกด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์จนได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของแอมเฟตามินเบส 10 และ 1 ไมโครกรัม ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้ จึงนำสารละลายเหล่านี้ อย่างละ 250 ไมโครลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 250 ไมโครลิตร แล้วเจือจางแบบอนุกรมจนได้สารละลายมาตราฐานที่มีความเข้มข้นของแอมเฟตามินเบส เท่ากับ 10000 5000 2500 1250 625 312.5 156.3 และ 1000 500 250 125 62.5 31.3 15.6 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ

3.1.8 <u>สารละลายสำหรับทดสอบความจำเพาะของวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์</u>

เตรียมสารดังรายการข้างล่างนี้ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร โดยละลายสาร 100 มิลลิกรัมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1 หน้า 17) 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร

รายชื่อสารที่ใช้ทดสอบความจำเพาะของวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

phenylpropanolamine	Hydrochloride
Ephedrine	Hydrochloride
Methamphetamine	Hydrochloride
Chlordiazepoxide	Base
Chlorpromazine	Hydrochloride
Sodium	Secobarbital
Methadone	Hydrochloride
Phenmetrazine	Hydrochloride
Chlorpheniramine	Malate

3.1.9 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ โดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัม ด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3.1.10 สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต

เตรียมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 7% โดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 7 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3.1.11 สารละลาย 7-Chloro-4-Nitrobenzo-2, 1, 3-Oxadiazole (NBD-Cl)

เตรียมสารละลาย NBD-Cl เข้มข้น 0.2% โดยละลาย NBD-Cl 200 มิลลิกรัมด้วย คลอโรฟอร์ม 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร (เตรียมทันทีก่อนใช้)

3.2 การเตรียมแผ่นซิลิกาเจล

เตรียมแผ่นซิลิกาเจลขนาด 20 x 20 เซนติเมตร หนา 0.25 มิลลิกรัม โดยใช้ซิลิกาเจล 20 กรัม ผสมกับน้ำ 40 ลูกบาศก์เซนติเมตรให้เข้ากันดีเป็นเวลาประมาณ 30 ถึง 40 วินาที เทสารผสมใส่ถาดซึ่งปรับให้ได้ความหนาของแผ่นซิลิกาเจลเป็น 0.25 มิลลิเมตร แล้วลากถาดไปตามแผ่นแก้วที่สะอาดและแห้งด้วยความเร็วสม่ำเสมอ ทิ้งไว้ให้ซิลิกาเจลจับตัวกันดีอย่างน้อย 10 นาที ก่อนที่จะนำแผ่นแก้วออกจากเครื่องมือ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และเก็บไว้ในตู้อบแห้งที่มีซิลิกาเจลสีน้ำเงินอยู่

3.3 การสกัดแอมเฟตามีนจากปัสสาวะ

นำสารละลายหรือปัสสาวะที่ต้องการสกัดแอมเฟตามีนมา 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ปรับให้เป็นด่าง (pH 10-11) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ข้อ 3.1.9 หน้า 18) แล้วสกัดด้วยอีเทอร์ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าตามแนวดิ่งนาน 1 นาที รอให้ชั้นอีเทอร์แยกออกจากชั้นปัสสาวะ และใช้ชั้นของอีเทอร์สำหรับเตรียมอนุพันธ์ต่อไป

3.4 การเตรียมอนุพันธ์ Amphetamine - NBD

ผสมอีเทอร์จากข้อ 3.3 10 ลูกบาศก์เซนติเมตรกับสารละลาย NBD-Cl (จากข้อ 3.1.11 หน้า 19) 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำสารละลายไประเหยในเครื่องระเหยแห้ง ภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ก่อนที่ชั้นอีเทอร์จะแห้งล้างข้างหลอดแก้วด้วยเมทานอล 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และระเหยจนแห้ง

ส่วนที่เหลือจากการระเหยแล้ว คือ อนุพันธ์แอมเฟตามีน (Amphetamine-NBD) ซึ่งใช้สำหรับการวิเคราะห์โดยวิธี ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี หรือ สเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรี

3.5 การวิเคราะห์

3.5.1 วิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี

3.5.1.1 การตรวจวิเคราะห์

นำปัสสาวะคนปกติ ปัสสาวะจากอาสาสมัคร (จากข้อ 2.4 หน้า 15) ปัสสาวะสำหรับทดสอบความจำเพาะ และความไว (จาข้อ 3.1.3 หน้า 17 และข้อ 3.1.4 หน้า 18 ตามลำดับ) มา 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร สกัดแอมเฟตามีนตามวิธี ข้อ 3.3 และเตรียมอนุพันธ์ตามวิธี ข้อ 3.4 ตามลำดับ

ละลายอนุพันธ์ที่ได้ด้วยคลอโรฟอร์มประมาณ 3 ถึง 4 หยด แล้วหยดลงบนแผ่นซิลิกาเจลที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2 หน้า 21 ให้เป็นแถบแคบ ๆ ตามแนวนอนยาวประมาณ 1 ถึง 2 เซนติเมตร ให้แต่ละแถบห่างกันพอสมควร หลังจากเป่าให้แห้งแล้วนำแผ่นซิลิกาเจลนี้ไปวางในแทงค์ที่บรรจุตัวทำละลาย เอทธิลอาซิเตท และไซโคลเฮเซน 2:3 โดยปริมาตรซึ่งเตรียมไว้ล่วงหน้า และทิ้งไว้ให้สมดุลย์แล้วรอจนกระทั่งระดับของตัวทำละลายสูงจากจุดเริ่มต้นประมาณ 8 ถึง 10 เซนติเมตร แล้วนำแผ่นซิลิกาเจลออกจากแทงค์ทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหยจนหมด แล้วนำไปส่องใต้รังสีเหนือม่วงที่ 365 นาโนเมตร อนุพันธ์แอมเฟตามีนจะปรากฏเป็นสีเหลืองสดเรืองแสง

3.5.1.2 การศึกษาความเชื่อถือได้ของวิธี

ศึกษาความจำเพาะของอนุพันธ์ NBD-Cl กับอะมีนชนิดต่าง ๆ โดยนำปัสสาวะที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.3 หน้า 17 มาสกัดอะมีน เตรียมอนุพันธ์ของอะมีนตามวิธีข้อ 3.3 และ 3.4 และตรวจหาอนุพันธ์ของสารต่าง ๆ ตามวิธีข้อ 3.5.1.1 ตามลำดับ บันทึกค่า R_f ของอนุพันธ์ของอะมีนแต่ละชนิด

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่อนุพันธ์เคลื่อนที่จากจุดตั้งต้น}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดตั้งต้น}}$$

ศึกษาหาความไวของวิธีวิเคราะห์โดย นำ ปัสสาวะที่มีแอมเฟตามินเบสปริมาณต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0.25 0.5 1 2 และ 50 ไมโครกรัม (จากข้อ 3.1.4 หน้า 18) มาสกัดแอมเฟตามิน เตรียมอนุพันธ์ และตรวจวิเคราะห์อนุพันธ์ดังกล่าว (ตามวิธีข้อ 3.3 หน้า 20 ข้อ 3.4 หน้า 20 ข้อ 3.5.1.1 หน้า 20 ตามลำดับ) บันทึกปริมาณแอมเฟตามินน้อยที่สุด ที่ตรวจพบได้ภายใต้รังสีเหนือม่วงที่ 365 นาโนเมตร

3.5.2 วิธีสเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรี

การศึกษาด้วยวิธีนี้อาศัยการบันทึกค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์จากเครื่องมือโดยถือปฏิบัติในการทดลองแต่ละครั้ง คือ

ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เคมี เช่น คลอโรฟอร์มหรือ สารละลายอื่นที่ไม่มีอนุพันธ์ของแอมเฟตามินปรับค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์ให้เท่ากับศูนย์

ใช้สารละลายอนุพันธ์ของแอมเฟตามินที่ความเข้มข้นสูงสุด เช่น 0.01 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ในการปรับเข็มชี้ค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์ให้เท่ากับค่าสูงสุดที่ต้องการ

3.5.2.1 การศึกษา Emission Spectrum

นำปัสสาวะที่มีแอมเฟตามินเข้มข้น 0.005 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (จากข้อ 3.1.6 หน้า 18) มาสกัดแอมเฟตามิน เตรียมอนุพันธ์ (ตามวิธีข้อ 3.3 และ 3.4 หน้า 20 ตามลำดับ) แล้วละลายอนุพันธ์ที่ได้ด้วยคลอโรฟอร์ม 2 ครั้ง ๆ ละ 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำมาวัดความเรืองแสงสัมพัทธ์ที่ emission wavelength ต่าง ๆ ตั้งแต่ 480 ถึง 520 นาโนเมตร โดยใช้ excitation wavelength คงที่เท่ากับ 468 นาโนเมตร

3.5.2.2 การศึกษา Excitation Spectrum

ใช้สารละลายอนุพันธ์ของแอมเฟตามินที่เตรียมได้เช่นเดียวกับข้อ 3.5.2.1 แต่วัดความเรืองแสงสัมพัทธ์ที่ excitation wavelength ต่าง ๆ กันตั้งแต่ 400 ถึง 500 นาโนเมตร โดยใช้ emission wavelength คงที่เท่ากับ 520 นาโนเมตร

3.5.2.3 การศึกษาความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์

ก. การศึกษาความแม่นยำของการอ่านค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์

ศึกษาโดยให้แอมเฟตามินมาตราฐาน 0.001 0.005 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (จากข้อ 3.1.5 หน้า 18) ความเข้มข้นละ 1 ตัวอย่าง ปัสสาวะคนปกติ (จากข้อ 2.4.1 หน้า 16) 3 ตัวอย่าง ปัสสาวะที่มีแอมเฟตามิน .002 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (จากข้อ 3.1.6 หน้า 18) 3 ตัวอย่าง นำสารละลายแต่ละชนิด 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาสกัดด้วยอีเทอร์และเตรียมอนุพันธ์ตามวิธีการ ในข้อ 3.3 และ 3.4 หน้า 17 นำอนุพันธ์ที่ได้มาละลายใน

คลอโรฟอร์ม 2 ครั้ง ๆ ละ 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้ววัดความเรืองแสงสัมพัทธ์ที่ emission wavelength 480 และ 520 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยใช้ excitation wavelength เท่ากับ 468 นาโนเมตร หาค่าผลต่างของความเรืองแสงสัมพัทธ์ที่ emission wavelength 520 และ 480 นาโนเมตร และใช้ค่าผลต่างนี้แทนค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์ในการทดลองทั่วไป ทำการทดลองเช่นเดียวกัน 3 ครั้ง แล้วเปรียบเทียบความแม่นยำของการอ่านค่าความเรืองแสงในการทดลองเดียวกันและระหว่างการทดลอง จากค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

$$\text{สัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน} = \frac{\text{ค่าความเบี่ยงเบนมาตราฐาน}}{\text{ค่ามัชฌิมเลขคณิต}} \times 100$$

ข. <u>การศึกษาความแม่นยำและความถูกต้องของวิเคราะห์</u>

เขียนกราฟมาตราฐานของความสัมพันธ์ของค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์ และความเข้มข้นของแอมเฟตามินมาตราฐานที่ใช้

นำค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์ที่ได้จากปัสสาวะคนปกติ และปัสสาวะที่มีแอมเฟตามินเข้มข้น 0.002 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (จากข้อ 3.5.2.3 ก) มาอ่านค่าความเข้มข้นของแอมเฟตามินจากกราฟมาตราฐาน และนำค่าที่ได้มาคำนวณความแม่นยำ โดยวิธีที่กล่าวข้างต้น และคำนวณความถูกต้องของวิธีทดลอง (percentage recovery) ดังนี้

การคำนวณค่าความถูกต้องของวิธีทดลอง

สมมุติความเข้มข้นของแอมเฟตามินในปัสสาวะคนปกติที่อ่านได้จากกราฟมาตราฐาน เท่ากับ x มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ความเข้มข้นของแอมเฟตามินในปัสสาวะที่เติมแอมเฟตามิน 0.002 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (จากข้อ 3.1.6 หน้า 18) 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 เท่ากับร้อยละ $\frac{100y}{x+0.002}$

3.5.2.4 <u>การศึกษาอิทธิพลของการตกตะกอนโปรตีนต่อการวิเคราะห์แอมเฟตามิน</u>

ทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธี 3.5.2.3 ก แต่ก่อนสกัดนำสารละลายดังกล่าวมาตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Monforte, Bath และ Sunshine (1972) คือนำสารละลายต่าง ๆ ชนิดละ 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (จากข้อ 3.1.10 หน้า 19) 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จึงนำส่วนใสที่ได้ไปใช้ในการ

สกัดเตรียมอนุพันธ์และวิเคราะห์อนุพันธ์ที่ได้ (ตามวิธี ข้อ 3.3 , 3.4 และ 3.5.2.3 หน้า 20 และ 21 ตามลำดับ)

3.5.3 วิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

3.5.3.1 การศึกษาตามวิธีที่บริษัทแนะนำ

ผสมสารต่าง ๆ ดังตารางข้างล่างนี้ คือ

ตารางที่ 2 รายละเอียดการทำ ราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ เพื่อศึกษาตามวิธีที่บริษัทแนะนำ

สารละลาย	หลอดทดลองและปริมาตร (ไมโครลิตร)		
	แบลงค์	ศูนย์	มาตราฐาน
แอมเฟตามินมาตราฐาน (15.6–1000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จากข้อ 3.1.7 หน้า 18)	–	–	100
แอมเฟตามินติดฉลาก	200	200	200
แอนติบอดี	–	200	200
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1 หน้า 17)	300	100	–

ทิ้งสารละลายที่ผสมเข้ากันดีแล้วไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียสค้างคืน (18 ถึง 24 ชั่วโมง) แล้วเติมแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว (สารสำเร็จรูปจากบริษัท) 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้นาน 30 นาที แล้วปั่นแยกตะกอน (bound form) ออกจากน้ำใส (free form) ด้วยอัตราเร็ว 5500 รอบต่อนาที นำแต่ละส่วนไปนับรังสีด้วย Automatic Gamma Counter คำนวณหาร้อยละของการรวมตัว (% bound = $\frac{\text{bound}}{\text{bound + free}} \times 100$) และนำไปเขียนกราฟมาตราฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการรวมตัวและความเข้มข้นของแอมเฟตามิน และหาความไวของวิธีวิเคราะห์ (ข้อ 3.5.3.5 ก หน้า 29)

3.5.3.2 การศึกษาหารายละเอียดวิธีทำที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แอมเฟตามินในปัสสาวะ

รายละเอียดของแต่ละการทดลองอาจเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ตามจุดประสงค์ของการทดลองนั้น ๆ แต่หลักเกณฑ์โดยทั่วไป คือ ผสมสารต่าง ๆ ให้ตรงกับจุดประสงค์ที่จะศึกษา คือ

ก. ปริมาณแอนติบอดีเหมาะสม

ข. อิทธิพลของปริมาณของสารติดฉลาก

ค. อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการตกตะกอน

ง. อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ตั้งสารละลายเหล่านี้ไว้ที่อุณหภูมิและเวลาที่เลือกมาศึกษา เติมแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวตั้งไว้ที่อุณหภูมิและเวลาที่เลือกมาศึกษา แล้วปั่นแยกตะกอนออกจากน้ำใสด้วยอัตราเร็ว 5500 รอบต่อนาที นำแต่ละส่วนไปนับรังสีและคำนวณร้อยละของการรวมตัว

ก. <u>การศึกษาหาปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสม</u>

ผสมสารต่าง ๆ ตามปริมาณที่แสดงไว้ในตารางที่ 3 แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับตารางที่ 2 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่าร้อยละของการรวมตัวและปริมาณของแอนติบอดี แล้วเลือกช่วงความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป

<u>ตารางที่ 3</u> รายละเอียดการทำราดิโออิมมิวโนแอสเสย์เพื่อศึกษาหาปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสม

สารละลาย	หลอดทดลองและปริมาณ (ไมโครลิตร)	
	ศูนย์	มาตราฐาน
แอมเฟตามินมาตราฐาน (250 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จากข้อ 3.1.7 หน้า 18)	-	100
แอมเฟตามินติดฉลาก	50	50
สารละลายแอนติบอดี *	200	200
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	250	150

*เจือจางแอนติบอดี แบบอนุกรมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ 0.01 โมลาร์ pH 7.4 ที่มีโซเดียมเอไซด์ 0.1% จนได้แอนติบอดีที่เจือจางเป็น 1/2 1/4 1/8 1/16 1/32 1/64 1/128 1/256 และ 1/612

ข. การศึกษาอิทธิพลของปริมาณแอนติบอดีต่อกราฟมาตราฐาน

ผสมสารต่าง ๆ ตามปริมาณที่แสดงไว้ในตารางที่ 4 โดยใช้แอนติบอดีจากบริษัทที่เจือจาง เป็น 1/2 1/4 และ 1/8 แอมเฟตามินมาตราฐานเข้มข้นระหว่าง 156.3 ถึง 10,000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และสารสกัดฉลากจากบริษัทโดยไม่เจือจาง

เขียนกราฟมาตราฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการรวมตัวและความเข้มข้นของแอมเฟตามิน เปรียบเทียบกราฟมาตราฐานที่ได้จากการใช้แอนติบอดีปริมาณต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 4 รายละเอียดการทำราดิโออิมมิวโนแอสเสย์เพื่อศึกษารายละเอียดวิธีทำที่เหมาะสม

สารละลาย	หลอดทดลองและปริมาตร (ไมโครลิตร)		
	แบลงค์	ศูนย์	มาตราฐาน
แอมเฟตามินมาตราฐาน (15.6-1000 หรือ 156.3-10000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จากข้อ 3.1.7 หน้า 18)	-	-	50
สารละลายแอมเฟตามินสกัดฉลาก *	50	50	50
สารละลายแอนติบอดี **	-	50	50
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	150	100	50

*เจือจางแอมเฟตามินสกัดฉลากสำเร็จรูป แบบอนุกรมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ 0.01 โมลาร์ pH 7.4 ที่มีโซเดียมเอไซด์ 0.1% จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

**เจือจางแอนติบอดีสำเร็จรูปแบบอนุกรมด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ 0.01 โมลาร์ pH 7.4 ที่มีโซเดียมเอไซด์ 0.1% จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

ทิ้งสารละลายที่ผสมเข้ากันดีแล้วไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียสค้างคืน (18 ถึง 24 ชั่วโมง) แล้วเติมแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้นาน 30 นาที แล้วปั่นแยกตะกอนออกจากน้ำใส ด้วยอัตราเร็ว 5500 รอบต่อนาที นำแต่ละส่วนไปนับรังสีและคำนวณหาร้อยละของการรวมตัว

ค. <u>การศึกษาอิทธิพลของปริมาณแอมเฟตามินติดฉลากต่อกราฟมาตราฐาน</u>

ศึกษาตามรายละเอียดที่แสดงไว้ในตารางที่ 4 โดยใช้สารติดฉลากจากบริษัทโดยไม่เจือจางและที่เจือจางเป็น 1/2 สารแอนติบอดีที่เจือจางเป็น 1/2 และแอมเฟตามินมาตราฐานเข้มข้น 156.3 - 10,000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เปรียบเทียบกราฟมาตราฐานที่ได้จากการใช้สารติดฉลากปริมาณต่าง ๆ กัน

ง. <u>การศึกษาอิทธิพลของเวลาและอุณหภูมิต่อการตกตะกอน ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว</u>

ศึกษาในทำนองเดียวกันกับที่แสดงไว้ในตารางที่ 4 แต่ทำการทดลองเฉพาะหลอดทดลองศูนย์และหลอดทดลองแบลงค์ ใช้สารละลายแอมเฟตามินติดฉลาก สารละลายแอนติบอดีที่เจือจางเป็น 1/2 หลังจากเติมแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวแล้ว ทิ้งสารละลายเหล่านี้ไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 10 และ 25 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 5 10 20 30 40 50 และ 60 นาที แล้วจึงปั่นแยกตะกอนออกจากน้ำใส เปรียบเทียบร้อยละของการรวมตัวที่ได้จากหลอดแบลงค์และหลอดทดลองศูนย์

จ. <u>การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ ต่อการรวมตัวของแอมเฟตามินและแอนติบอดี</u>

ศึกษาตามรายละเอียดที่แสดงไว้ในตารางที่ 4 โดยใช้แอนติบอดีที่เจือจางเป็น 1/2 สารติดฉลากจากบริษัทโดยไม่เจือจาง และแอมเฟตามินมาตราฐานเข้มข้น 156.3 ถึง 10,000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร แต่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือประมาณ 10 25 และ 30 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกราฟมาตราฐาน ของการรวมตัวที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

ฉ. <u>การศึกษาอิทธิพลของเวลาต่อการรวมตัวของแอมเฟตามินและแอนติบอดี</u>

ศึกษาตามรายละเอียดที่แสดงไว้ใน ตารางที่ 4 โดยใช้แอนติบอดีที่เจือจางเป็น 1/2 สารติดฉลากจากบริษัทโดยไม่เจือจาง แต่ใช้แอมเฟตามินมาตราฐาน 500 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างกัน คือ 0.5 1 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 และ 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบร้อยละของการรวมตัวที่ได้จากหลอดทดลองศูนย์ และหลอดทดลองมาตราฐาน

3.5.3.3 การศึกษาอิทธิพลของปัสสาวะต่อกราฟมาตราฐาน

ศึกษาโดยใช้ปริมาณสารต่าง ๆ ที่แสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 รายละเอียดการทำราดิโออิมมิวโนแอสเสย์เพื่อศึกษาอิทธิพลของปัสสาวะต่อกราฟมาตราฐาน

สารละลาย	หลอดทดลอง และปริมาตร (ไมโครลิตร)				
	แบลงก์	ศูนย์	มาตราฐาน	อิทธิพลปัสสาวะ	
แอมเฟตามินมาตราฐาน (156.3 ถึง 10,000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติมตร)	-	-	50	50	50
สารแอมเฟตามินติดฉลาก	50	50	50	50	50
สารละลายแอนติบดี (เจือจาง 1/2)	-	50	50	50	50
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	150	100	50	25	-
ปัสสาวะจากคนปกติ (ข้อ 2.4.1 หน้า 16)	-	-	-	25	50

ทำการทดลองต่อไปในทำนองเดียวกับตารางที่ 4 เขียนกราฟมาตราฐานและเปรียบเทียบกราฟมาตราฐานของแอมเฟตามินเมื่อไม่มี และเมื่อมีปัสสาวะ 25 และ 50 ไมโครลิตร

3.5.3.4 การศึกษาการวิเคราะห์แอมเฟตามีน

ศึกษาการวิเคราะห์แอมเฟตามีน 2 ระดับ คือ ระดับต่ำ (15.6 ถึง 1000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) และระดับสูง (156.3 ถึง 10,000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 6 และเปรียบเทียบความเชื่อถือได้ของการวิเคราะห์แอมเฟตามีนทั้งสองระดับตามรายละเอียดในข้อ 3.5.3.5

ตารางที่ 6 รายละเอียดการทำราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ เพื่อศึกษาการวิเคราะห์แอมเฟตามีน

สารละลาย	หลอดทดลอง และปริมาตร (ไมโครลิตร)			
	แบลงค์	ศูนย์	มาตราฐาน	ปัสสาวะตัวอย่าง
แอมเฟตามีนมาตราฐาน (15.6 ถึง 1000 หรือ 156.3 ถึง 10000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	-	-	50	50
แอมเฟตามีนติดฉลาก	50	50	50	50
สารละลายแอนติบอดี (เจือจาง 1/2)	-	50	50	50
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (จากข้อ 3.1.1 หน้า 17)	150	100	-	50
ปัสสาวะตัวอย่าง (จากข้อ 2.4.2 หน้า 16)	-	-	-	50
ปัสสาวะคนปกติ (จากข้อ 2.4.1 หน้า 16)	-	-	50	-

ทิ้งสารละลายที่ผสมเข้ากันดีแล้วไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียสค้างคืน (18 ถึง 24 ชั่วโมง) แล้วเติมแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวทิ้งไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 10 นาที แล้วปั่นแยกตะกอนออกจากน้ำใสด้วยอัตราเร็ว 5500 รอบต่อนาที นำแต่ละส่วนไปนับรังสี คำนวณหาร้อยละของการรวมตัว เขียนกราฟมาตราฐานของแอมเฟตามีน นำค่าร้อยละของการรวมตัวของปัสสาวะตัวอย่างมาอ่านค่าความเข้มข้นของแอมเฟตามีนในปัสสาวะตัวอย่างจากกราฟมาตราฐาน

3.5.3.5 การทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์

ก. ความไวของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาความไวของวิธีวิเคราะห์ตามวิธีของ Abraham (1974) โดยคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานที่จุดที่ไม่มีความเข้มข้นของสารละลายมาตราฐาน หาระดับความเชื่อถือได้ร้อยละ 90 ที่จุดนี้ว่ามีความเข้มข้นเท่าใด ความเข้มข้นที่ได้จะเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่อ่านได้จากกราฟมาตราฐาน หรือความไวของวิธีวิเคราะห์ดังรูปที่ 5 หน้า 30

ข. ความจำเพาะของแอนติบอดี

ศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดี โดยการทดสอบร้อยละของปฏิกิริยาข้ามชนิด (Cross reaction) ตามวิธีของ Abraham และคณะ (1970) โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับหลอดทดลองมาตราฐานในตารางที่ 6 หน้า 28 แต่ใช้สารที่ต้องการทดสอบความจำเพาะ (จากข้อ 3.1.8 หน้า 18) แทนแอมเฟตามินมาตราฐาน และคำนวณหาร้อยละของปฏิกิริยาข้ามชนิดดังรูปที่ 6 หน้า 31

เมื่อ x เท่ากับปริมาณของแอมเฟตามินที่สามารถแย่งจับกับแอนติบอดีแล้ว ให้ร้อยละของการรวมตัวเท่ากับร้อยละ 50 ของกราฟมาตราฐานแอมเฟตามิน

y เท่ากับปริมาณของสารชนิด ก. ที่สามารถแย่งชันจับกับแอนติบอดีแล้วให้ร้อยละของการรวมตัวเท่ากับร้อยละ 50 ของกราฟมาตราฐานแอมเฟตามินดังนั้น

ร้อยละของปฏิกิริยาข้ามชนิดของสาร ก เท่ากับ $100 \frac{x}{y}$

ค. ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ 2วิธี คือ

1. ความแม่นยำในการทดลองเดียวกัน (Within assay precision)

ศึกษาโดยวิธีวิเคราะห์แอมเฟตามินที่เตรียมให้มีความเข้มข้นระดับต่างๆคือ 25 50 100 200 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และ 500 1000 2000 3000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (วิธีการข้อ 3.1.7 หน้า 18) อ่านความเข้มข้นของสารละลายแอมเฟตามินจากกราฟมาตราฐานที่ใช้แอมเฟตามินมาตราฐานเข้มข้น 15.6 - 1,000 และ 156.3 - 10,000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ การวัดความเข้มข้นของแอมเฟตามินที่เตรียมไว้ แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำกันความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่าง แล้วคำนวณหาค่าความแม่นยำโดยใช้ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

2. ความแม่นยำระหว่าง การทดลอง (Between assay precision)

ทำการทดลองแต่ละครั้งตามรายละเอียดที่กล่าวใน ข้อ 1 และทำการทดลองซ้ำกันรวม 3 ครั้ง

รูปที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตส่วนเพิ่มของปัจจัย X กับผลรวมของผลิตภัณฑ์ส่วนเพิ่มของปัจจัย X

รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกับค่าการนำไฟฟ้าสมมูล

ง. ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ศึกษาความถูกต้องของวิธีโดยทำการทดลองทำนองเดียวกับข้อ 3.5.3.5 ค แล้วนำปริมาณแอมเฟตามีนที่วัดได้มาคำนวณร้อยละของความถูกต้อง ดังนี้

ความเข้มข้นของแอมเฟตามีน x นาโนกรัมต่อลบ.ซม. วัดได้ y นาโนกรัมต่อลบ.ซม.

" " 100 นาโนกรัมต่อลบ.ซม. วัดได้ $100\frac{y}{x}$ นาโนกรัมต่อลบ.ซม.

ความถูกต้องของการวิเคราะห์แอมเฟตามีน (% recovery) เท่ากับ $100\frac{y}{x}$

3.5.3.6 การวิเคราะห์แอมเฟตามีนในปัสสาวะตัวอย่างจากอาสาสมัคร

วิเคราะห์แอมเฟตามีนในปัสสาวะตัวอย่างที่ได้จากอาสาสมัคร 5 ราย ที่รับประทานแอมเฟตามีนซัลเฟต 5 มิลลิกรัม เก็บปัสสาวะเป็นช่วง ๆ ละ 5 ชั่วโมง นาน 60 ถึง 80 ชั่วโมง (ข้อ 2.4.2 หน้า 16) โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.5.3.4 หน้า 28

3.5.3.7 การควบคุมคุณภาพของวิธีวิเคราะห์

เพื่อควบคุมคุณภาพของผลการวิเคราะห์ตามวิธีของ Challand, Goldie และ London (1973) ได้วัดปริมาณแอมเฟตามีนที่มีความเข้มข้น 500 1000 2000 และ 3000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (จากข้อ 3.1.7 หน้า 18) ไปพร้อม ๆ กับการวัดปริมาณแอมเฟตามีนในการทดลองทุกครั้ง (ตามวิธีการ ข้อ 3.5.3.4 หน้า 28)