

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

การวิเคราะห์สารต้องห้ามกลุ่ม ยาปิดกั้นบีตา, อะแนบออลิกลสเตอรอยด์ และ ยาขับปัสสาวะ โดยใช้เทคนิค LC/MS มีดังนี้

ผลของ cone voltage ต่อการแตกตัวของสารต้องห้ามชนิดต่าง ๆ

เนื่องจากเทคนิค LC/MS ที่ใช้แหล่งกำเนิดไอออนแบบ APCI เป็นเทคนิคที่ทำให้สารกลายเป็นไอออนแบบไม่รุนแรงจึงทำให้สารเกิดการแตกตัวไม่มาก โดยทั่วไปจะปรากฏพีคของไอออนที่มีมวลเท่ากับมวลโมเลกุล + 1 เนื่องจากกลไกของการทำให้เกิดไอออนของเทคนิคนี้ใช้ corona discharge electrode ซึ่งมีความต่างศักย์สูงประมาณ 3,000 โวลต์ ทำให้วัฏภาคเคลื่อนที่กลายเป็นไอออนแล้วจึงเกิดกระบวนการถ่ายเทโปรตรอนมายังสารตัวอย่างจึงทำให้สารตัวอย่างมีประจุบวกโดยมีโปรตรอนเพิ่มขึ้น 1 ตัว จึงก่อให้เกิดพีคที่มีมวลเท่ากับมวลโมเลกุล + 1 การแตกตัวของสารส่วนใหญ่มักเกิดจาก cone voltage หากวิเคราะห์โดยใช้ cone voltage สูงจะทำให้เกิดการแตกตัวมากจึงต้องทำการศึกษาการแตกตัวของสารที่ cone voltage ต่าง ๆ ก่อนที่จะดำเนินการทดลองขั้นต่อนอื่น และยังสามารถนำลักษณะการแตกตัวของสารที่ cone voltage ต่าง ๆ มาใช้ในการตรวจยืนยันอีกด้วย

จากการศึกษาการแตกตัวของสารต้องห้ามกลุ่ม ยาปิดกั้นบีตา, อะแนบออลิกลสเตอรอยด์ และ ยาขับปัสสาวะ ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ ได้ผลดังนี้

สารต้องห้ามกลุ่มยาปิดกั้นบีตา

สารต้องห้ามกลุ่มยาปิดกั้นบีตาทุกตัวสามารถเห็นพีคของมวลโมเลกุล + 1 ได้ชัดเจนกว่าพีคอื่น ๆ เนื่องจากโมเลกุลมีความเสถียรมาก ด้วยเหตุนี้จึงเลือกไอออนที่มีมวลเท่ากับมวลโมเลกุล + 1 สำหรับใช้ในการตรวจหายาปิดกั้นบีตา การแตกตัวของยาปิดกั้นบีตาที่ cone voltage ต่าง ๆ แสดงไว้ในภาพที่ 10 - 17 ยาปิดกั้นบีตาส่วนใหญ่จะไม่เกิดการแตกตัวอย่างชัดเจนที่ cone voltage ต่ำกว่า 50 โวลต์ ยกเว้น Labetalol และ Nadolol ที่เริ่มมีการแตกตัวอย่างชัดเจนที่ 40 และ

50 โวลต์ ตามลำดับ สาเหตุที่สารทั้ง 2 ชนิดนี้แตกตัวได้ง่ายเนื่องจากการแตกตัวเกิดจากการสูญเสีย น้ำออกจากโมเลกุลที่ cone voltage ต่ำ ๆ สามารถตั้งข้อสังเกตได้ว่าสารต้องห้ามกลุ่มยาปิดกั้นบีตาสามารถสูญเสีย น้ำออกจากโมเลกุลได้ง่าย เนื่องจากสามารถพบพิกที่มีมวลลดลงไป 18 Da. ตั้งแต่ที่ cone voltage ต่ำ ๆ สารที่สามารถสังเกตเห็นการสูญเสีย น้ำได้อย่างชัดเจนคือ Acebutolol, Labetalol และ Nadolol ในการตรวจหา ยาปิดกั้นบีตา มีข้อควรระวังคือ Atenolol และ Metoprolol มีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกันคือ 266.3 และ 267.4 Da. ตามลำดับ ซึ่งจะปรากฏพิกของมวลโมเลกุล + 1 คือ พิกของไอออนที่มีมวลเท่ากับ 267 และ 268 Da. ตามลำดับ หากในปัสสาวะมี Atenolol หรือ Metoprolol ทั่วใดตัวหนึ่งจะตรวจพบไอออนที่มีมวลทั้ง 267 และ 268 Da. เนื่องจากมวลของไอออนทั้ง 2 ใกล้เคียงกันมากแต่ความสูงจะต่างกันเท่าใดขึ้นอยู่กับความสามารถในการแยก (Resolution) ของเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ การพิจารณาว่าอาจเป็นยาปิดกั้นบีตาตัวใดให้พิจารณาจากลักษณะการแตกตัวที่ cone voltage ต่าง ๆ

การตรวจยืนยัน ยาปิดกั้นบีตาสามารถทำได้โดยเปลี่ยนค่า cone voltage ไปที่ 80 โวลต์ เพื่อเปรียบเทียบลักษณะของการแตกตัวของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน ไอออนที่เหมาะสม สำหรับการตรวจยืนยันได้สรุปไว้ในตารางที่ 10

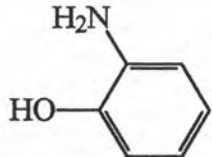
ตารางที่ 10 สรุปไอออนที่ใช้สำหรับการตรวจยืนยัน ยาปิดกั้นบีตาชนิดต่าง ๆ

สาร	ไอออนที่สำคัญ
Acebutolol	337, 260, 222, 116, 98, 71
Alprenolol	250, 132, 107, 91, 72
Atenolol	267, 225, 208, 190, 178, 145, 133, 116, 107, 98, 74, 72
Labetolol	330, 311, 294, 190, 162, 147 91
Metoprolol	268, 217, 195, 158, 131, 129, 114, 85
Nadolol	310, 254, 236, 201, 171, 145
Oxprenolol	266, 225, 116, 72
Propranolol	260, 183, 157, 154, 116, 98, 72

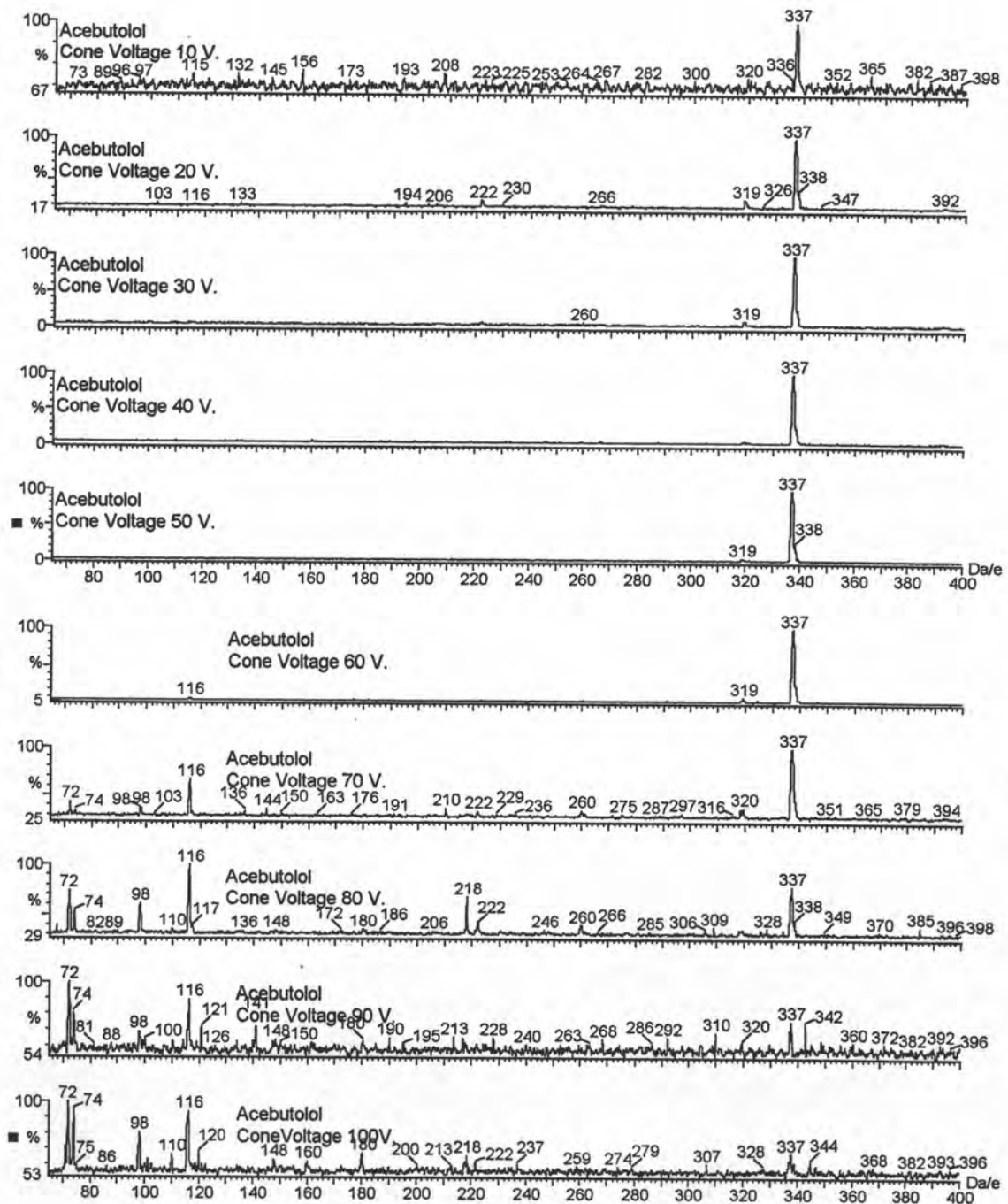
จากการพิจารณาแมสสเปกตรัมประกอบด้วยสูตร โครงสร้างของยาขับปัสสาวะชนิดต่าง ๆ สามารถอธิบายพิกสำคัญ ๆ ที่ปรากฏในแมสสเปกตรัมได้ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 สรุปการแตกตัวของยาปิดกั้นบีตา

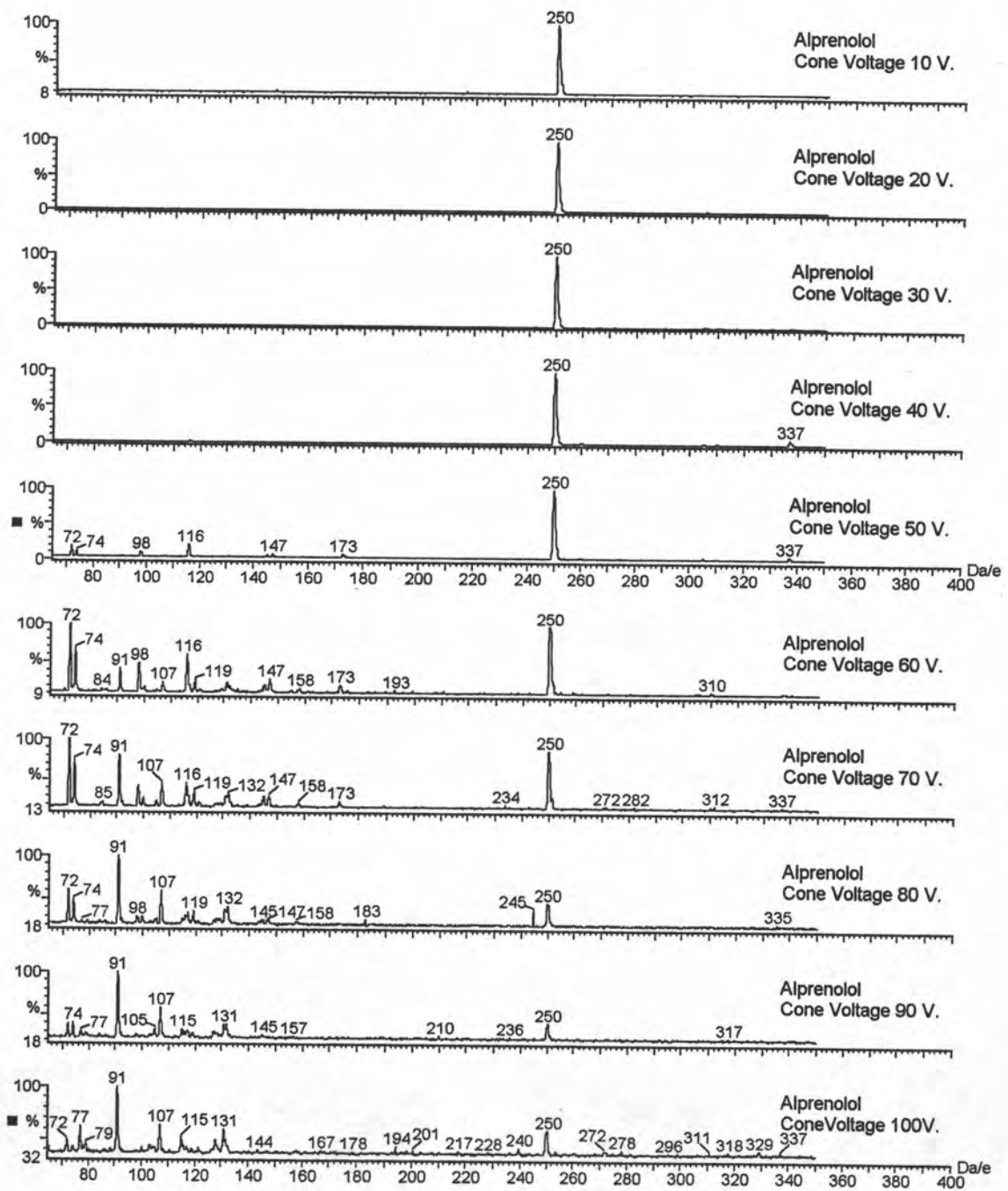
ตารางที่ 11 สรุปการแตกตัวของยาปิดกั้นบีตา

สาร	คู่ของไอออนที่พิจารณา	มวลของไอออน (Da.)	อาจจะเกิดจากโมเลกุลสูญเสียสารประกอบดังนี้
Acebutolol	337 - 319	18	H ₂ O
	319 - 260	59	H ₂ NCH(CH ₃) ₂
	337 - 116	221	CH ₃ (CH ₂) ₂ CONH ₂ และ HOCH ₂ CHOHCH ₂ NHCH(CH ₃) ₂
Alprenolol	250 - 116	134	HOCH ₂ CHOHCH ₂ NHCH(CH ₃) ₂
	249 - 132	117	CH ₃ CHOHCH ₂ NHCH(CH ₃) ₂
Atenolol	267 - 134	133	(CH ₃) ₂ CHNHCH ₂ CHOHCH ₂ OH
	267 - 208	59	CH ₃ CONH ₂
	267 - 225	42	CH ₂ CO
Labetalol	329 - 311	18	H ₂ O
	311 - 294	17	NH ₃
	328 - 191	137	
Metoprolol	268 - 209	59	CH ₃ O(CH ₂) ₂
	268 - 195	73	CH ₃ NHCH(CH ₃) ₂
	268 - 165	103	CH ₂ OHCH ₂ NHCH(CH ₃) ₂
	268 - 136	132	OCH ₂ CHOHCH ₂ NHCH(CH ₃) ₂
Nadolol	310 - 260	50	CH ₃ OH และ H ₂ O
Oxprenolol	266 - 225	41	CH ₂ CHCH ₂
Propranolol	260 - 183	77	NH ₂ CH(CH ₃) ₂
	260 - 128	132	OCH ₂ CHOHCH ₂ NHCH(CH ₃) ₂

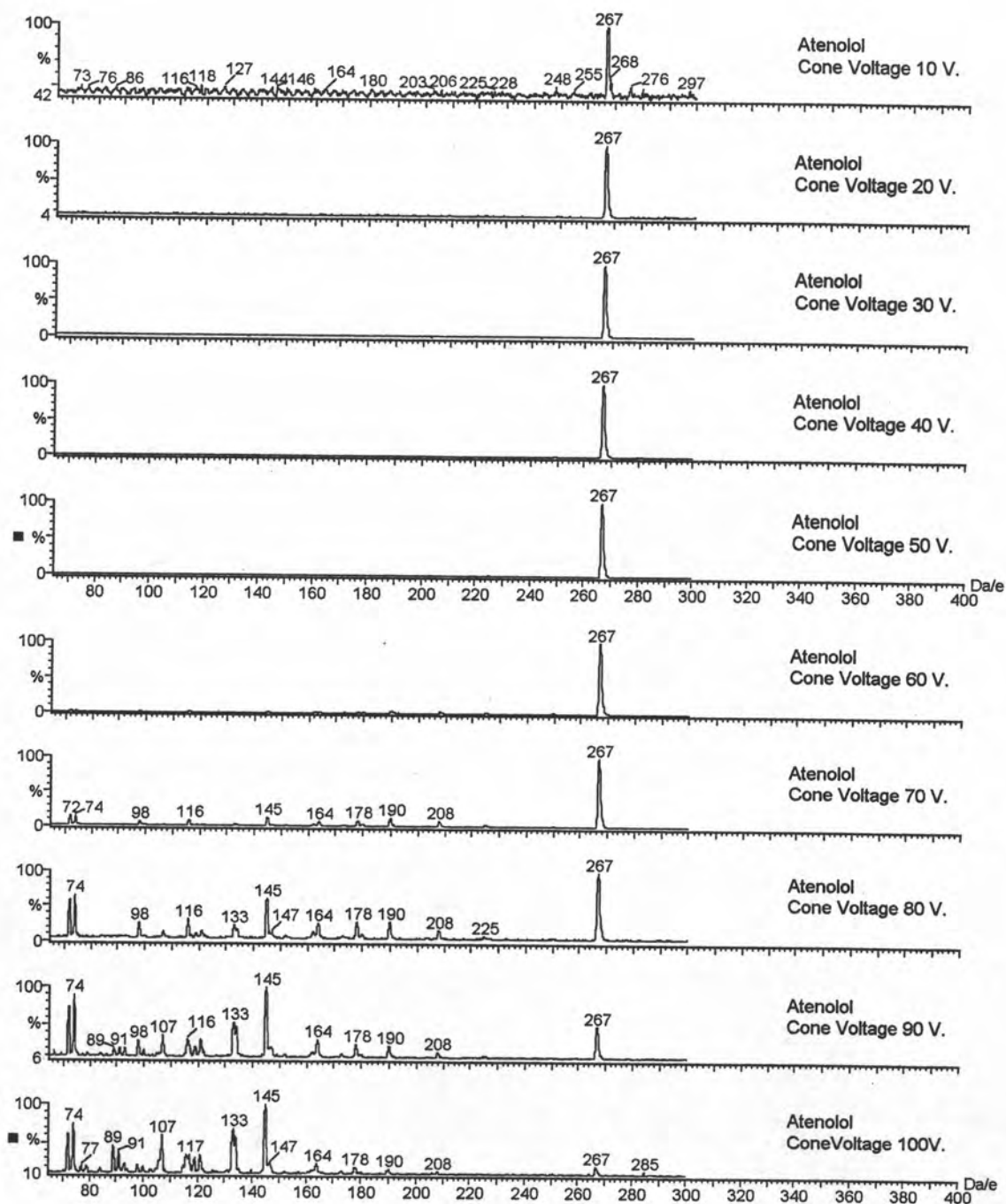
การแตกตัวของยาปิดกั้นชนิดต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 10 - 17



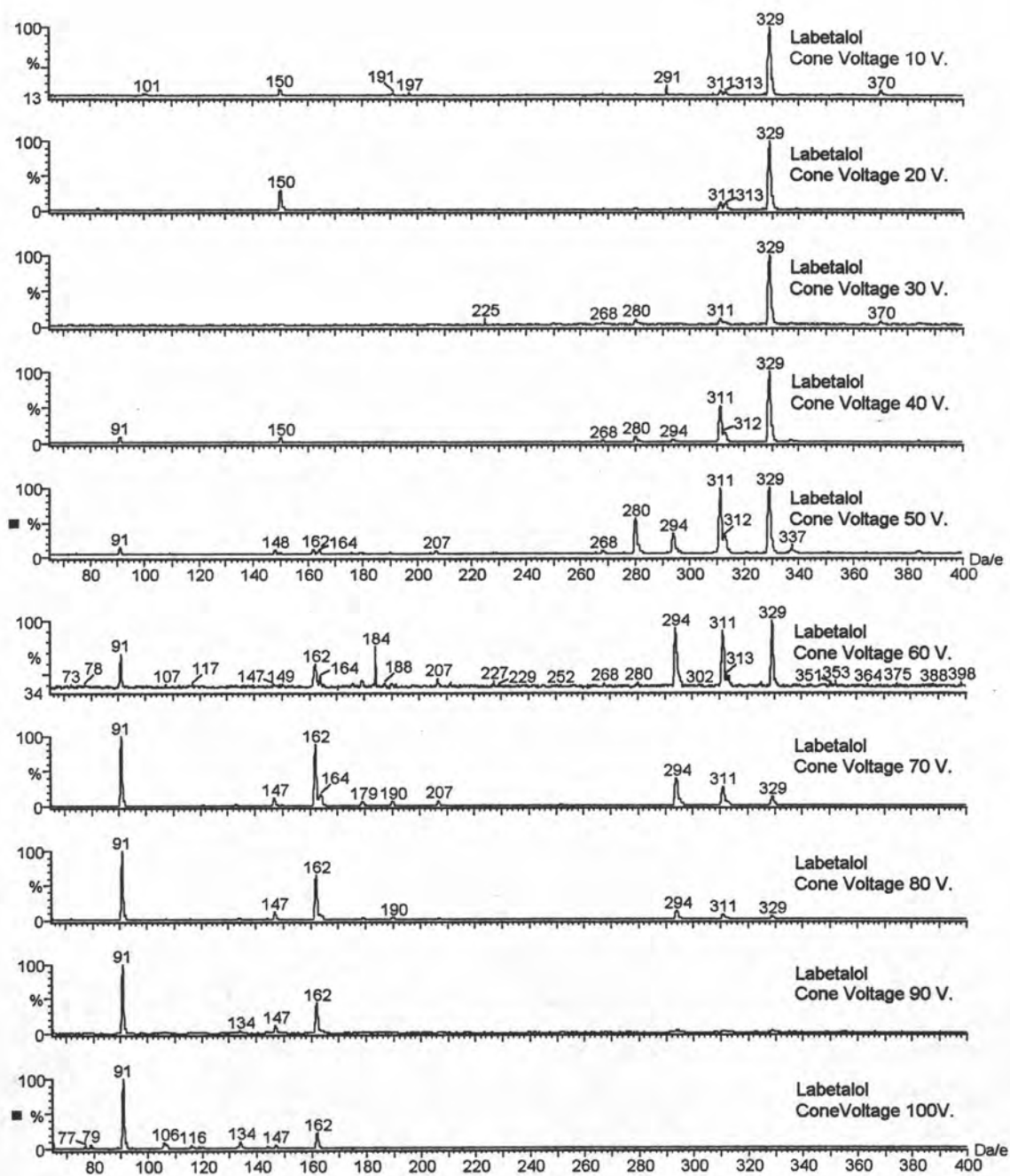
ภาพที่ 10 การแตกตัวของ Acebutolol ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



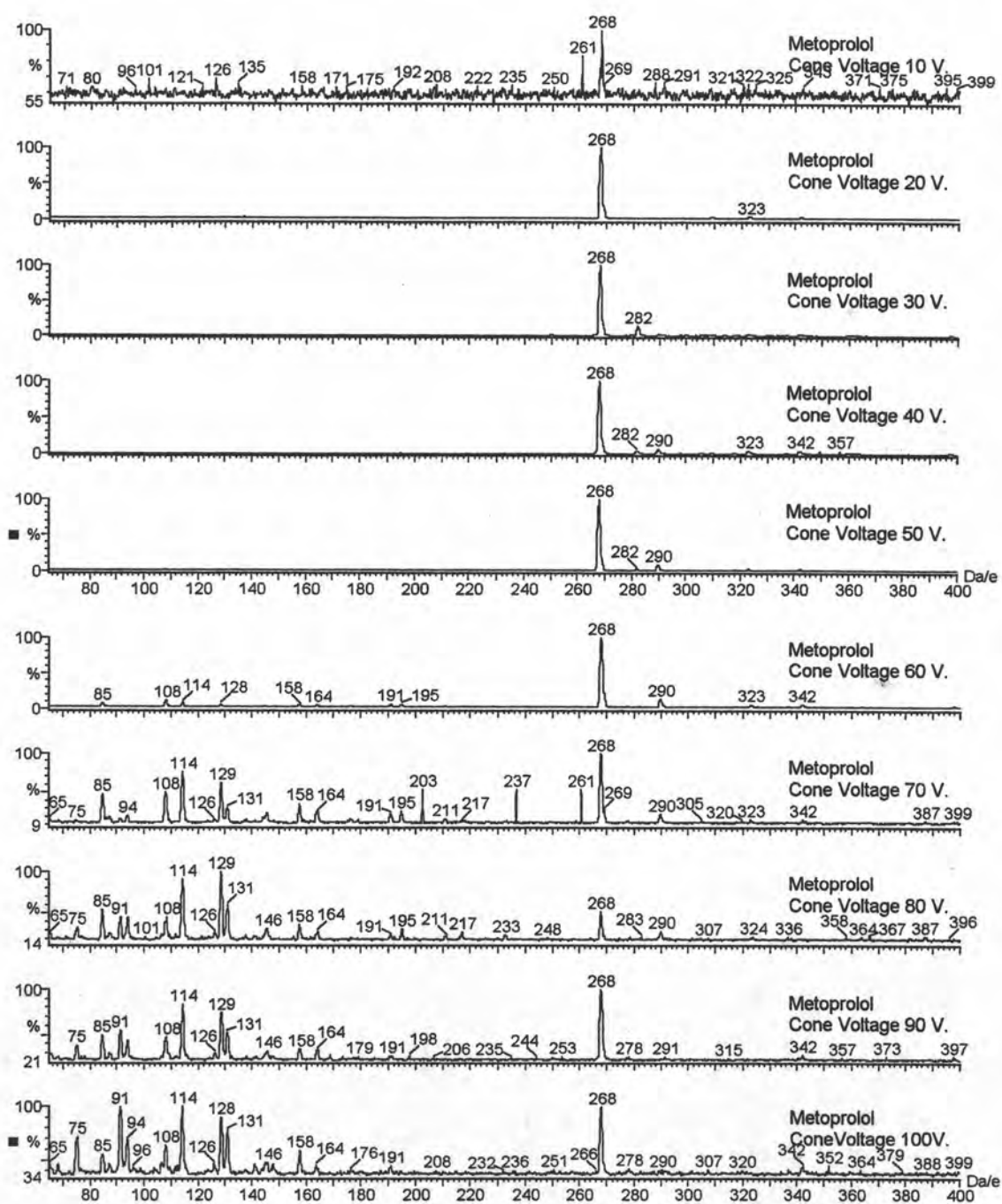
ภาพที่ 11 การแตกตัวของ Alprenolol ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



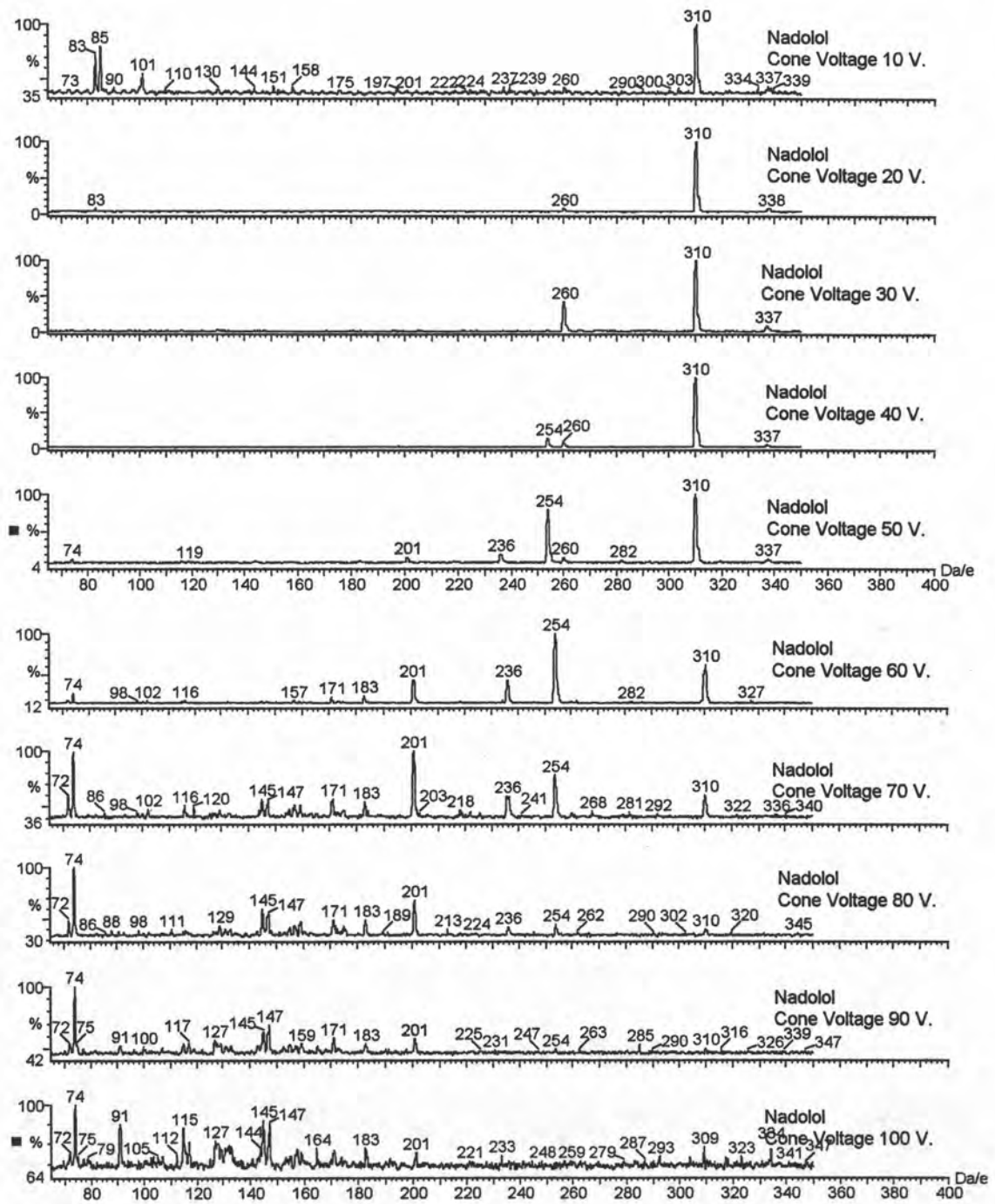
ภาพที่ 12 การแตกตัวของ Atenolol ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



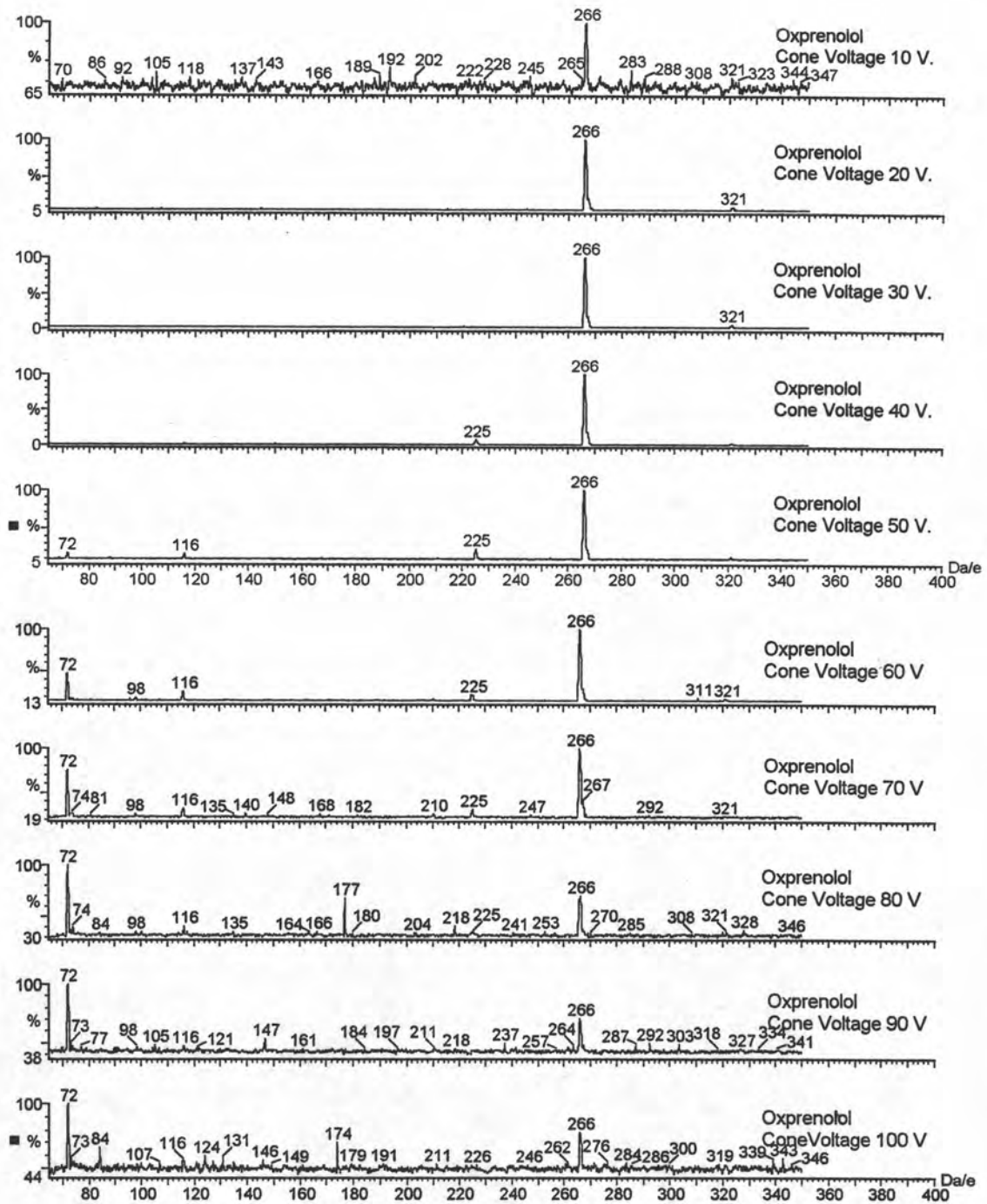
ภาพที่ 13 การแตกตัวของ Labetalol ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



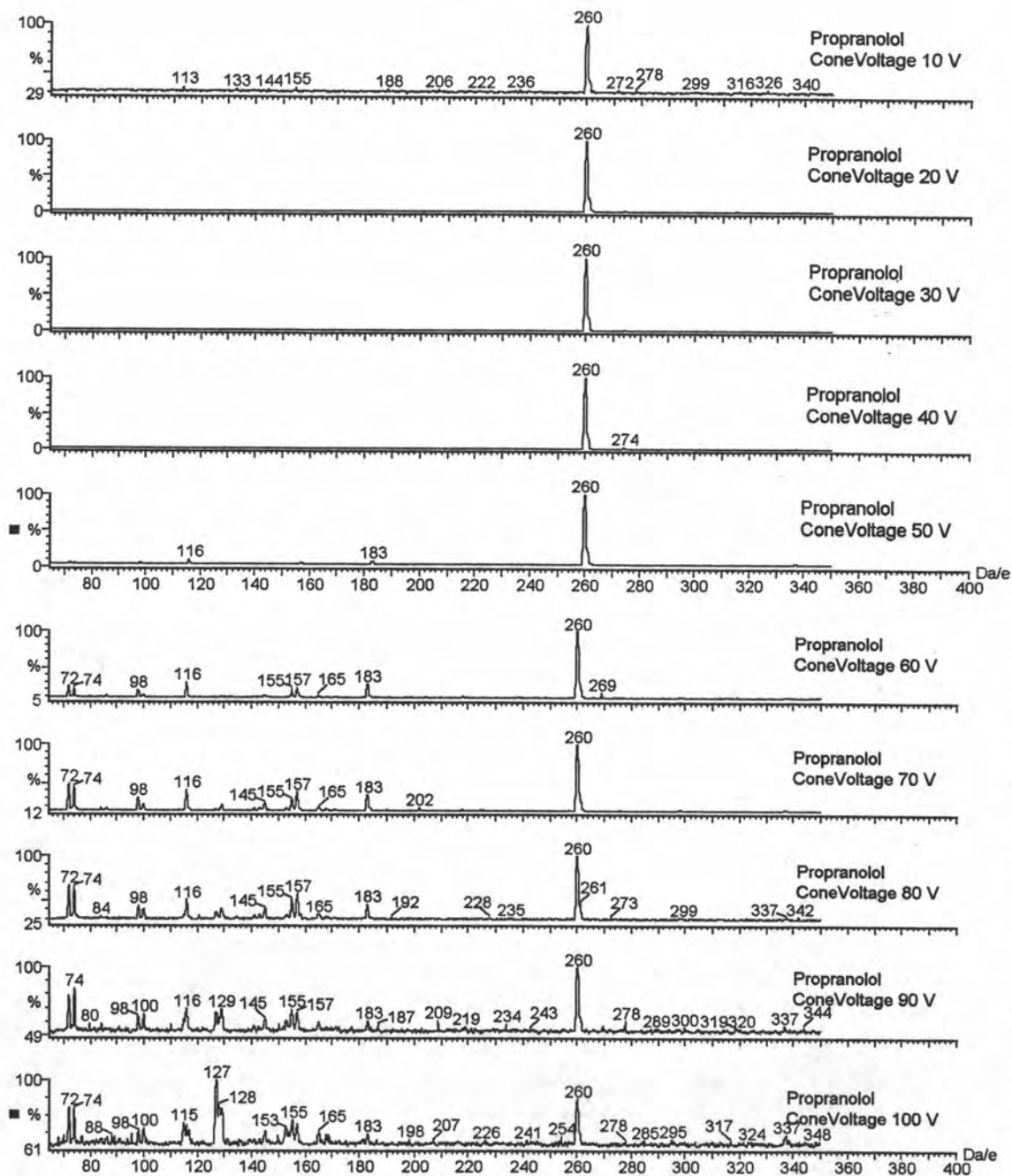
ภาพที่ 14 การแตกตัวของ Metoprolol ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



ภาพที่ 15 การแตกตัวของ Nadolol ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



ภาพที่ 16 การแตกตัวของ Oxprenolol ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



ภาพที่ 17 การแตกตัวของ Propranolol ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ

สารต้องห้ามกลุ่มอะแนบอกลิสเตอรอยด์

สารต้องห้ามกลุ่มอะแนบอกลิสเตอรอยด์มีความเสถียรมากจึงปรากฏพิกที่มีมวลเท่ากับมวลโมเลกุล + 1 ชัดเจนที่สุด ยกเว้น Oxymetholone เพียงชนิดเดียวที่ปรากฏพิกที่มีมวลเท่ากับมวลโมเลกุล + 14 สูงมาก จึงใช้อิออนที่มีมวลเท่ากับมวลโมเลกุล + 1 ในการตรวจหาสารต้องห้ามกลุ่มอะแนบอกลิสเตอรอยด์ ยกเว้น Oxymetholone เพียงชนิดเดียวที่ตรวจหาโดยบันทึกอิออนที่มีมวลเท่ากับมวลโมเลกุล + 14 ซึ่งอาจเกิดจากการสูญเสียน้ำออกจากโมเลกุลแล้วไปรวมกับเมธานอลซึ่งเป็นวิฤภาคเคลื่อนที่แทน การแตกตัวของสารต้องห้ามกลุ่มอะแนบอกลิสเตอรอยด์ที่ cone voltage ต่าง ๆ แสดงไว้ในภาพที่ 1 - 24 โดยทั่วไปอะแนบอกลิสเตอรอยด์เกิดการแตกตัวได้ยากกว่ากลุ่มยาปิดกั้นบีตาโดยเริ่มเกิดการแตกตัวอย่างชัดเจนที่ cone voltage 70 โวลต์ ขึ้นไป และการแตกตัวส่วนใหญ่ของสารกลุ่มอะแนบอกลิสเตอรอยด์จะเกิดจากการสูญเสียน้ำจากโมเลกุล

การตรวจยืนยันสามารถตรวจโดยบันทึกอิออนดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 อิออนที่ใช้สำหรับการตรวจยืนยันอะแนบอกลิสเตอรอยด์

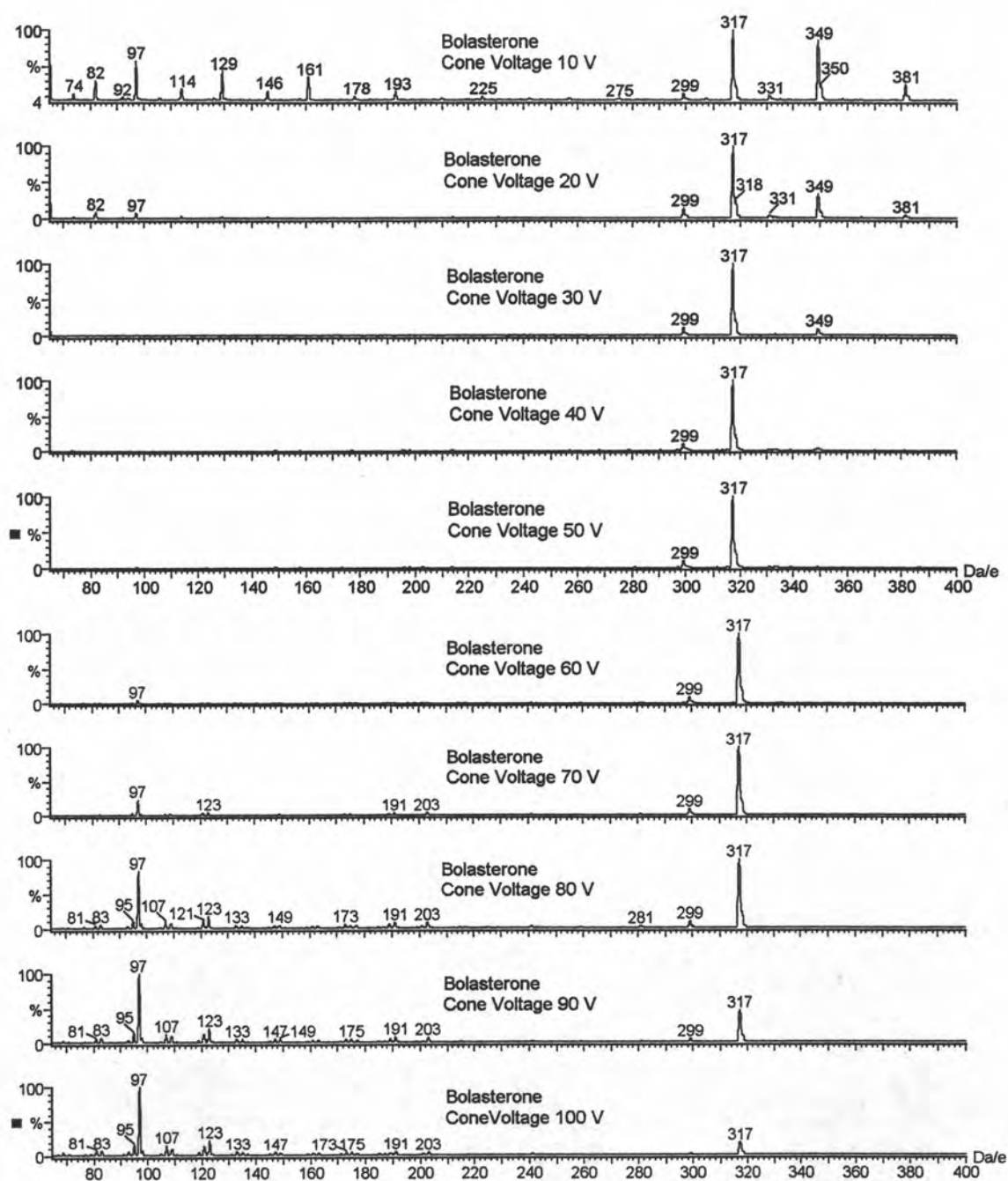
สาร	อิออน
Bolasterone	317, 299, 281, 203, 191, 123, 121, 97
Fluoxymesterone	337, 317, 299, 281, 241, 163, 121
Mesterolone	305, 269, 229, 175, 173, 147, 133, 121, 109, 95
Methyltestosterone	303, 285, 189, 177, 109, 97, 83
Oxymetholone	347, 333, 329, 113, 95
Stanozolol	329, 311
Testosterone propionate	345, 329, 311, 289, 271, 253, 175, 109, 97

เมื่อพิจารณาแมสสเปกตรัมและสูตร โครงสร้างของอะแนบอกลิสเตอรอยด์ชนิดต่าง ๆ สามารถสรุปการแตกตัวได้ดังตารางที่ 13

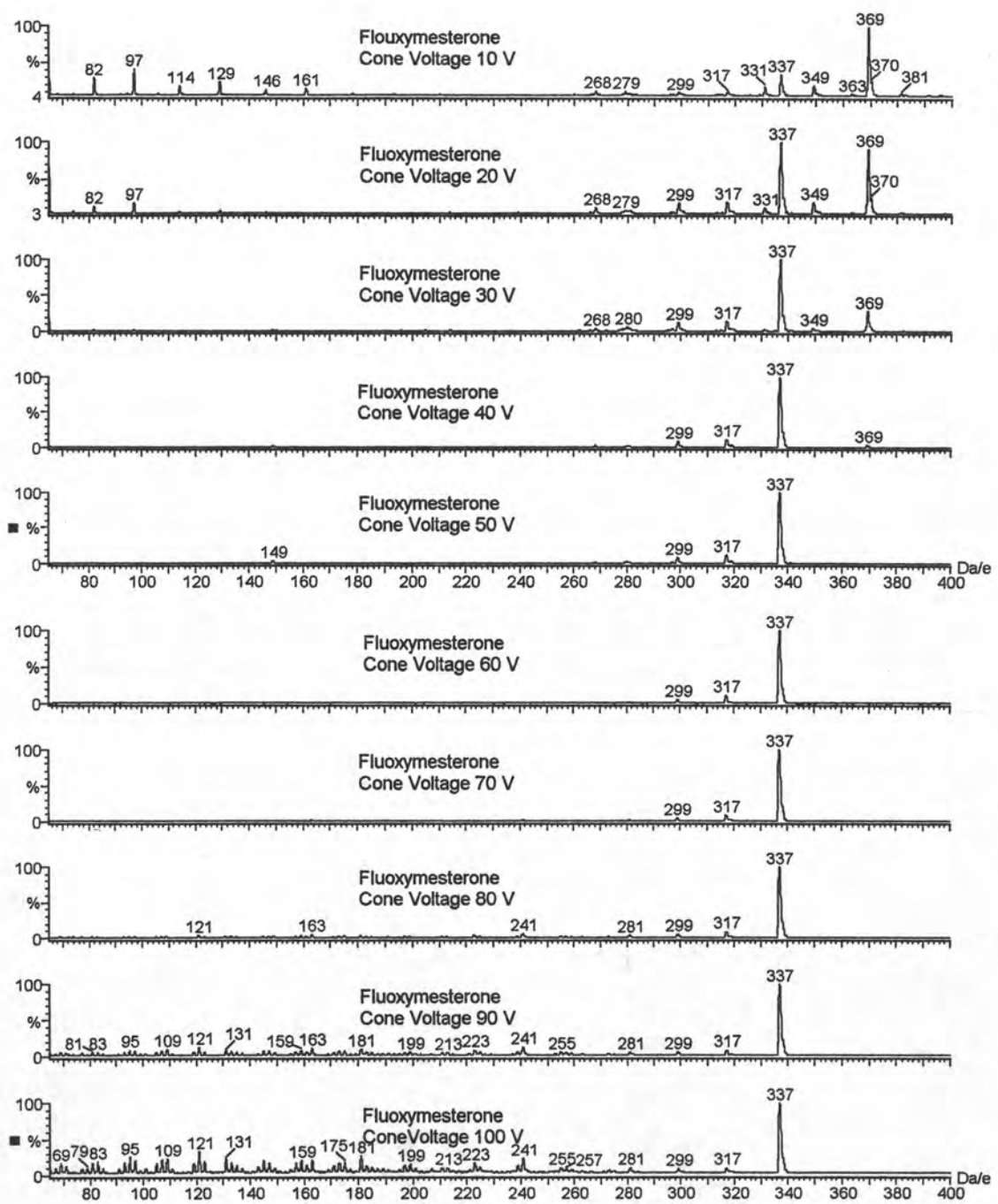
ตารางที่ 13 สรุปการแตกตัวของอะแนบอกลิสเตอรอยด์

สาร	คู่ของไอออนที่พิจารณา	มวลของไอออน (Da.)	อาจจะเกิดจากโมเลกุลสูญเสียน้ำประกอบดังนี้
Bolasterone	317 - 299	18	H ₂ O
Fluoxymesterone	337 - 317	20	HF
	317 - 299	18	H ₂ O
Mesterolone	305 - 287	18	H ₂ O
17A-Methyltestosterone	303 - 285	18	H ₂ O
Oxymetholone	347 - 333	14	CH ₂
	347 - 329	18	H ₂ O
Stanozolol	329 - 311	18	H ₂ O
Testosterone propionate	345 - 271	74	HOCOC ₂ H ₅
	344 - 329	15	CH ₃
	329 - 311	18	H ₂ O

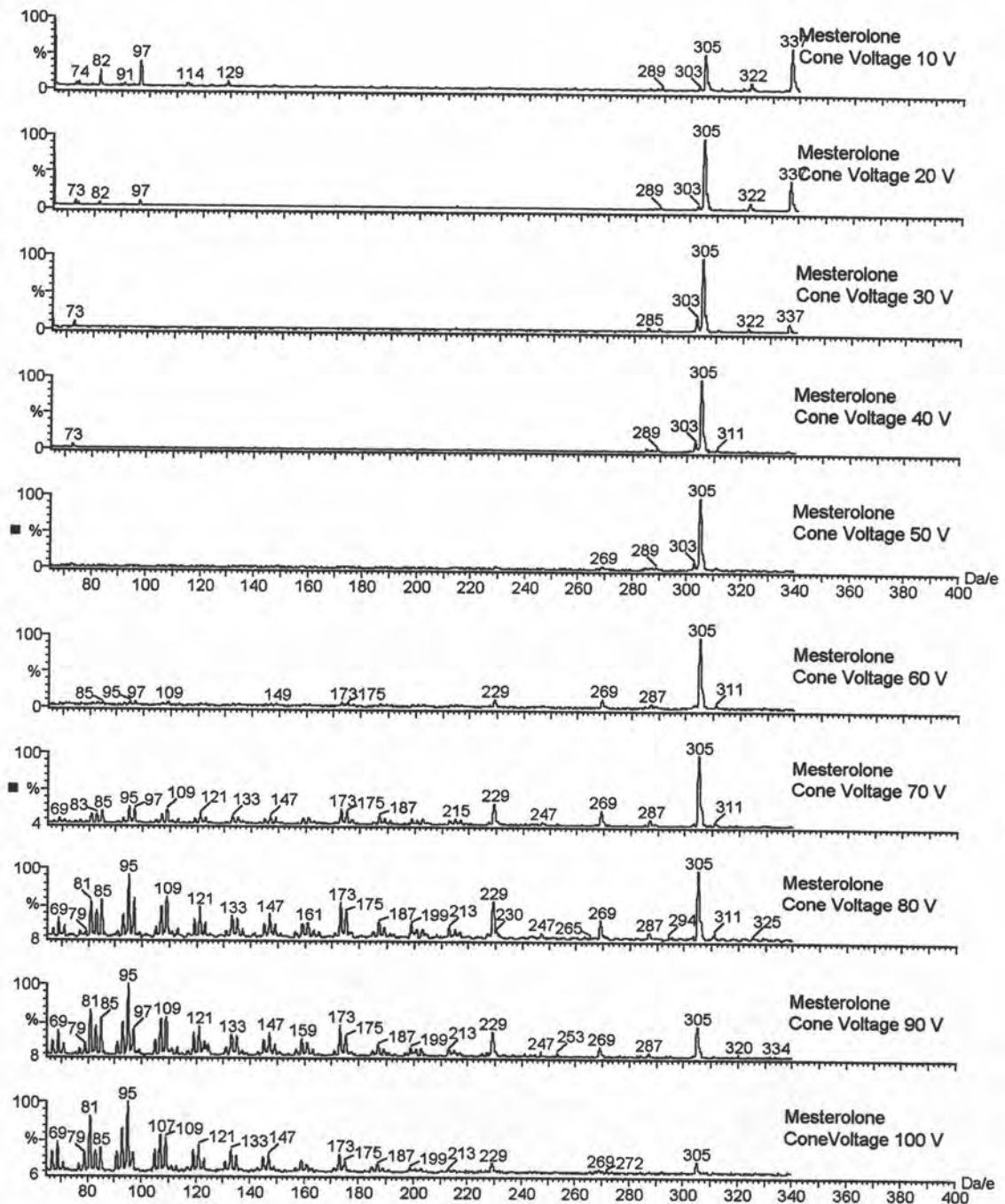
การแตกตัวของอะแนบอกลิสเตอรอยด์แสดงดังภาพที่ 18 - 24



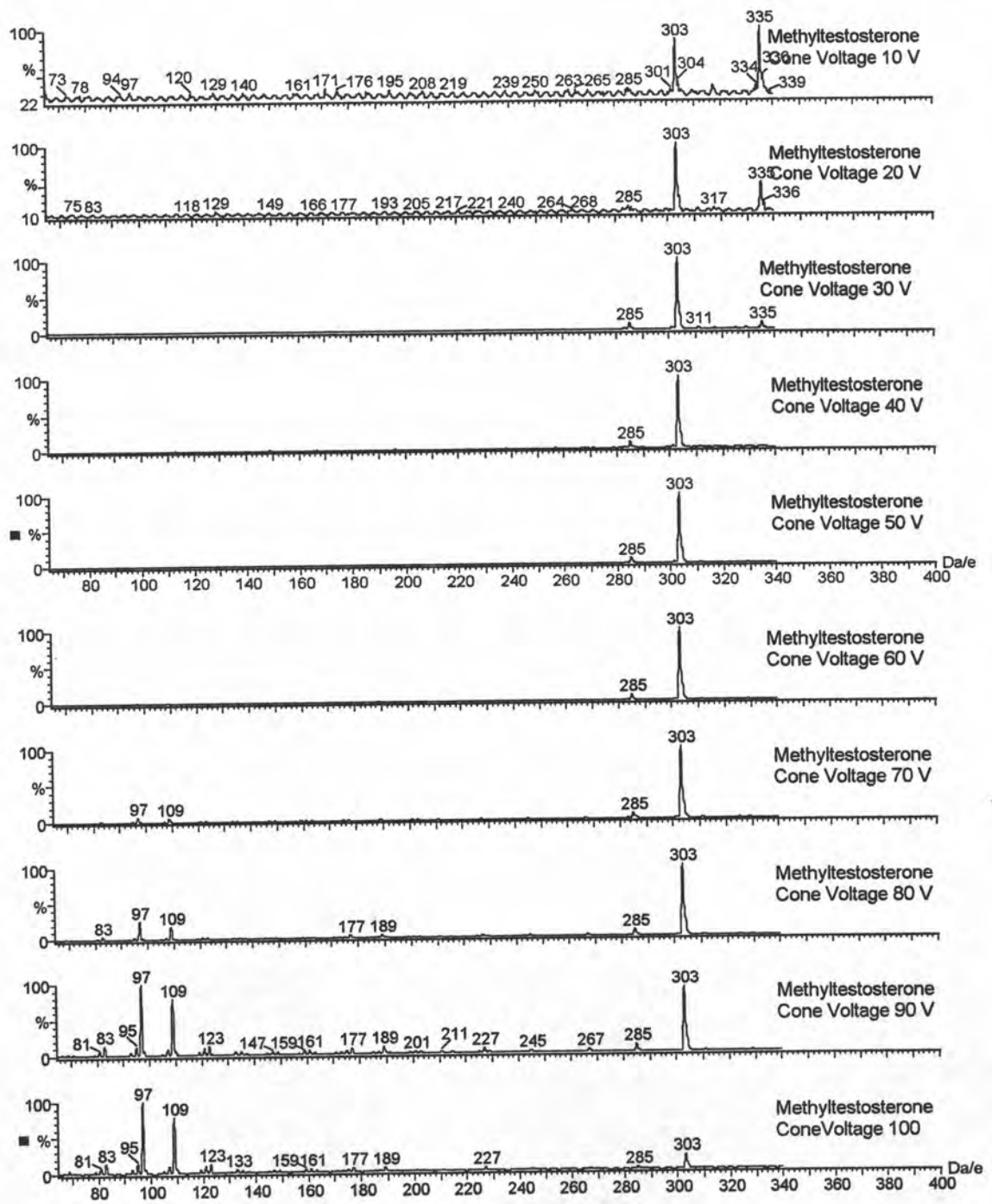
ภาพที่ 18 การแตกตัวของ Bolasterone ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



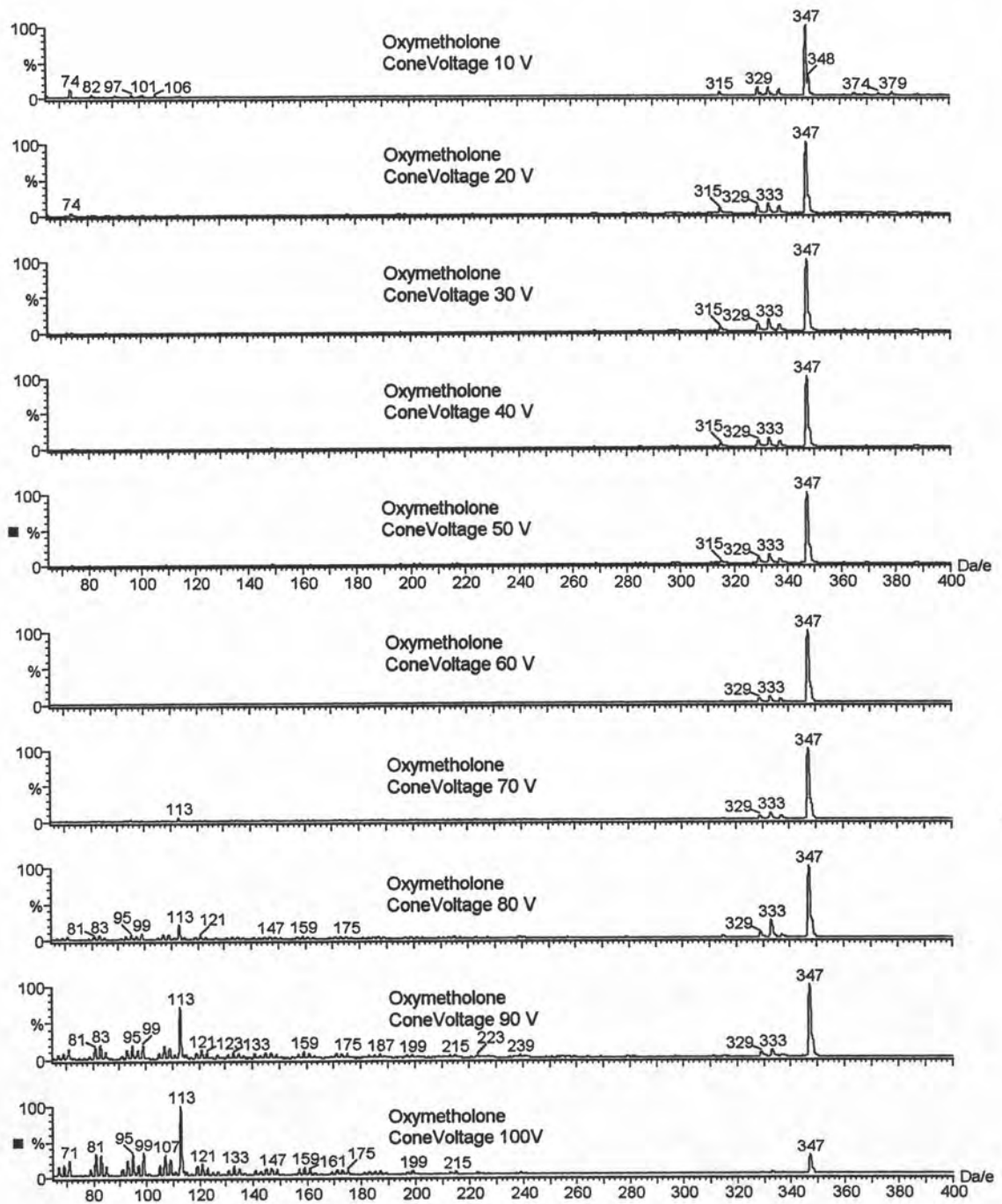
ภาพที่ 19 การแตกตัวของ Fluoxymesterone ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



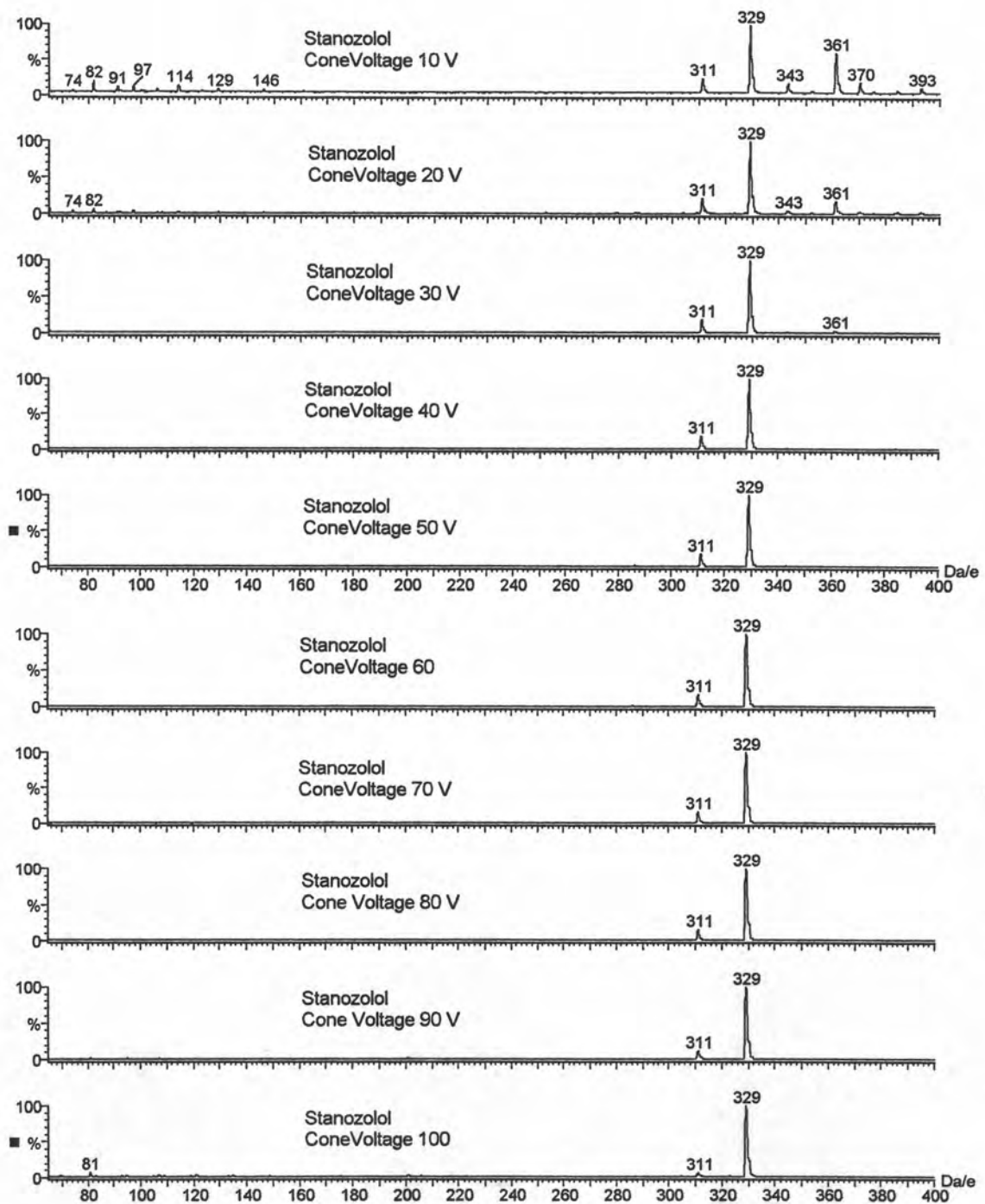
ภาพที่ 20 การแตกตัวของ Mesterolone ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



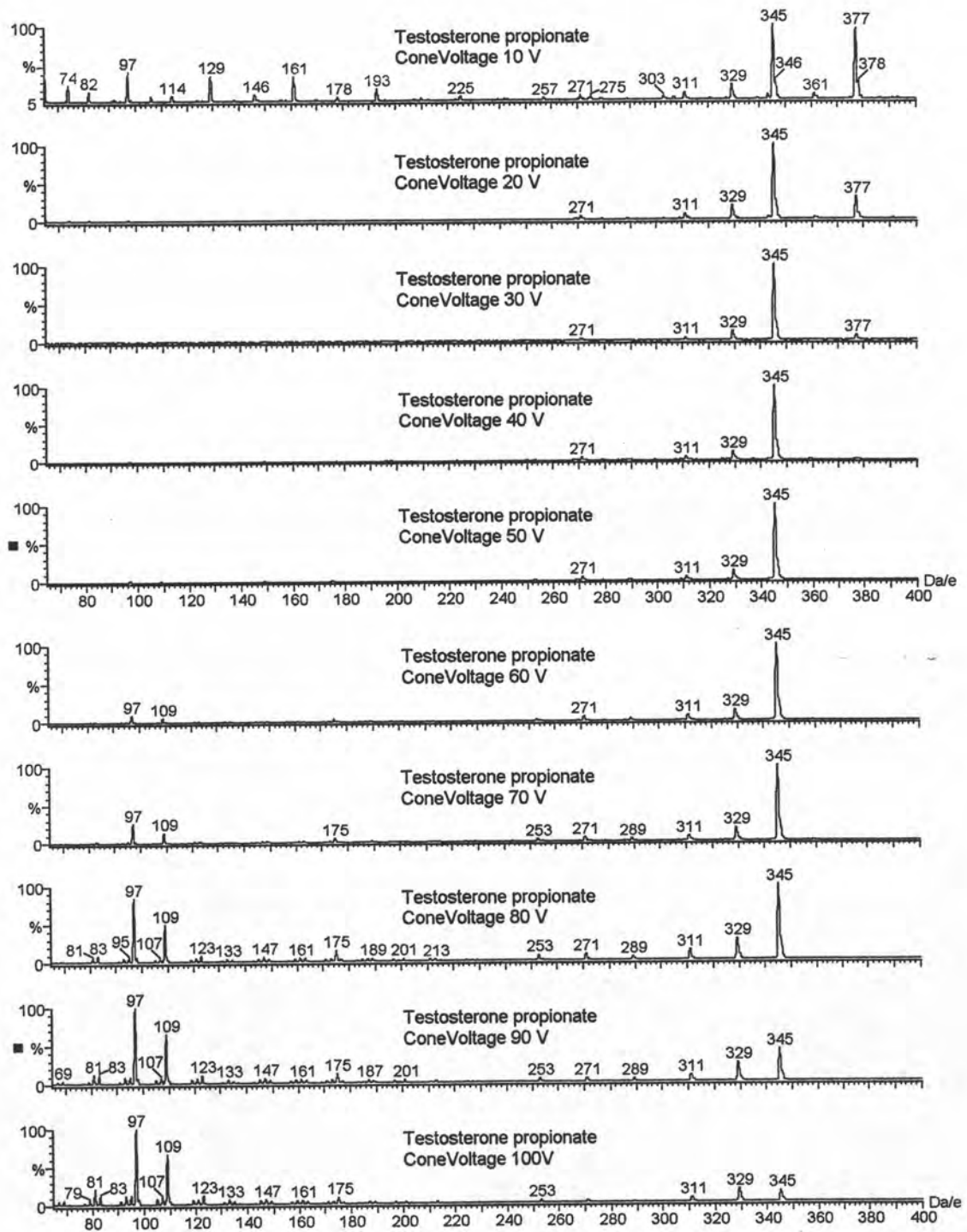
ภาพที่ 21 การแตกตัวของ 17α - Methyltestosterone ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



ภาพที่ 22 การแตกตัวของ Oxymetholone ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



ภาพที่ 23 การแตกตัวของ Stanozolol ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



ภาพที่ 24 การแตกตัวของ Testosterone propionate ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ

สารต้องห้ามกลุ่มยาขับปัสสาวะ

ยาขับปัสสาวะสามารถแตกตัวได้ง่ายที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยาปิดกั้นบีตาและอะแนบอลิกลิสเตอรอยด์ สารทุกชนิดในกลุ่มยาขับปัสสาวะยังสามารถเห็นพีกที่มีมวลเท่ากับมวลโมเลกุล + 1 แต่ Bendroflumethiazide, Benzthiazide, Furosemide และ Spironolactone สามารถเห็นพีกอื่นมีความสูงมากกว่าพีกที่มีมวลเท่ากับมวลโมเลกุล + 1 แสดงว่าโมเลกุลของ ยาขับปัสสาวะเหล่านี้ไม่ค่อยเสถียรเหมือนยาขับปัสสาวะตัวอื่น การแตกตัวของสารต้องห้ามกลุ่มยาขับปัสสาวะที่ cone voltage ต่าง ๆ แสดงไว้ในภาพที่ 25 - 29

เนื่องจากสูตร โครงสร้างของยาขับปัสสาวะมีความซับซ้อนมากการแตกตัวจึงต่างจากยาปิดกั้นบีตา และ อะแนบอลิกลิสเตอรอยด์

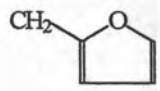
ในการตรวจยืนยันยาขับปัสสาวะควรตรวจสอบไอออนที่มีมวลดังตารางที่ 14

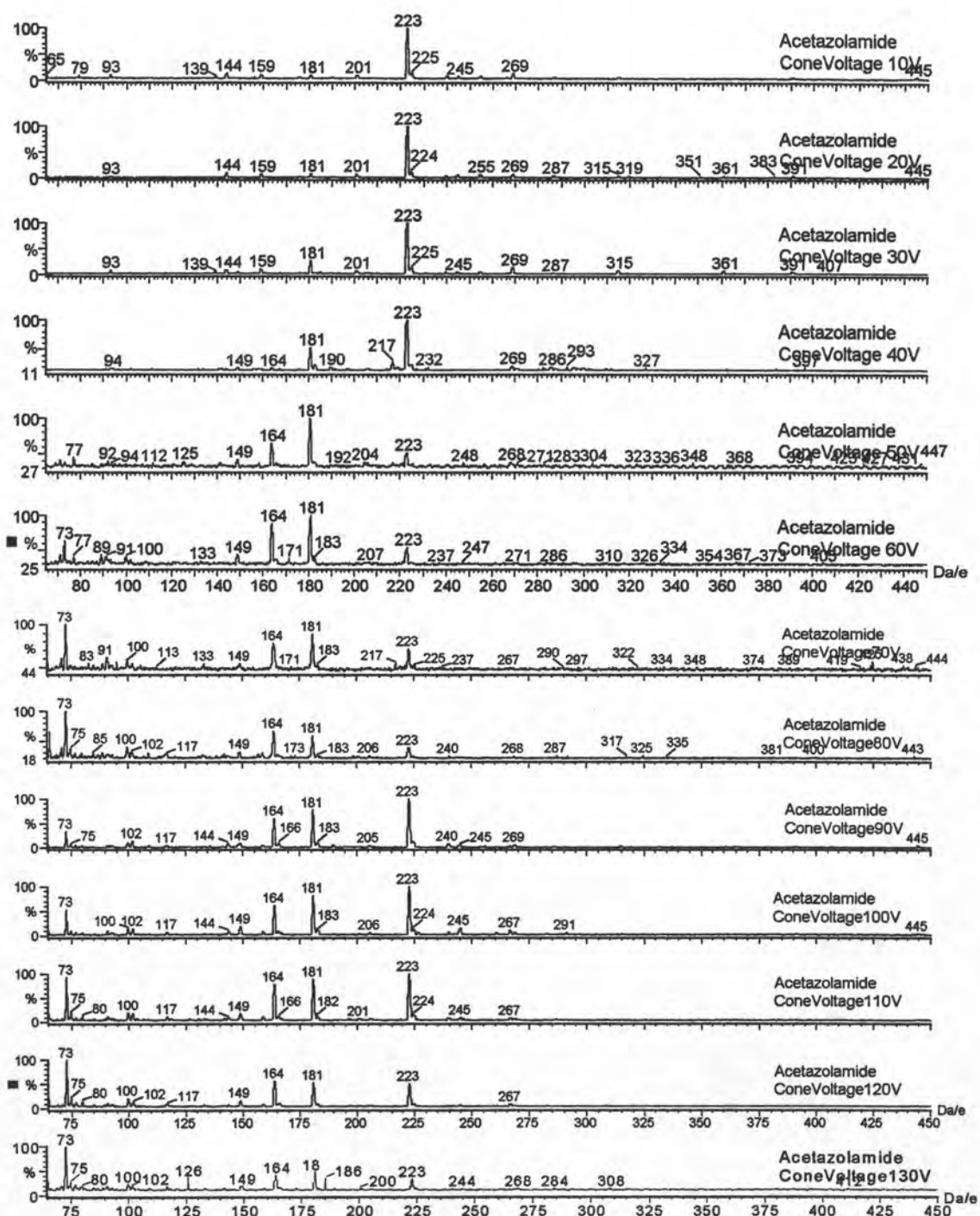
ตารางที่ 14 สรุปไอออนที่ใช้สำหรับตรวจยืนยันยาขับปัสสาวะ

สาร	ไอออน
Acetazolamide	223, 181, 164, 73
Amiloride	276, 230, 212, 170, 143, 116
Bendroflumethiazide	322, 243, 232, 220, 166, 160, 127, 114, 90, 76
Benzthiazide	201, 197, 157, 149, 141, 108, 91, 77
Bumetanide	364, 321, 285, 240, 229, 184, 148, 136
Ethacrynic acid	303, 267, 257, 253, 229, 212, 193, 178
Furosemide	109, 93, 81, 77
Hydrochlorothiazide	315, 298, 283, 281, 269, 233, 221, 205, 77
Spirolactone	341, 187, 107, 97
Triamterene	253, 236, 210, 195, 167, 104

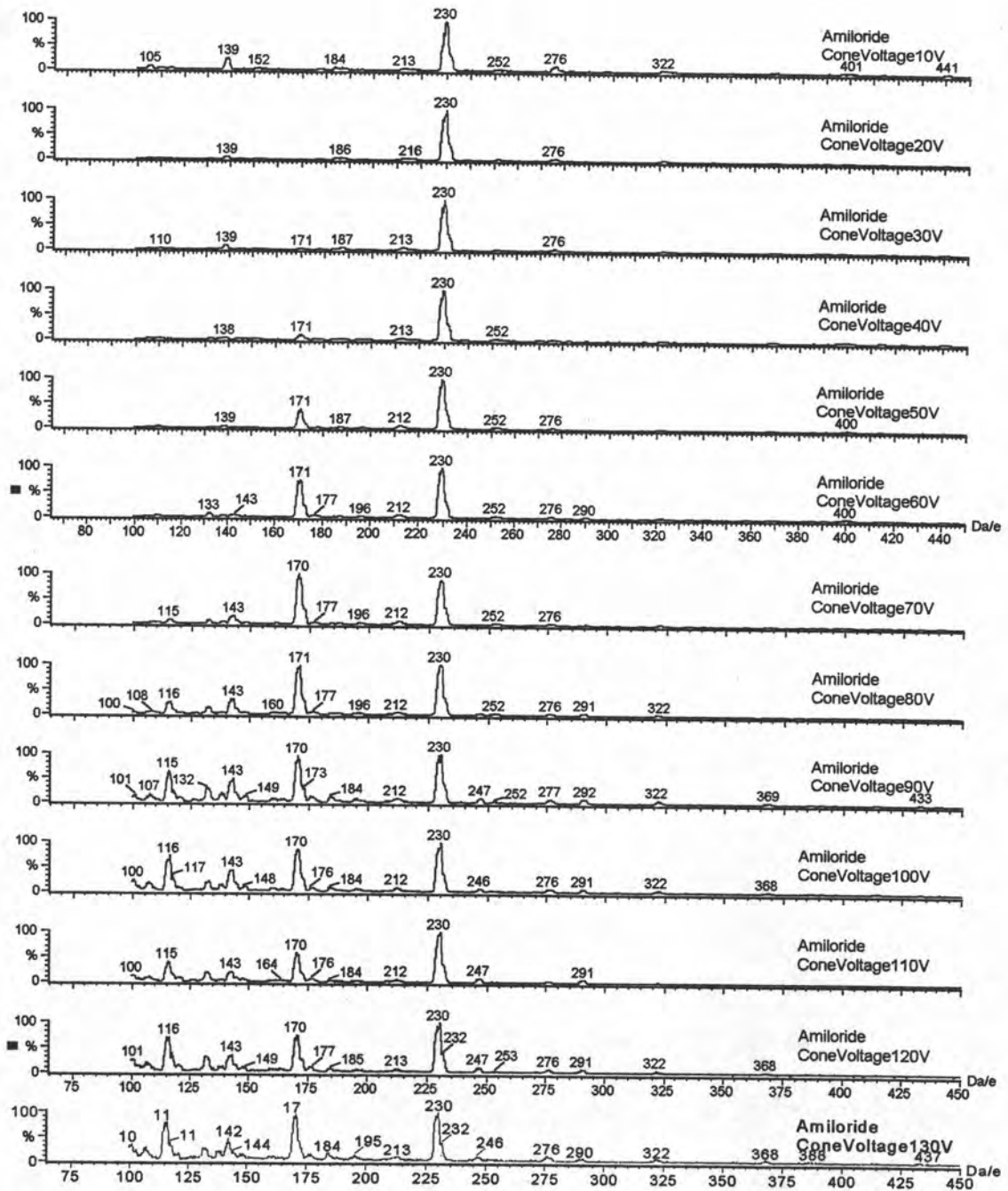
จากการพิจารณาแมสสเปกตรัมเปรียบเทียบกับสูตรโครงสร้างของยาขับปัสสาวะชนิดต่าง ๆ สามารถอธิบายการเกิดพีกสำคัญ ๆ ได้ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 สรุปลการแตกตัวของยาขับปัสสาวะ

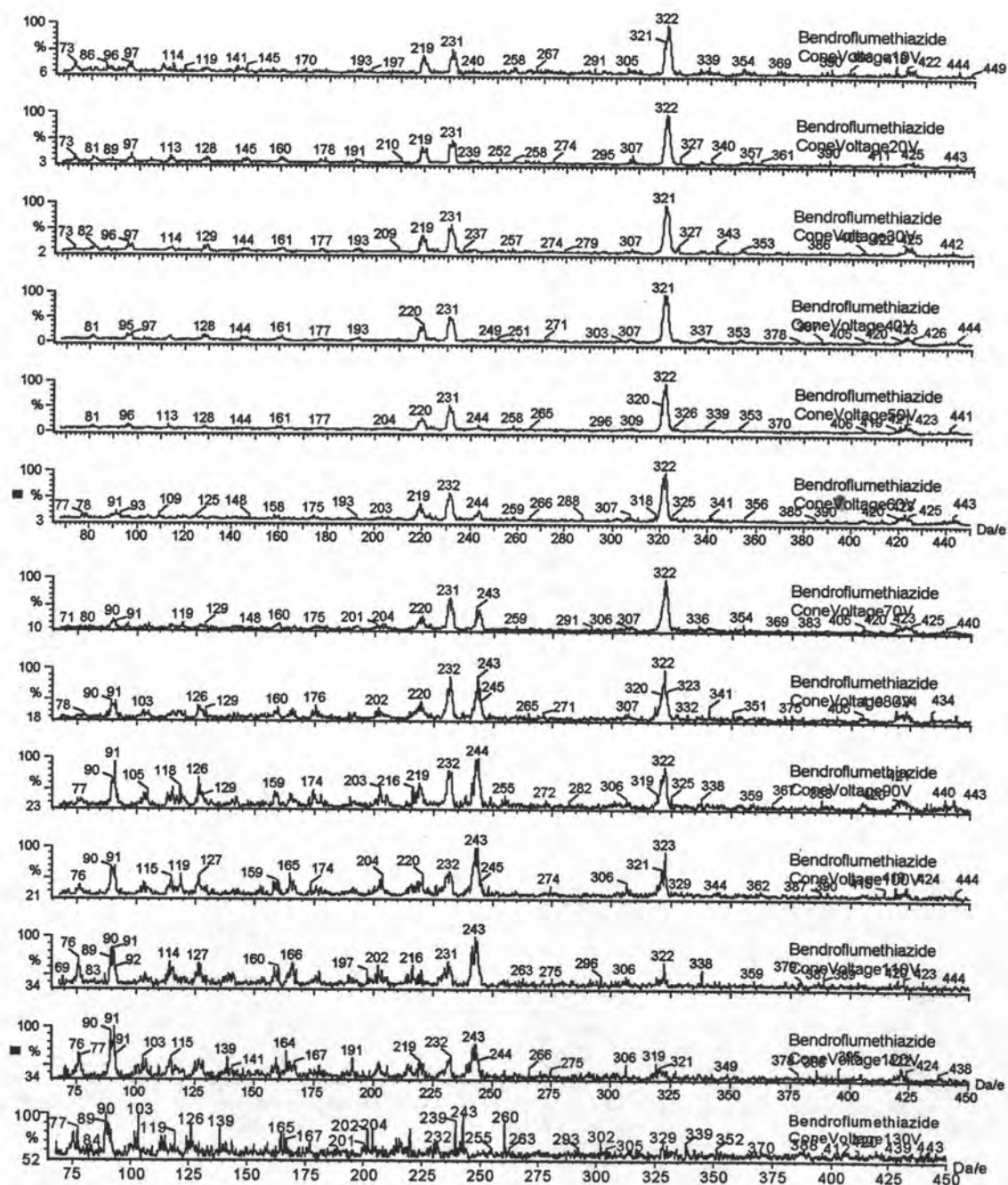
สาร	คู่ของไอออนที่พิจารณา	มวลของไอออน (Da.)	อาจจะเกิดจากโมเลกุลสูญเสียสารประกอบดังนี้
Acetazolamide	223 - 181	42	$\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$
Amiloride	229 - 170	59	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \parallel \\ \text{NH}_2\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$
	229 - 142	87	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \quad \text{NH} \\ \parallel \quad \quad \quad \parallel \\ \text{C}-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$
Bendroflumethiazide	421 - 405	16	NH_2
Benzthiazide	432 - 352	80	NH_2SO_2
	352 - 214	138	$\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$
Bumetanide	365 - 320	45	COOH
	364 - 286	78	C_6H_6
	365 - 285	80	SO_2NH_2
	320 - 240	80	SO_2NH_2
Ethacrynic acid	303 - 257	46	HCOOH
Furosemide	332 - 251	81	
	251 - 216	35	Cl
Hydrochlorothiazide	298 - 217	81	NH_3SO_2
Spironolactone	417 - 341	76	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HS}-\text{C}-\text{CH}_3 \end{array}$
Triamterene	253 - 237	16	NH_2
	210 - 194	16	NH_2



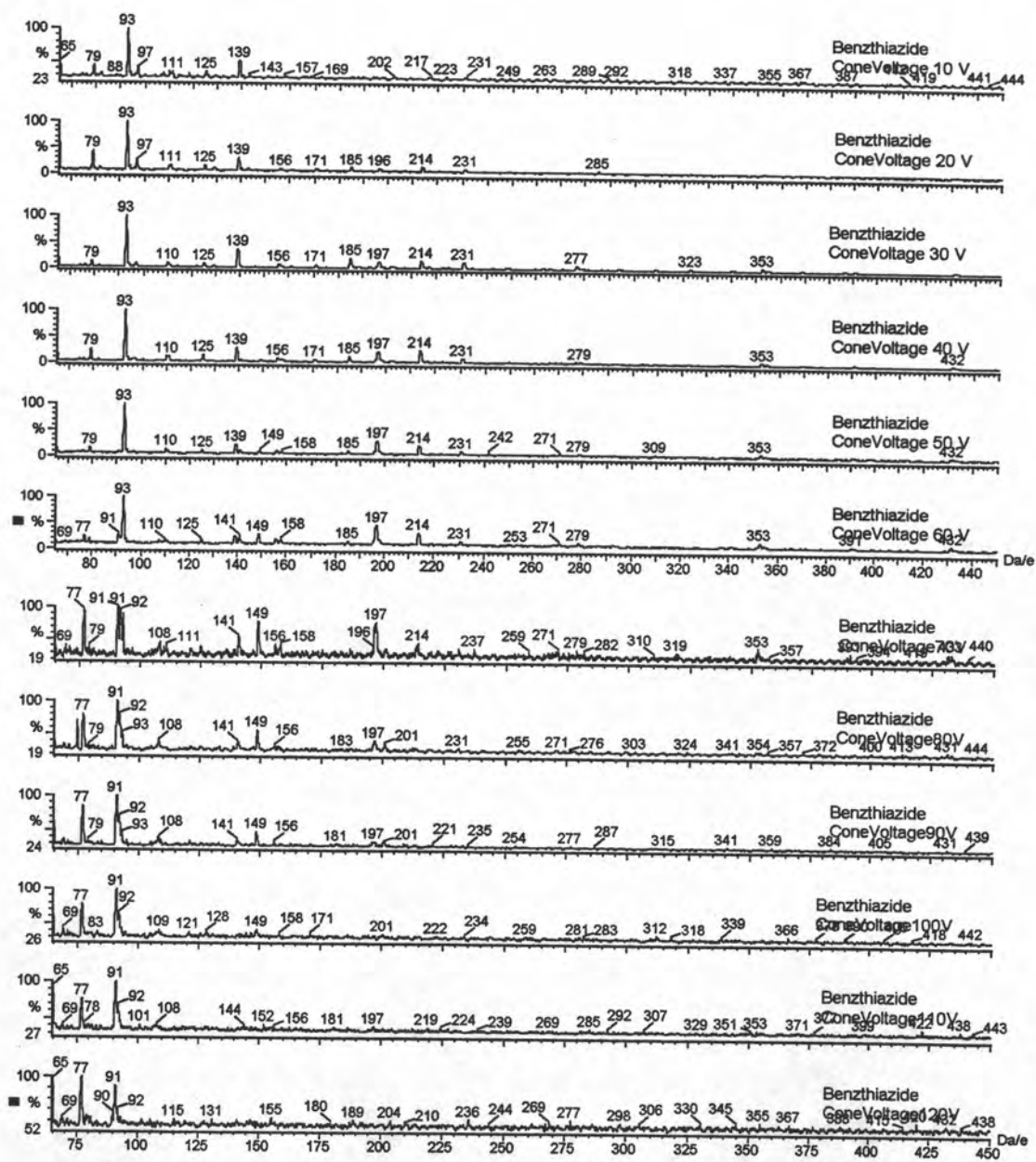
ภาพที่ 25 การแตกตัวของ Acetazolamide ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



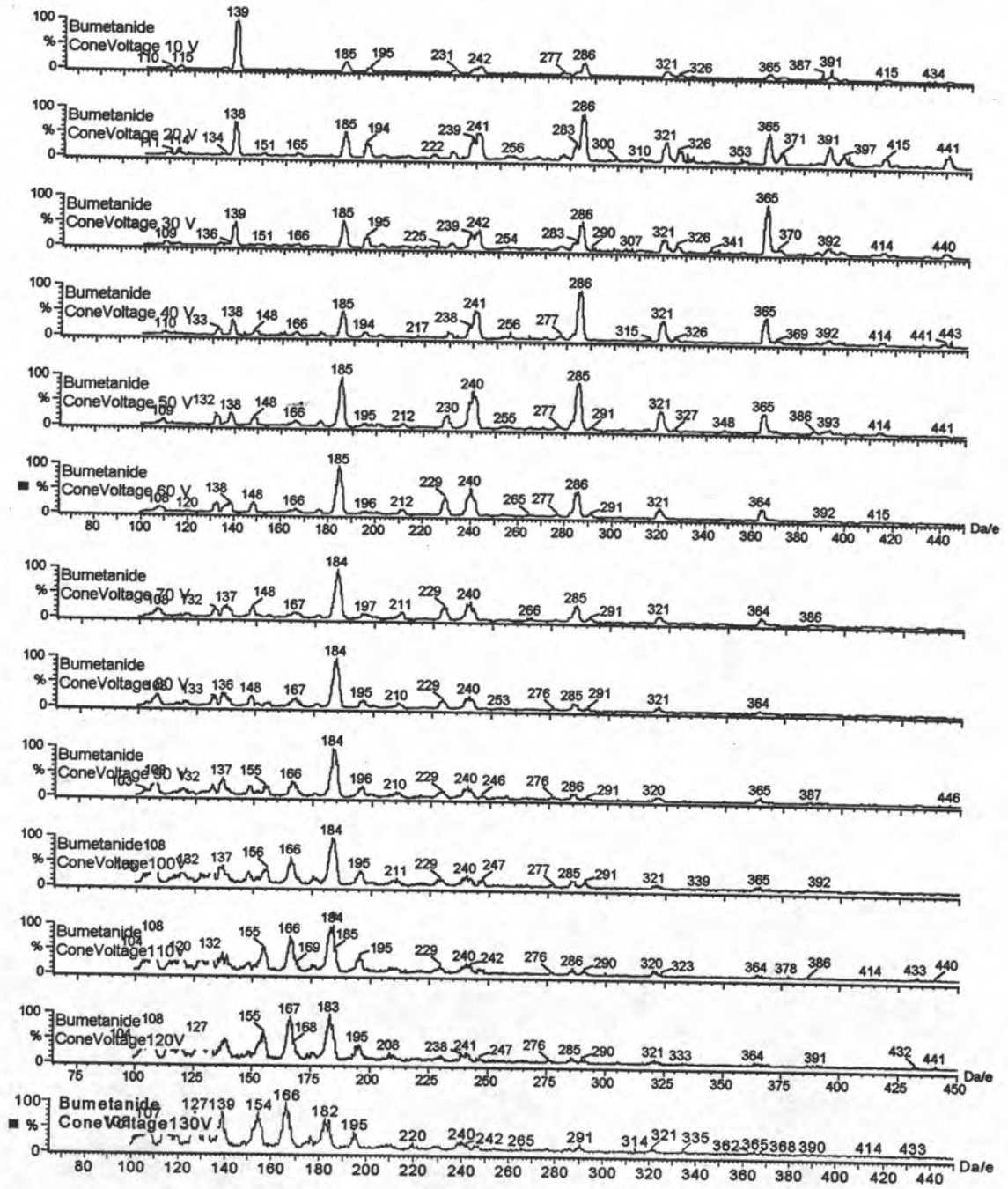
ภาพที่ 26 การแตกตัวของ Amiloride ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



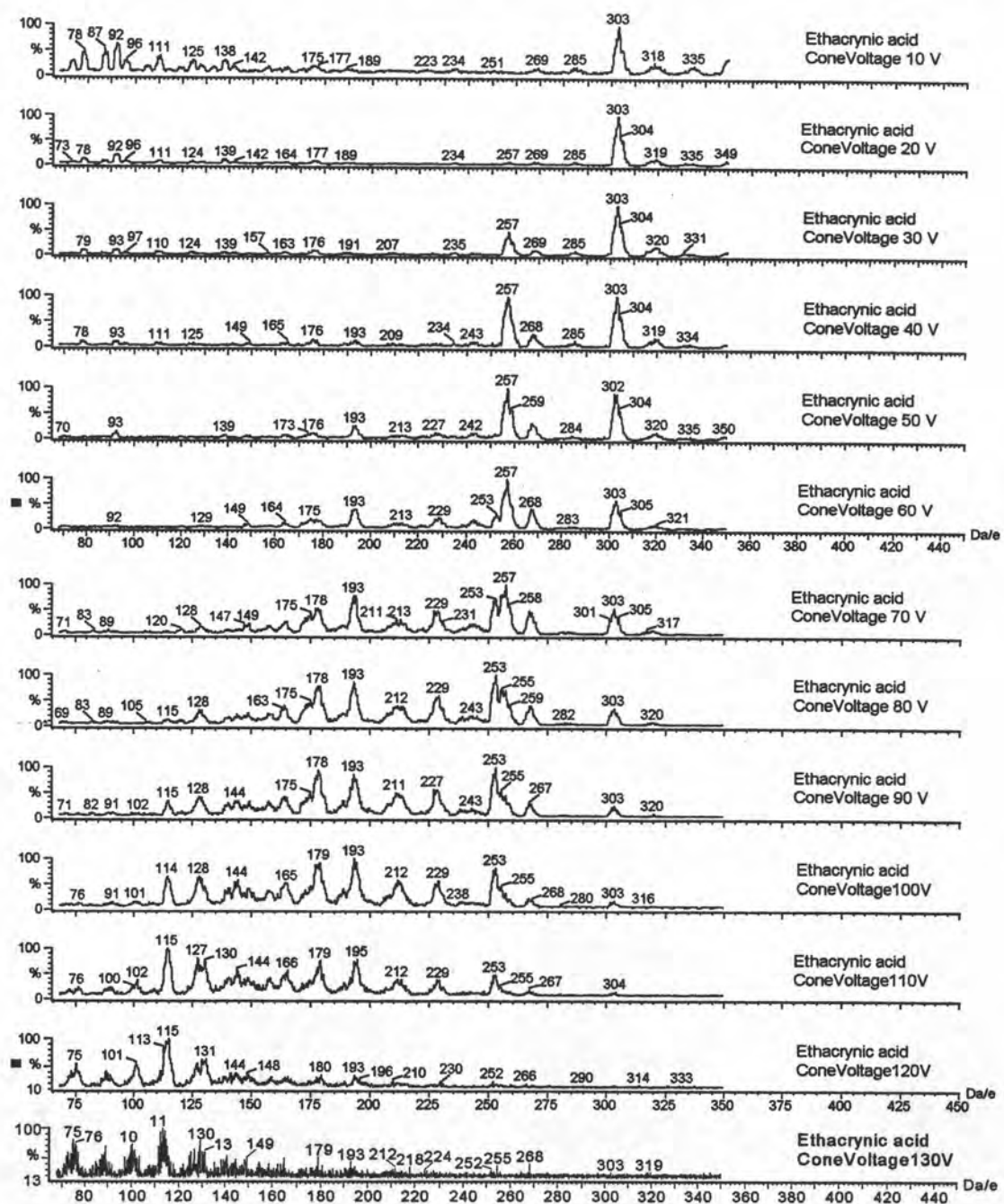
ภาพที่ 27 การแตกตัวของ Bendroflumethiazide ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



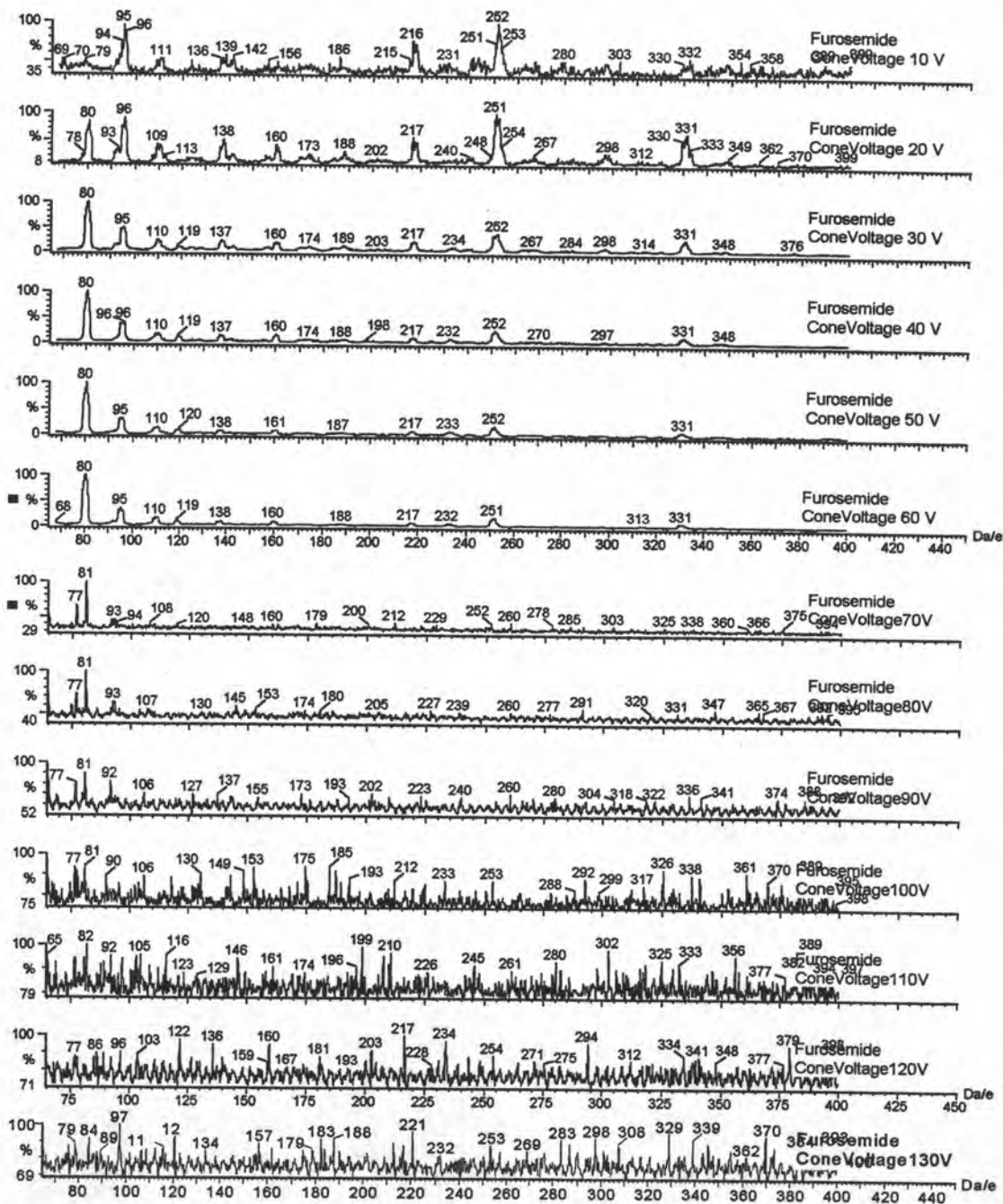
ภาพที่ 28 การแตกตัวของ Benzthiazide ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



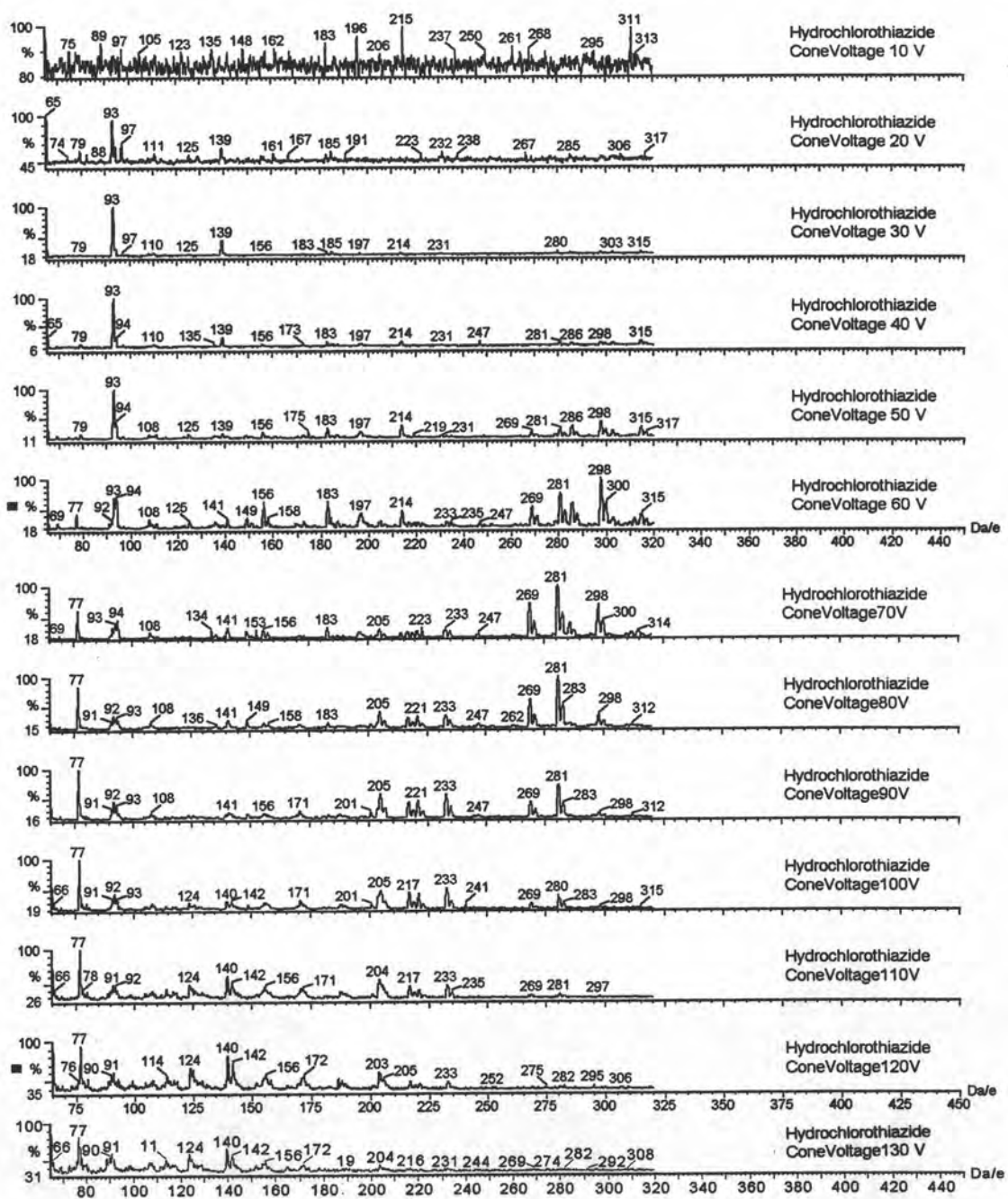
ภาพที่ 29 การแตกตัวของ Bumetanide ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



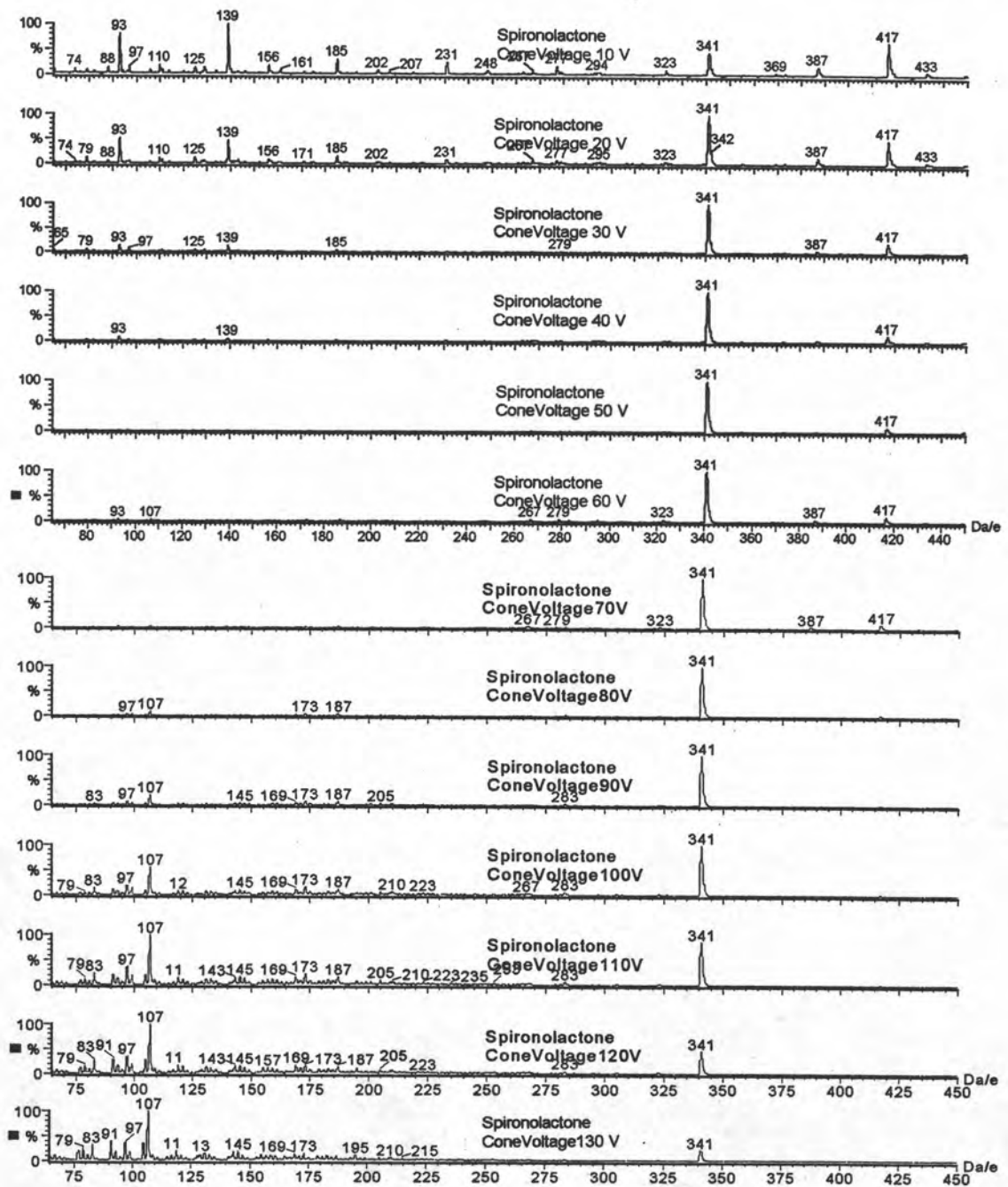
ภาพที่ 30 การแตกตัวของ Ethacrynic acid ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



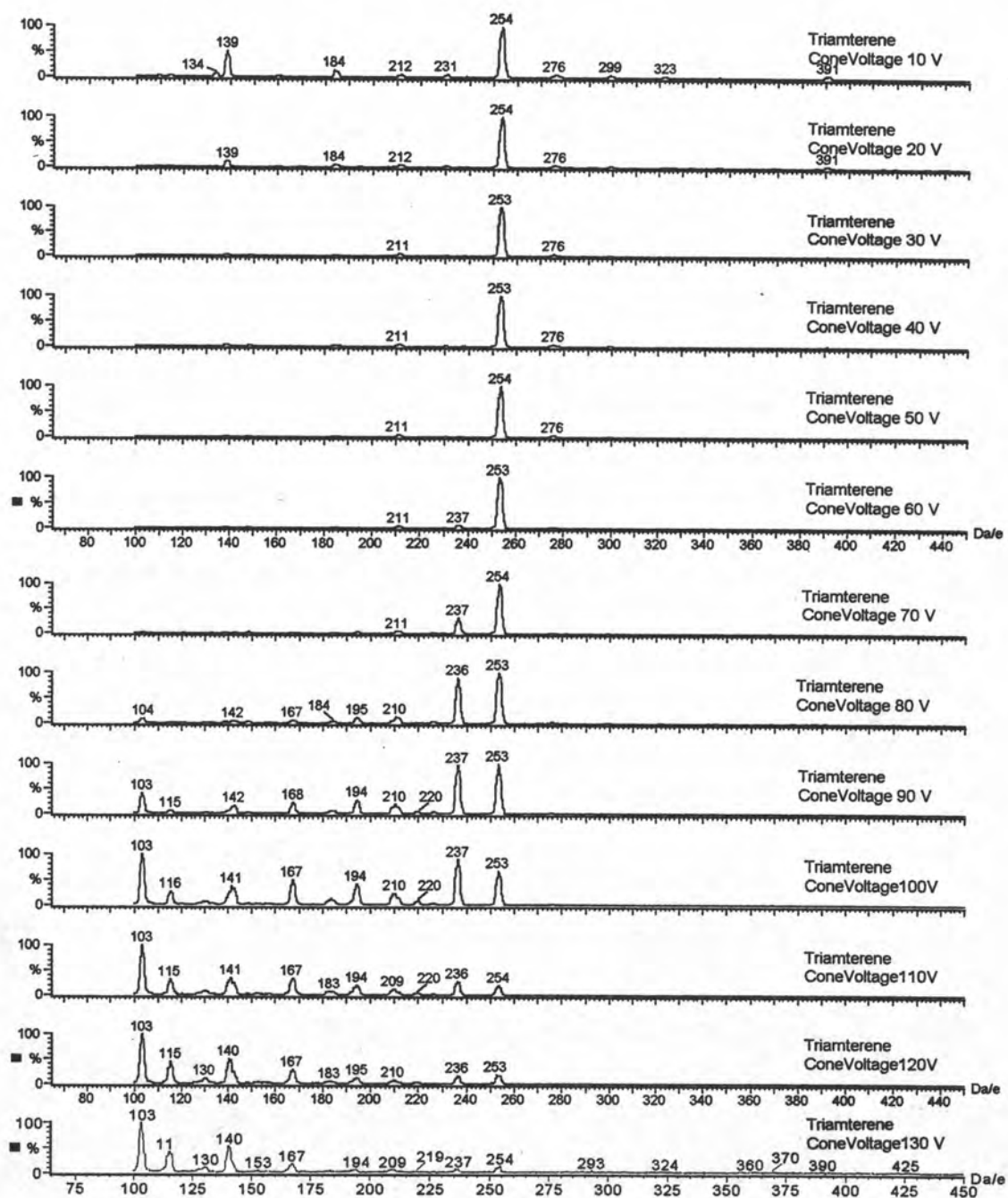
ภาพที่ 31 การแตกตัวของ Furosemide ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ



ภาพที่ 32 การแตกตัวของ Hydrochlorothiazide ที่ cone voltage ต่าง ๆ



ภาพที่ 33 การแตกตัวของ Spironolactone ที่ cone voltage ต่าง ๆ

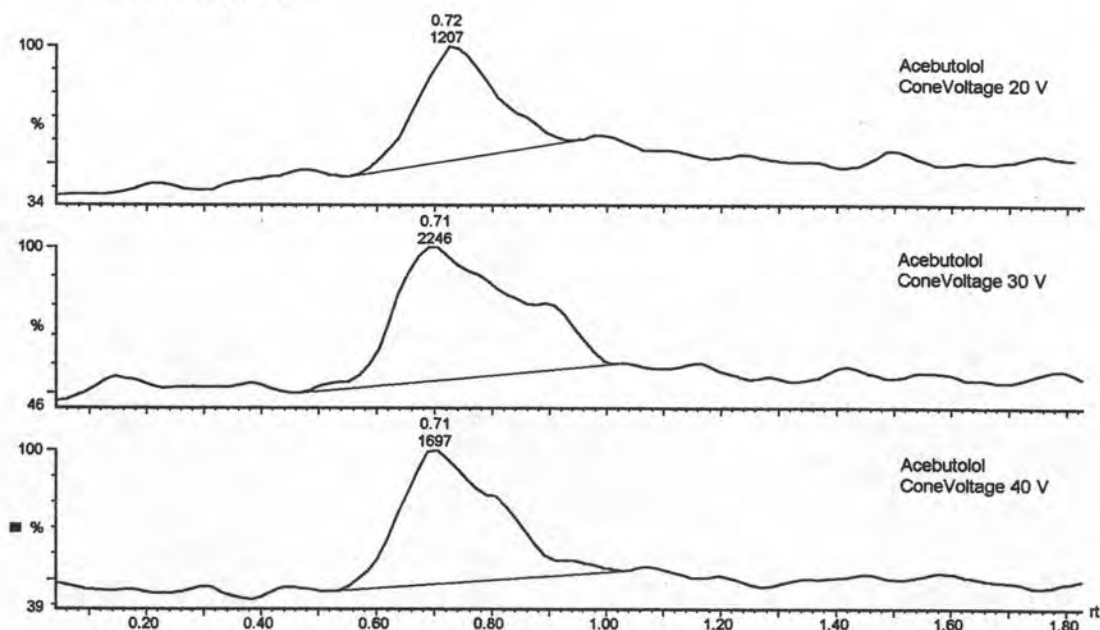


ภาพที่ 34 การแตกตัวของ Triamterene ที่ Cone Voltage ต่าง ๆ

การหา cone voltage ที่เหมาะสม

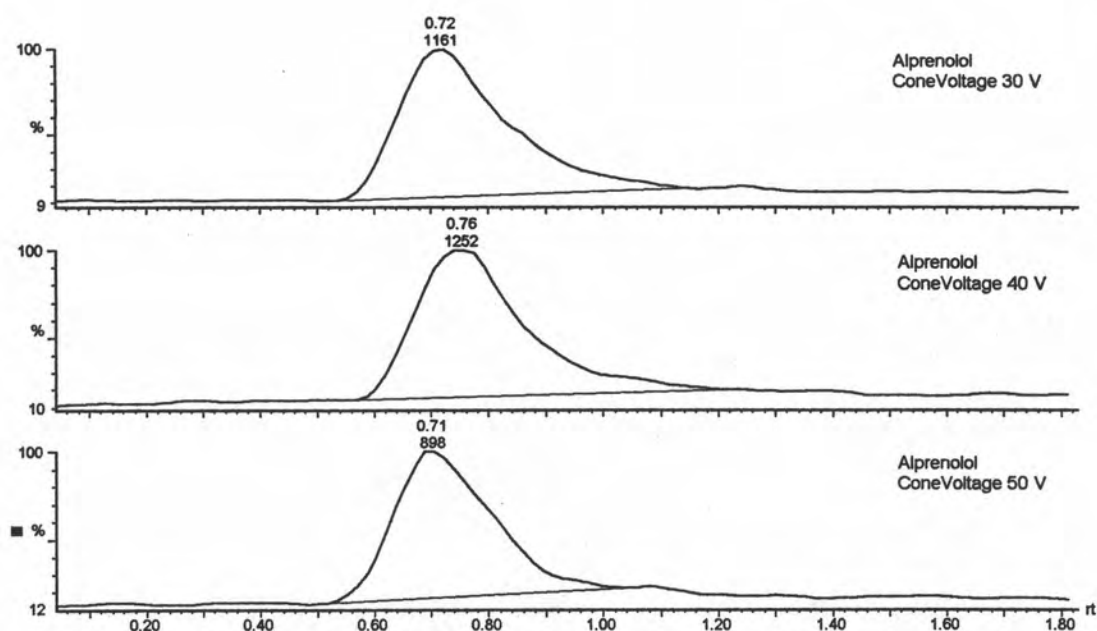
เมื่อพิจารณาการแตกตัวของสารต้องห้ามชนิดต่าง ๆ จะเห็นได้ว่าจะมีการแตกตัวเพิ่มขึ้นที่ cone voltage สูงขึ้น แต่ cone voltage ไม่ได้มีผลต่อการแตกตัวของสารเพียงอย่างเดียว แต่ยังมีผลต่อปริมาณไอออนที่ผ่านจากบริเวณที่สารเกิดเป็นไอออน (Ionization source) เข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวล (Mass analyser) อีกด้วย หากพิจารณาการแตกตัวของสารที่ cone voltage ต่ำ ๆ อาจพบลักษณะคล้ายกับมีการแตกตัวมาก แต่อันที่จริงแล้วเกิดจาก ไอออนที่มีมวลมากสามารถผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวลได้น้อย กว่าไอออนที่มีมวลต่ำ ๆ จึงสามารถสังเกตเห็นไอออนซึ่งมีมวลต่ำ ๆ ได้ ซึ่งปกติจะไม่สามารถมองเห็นได้เนื่องจากไอออนที่มีมวลสูง ๆ มีอัตราส่วนสูงกว่ามาก เนื่องจากยังเกิดการแตกตัวน้อย หากคำนึงถึงความไวในการวิเคราะห์จะต้องทำการปรับ cone voltage ให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ความไวในการวิเคราะห์มากที่สุด จึงทดลองทำการปรับค่า cone voltage แล้วทำการหาพื้นที่ใต้พีคเพื่อนำมาพิจารณาเลือก cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์สารชนิดนั้น

Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์สารต้องห้ามชนิดต่าง ๆ เป็นดังนี้
ยาปิดกั้นบีตา



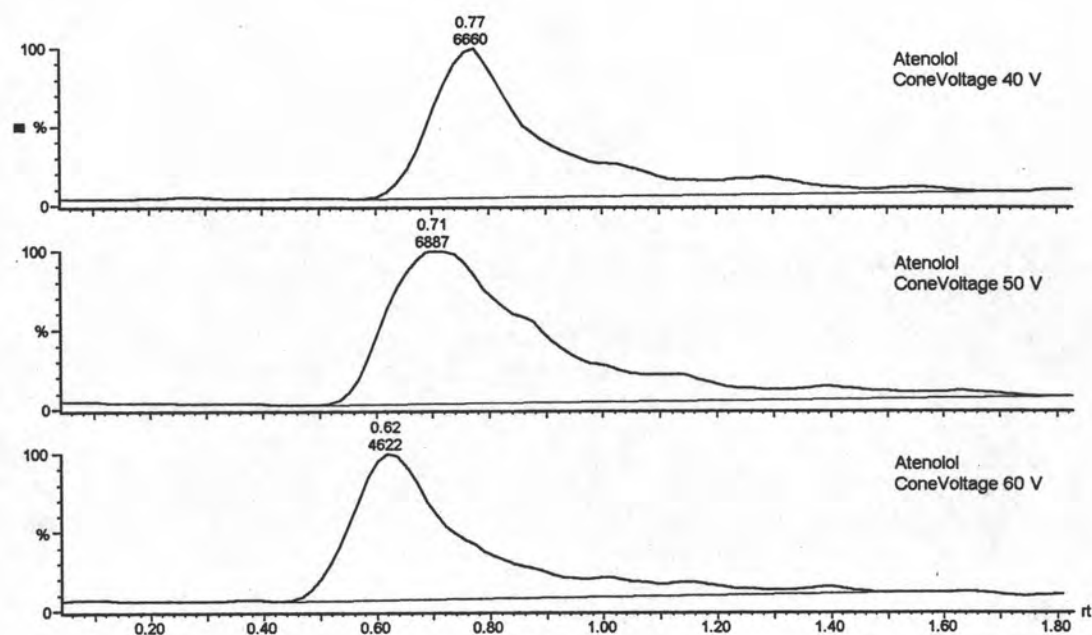
ภาพที่ 35 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Acebutolol

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Acebutolol คือ 30 โวลต์



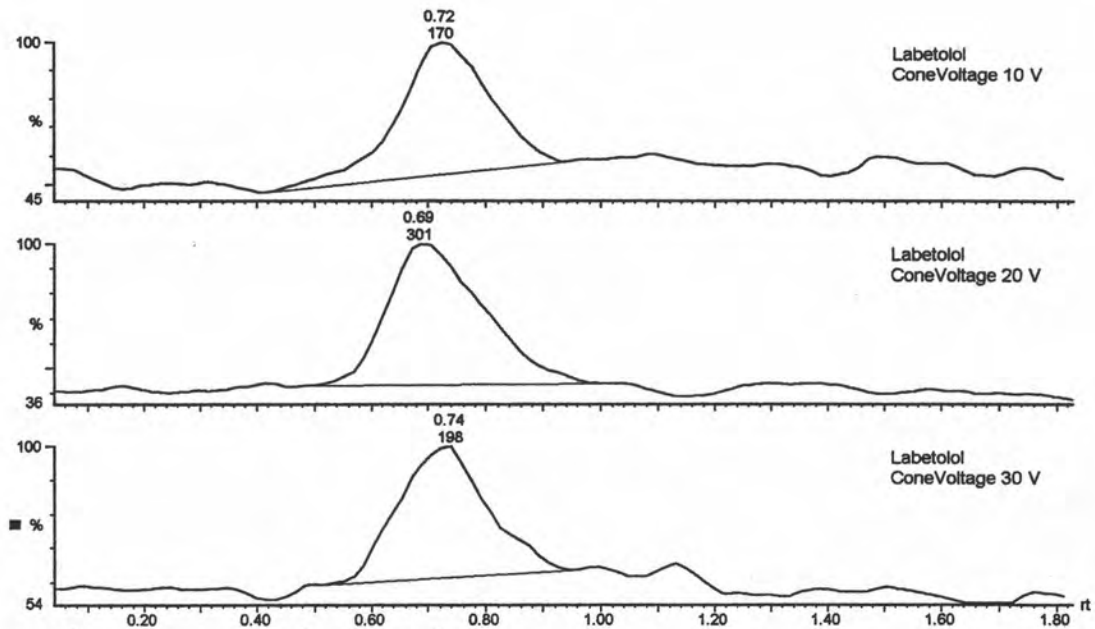
ภาพที่ 36 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Alprenolol

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Alprenolol คือ 40 โวลต์



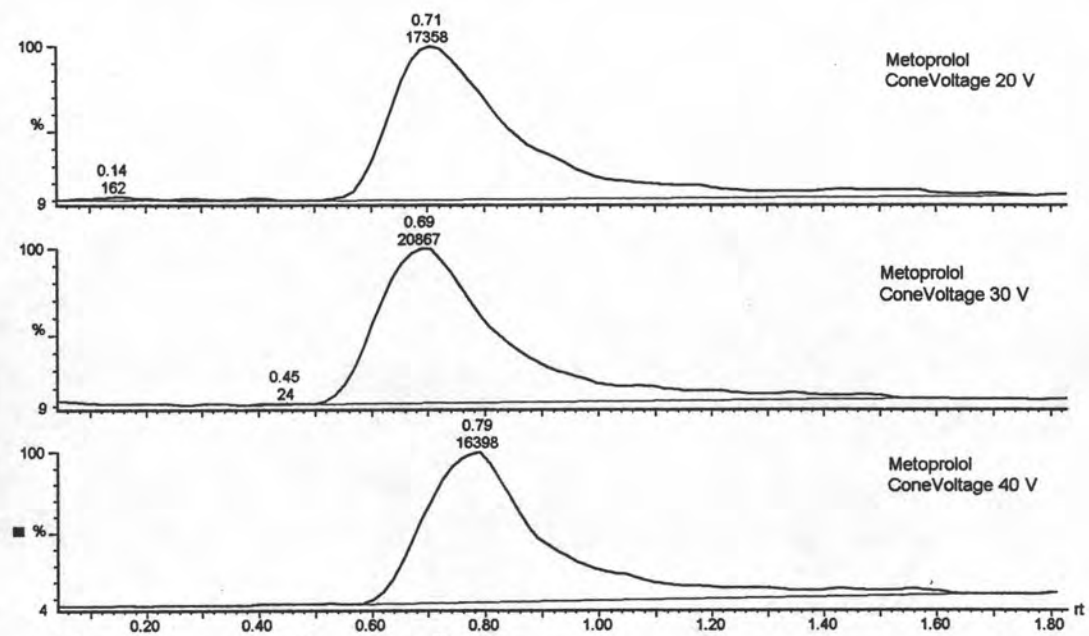
ภาพที่ 37 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Atenolol

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Atenolol คือ 50 โวลต์



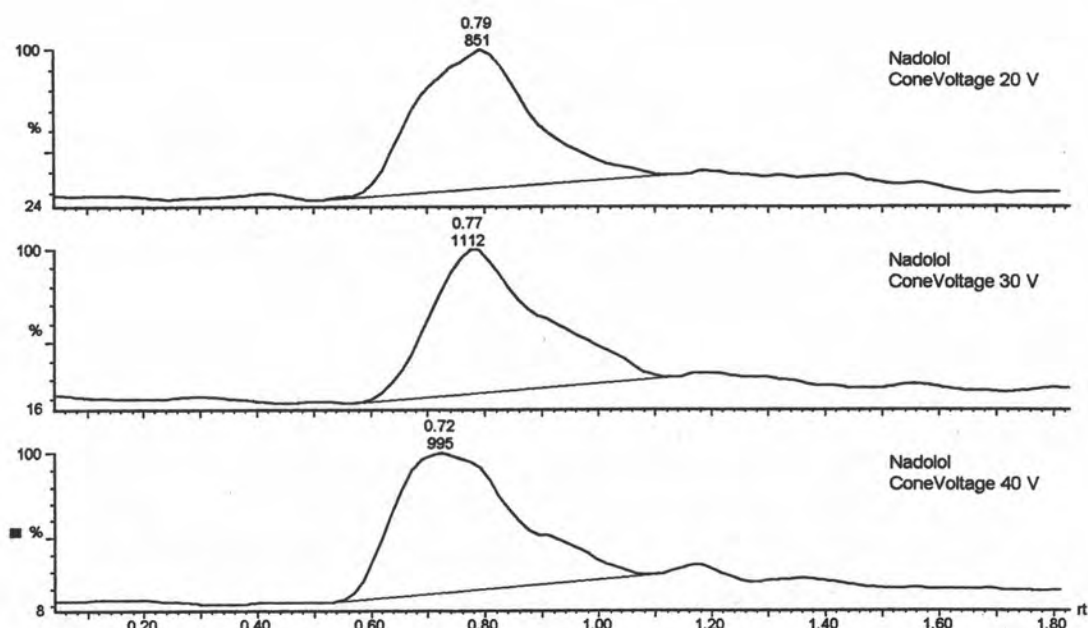
ภาพที่ 38 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Labetolol

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Acebutolol คือ 20 โวลต์



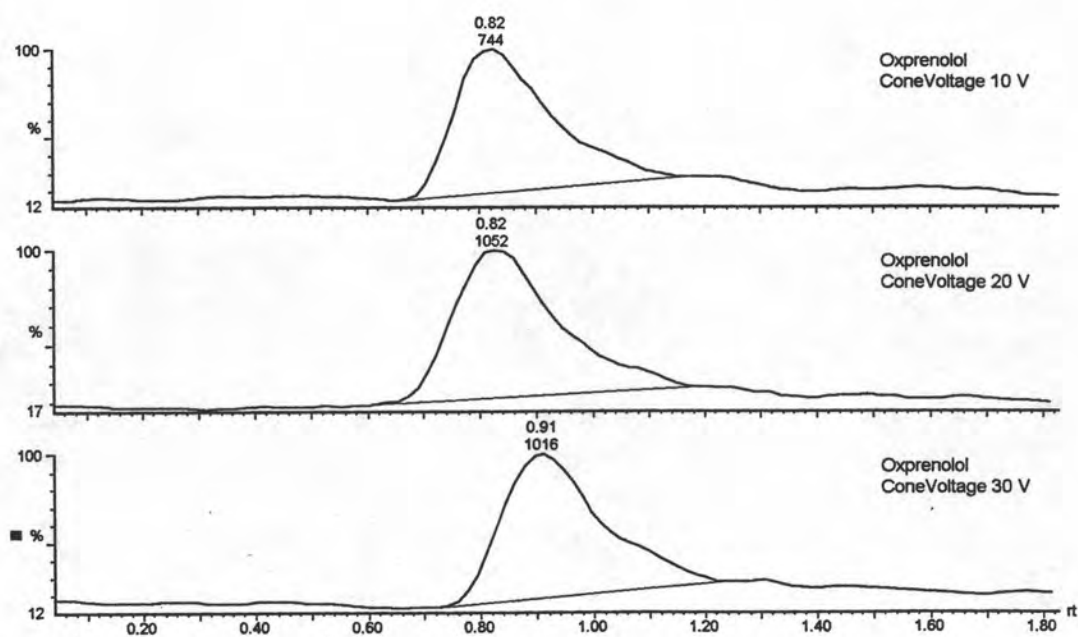
ภาพที่ 39 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Metoprolol

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Metoprolol คือ 30 โวลต์



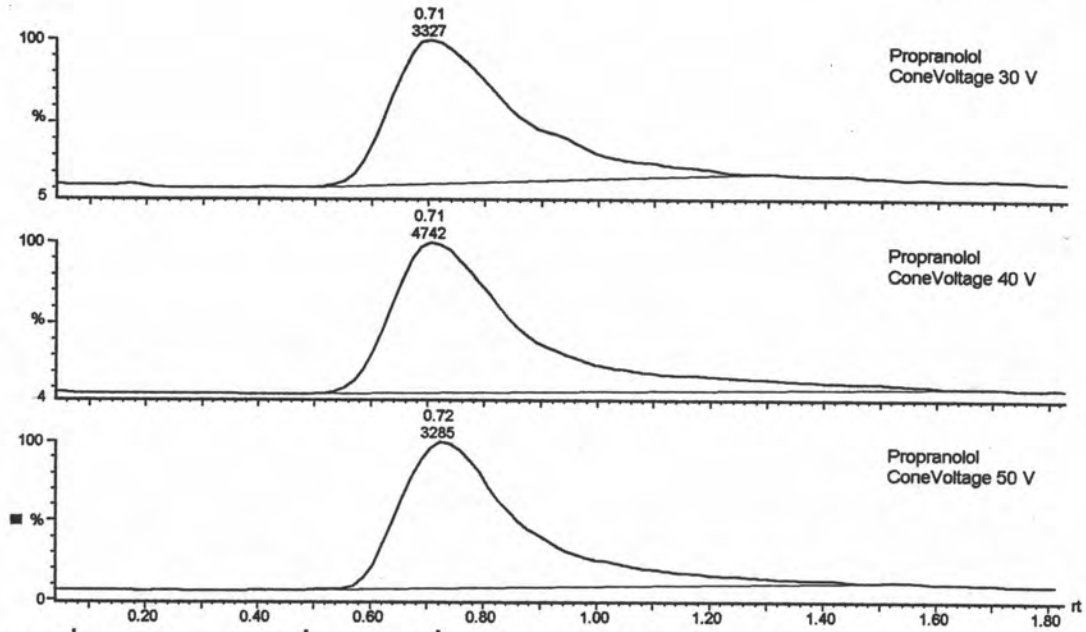
ภาพที่ 40 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Nadolol

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Nadolol คือ 30 โวลต์



ภาพที่ 41 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Oxprenolol

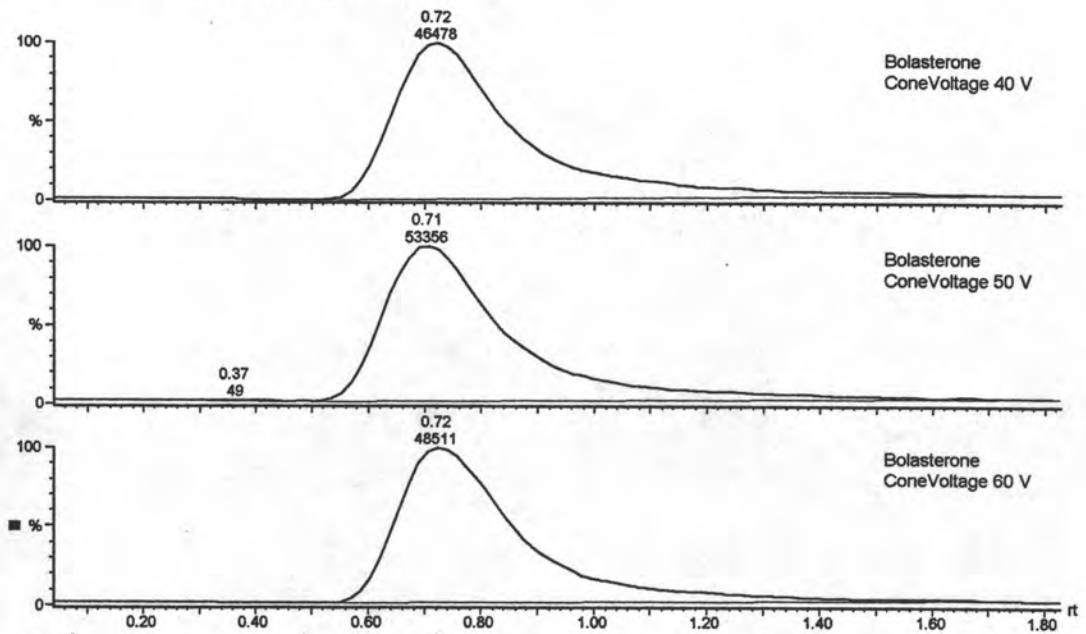
เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Oxprenolol คือ 20 โวลต์



ภาพที่ 42 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Propranolol

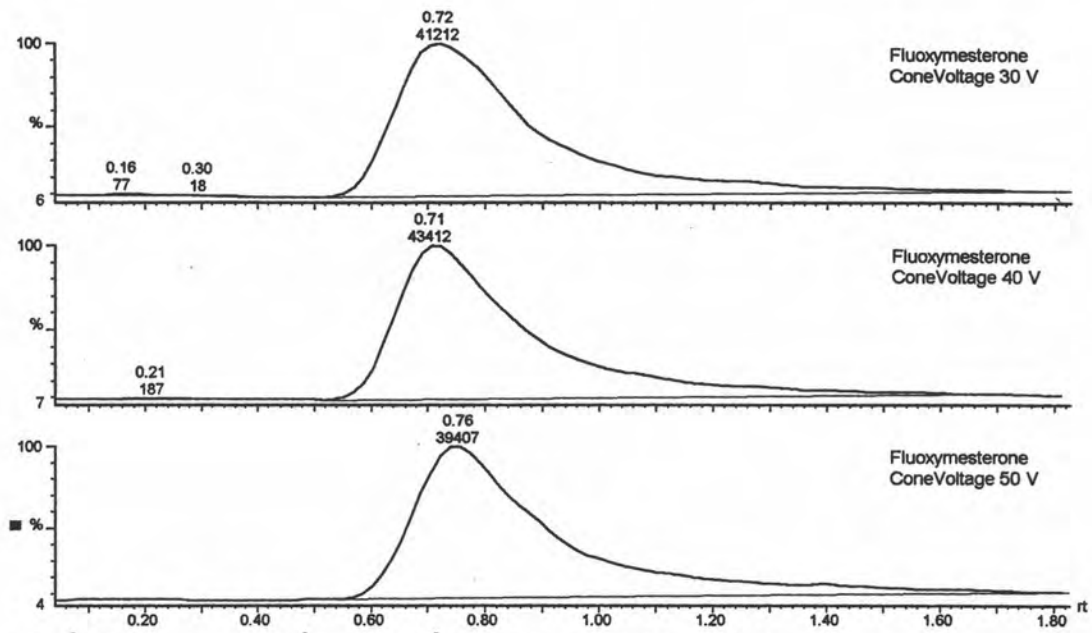
เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Propranolol คือ 40 โวลต์

อะแนบอดิกสเตอรอยด์



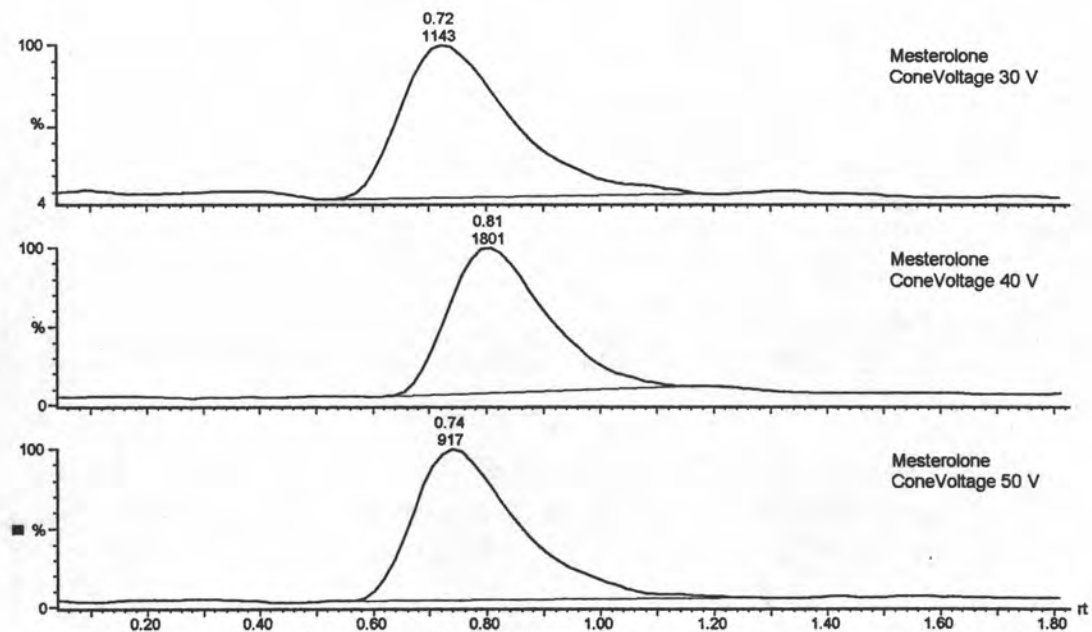
ภาพที่ 43 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Bolasterone

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Bolasterone คือ 50 โวลต์



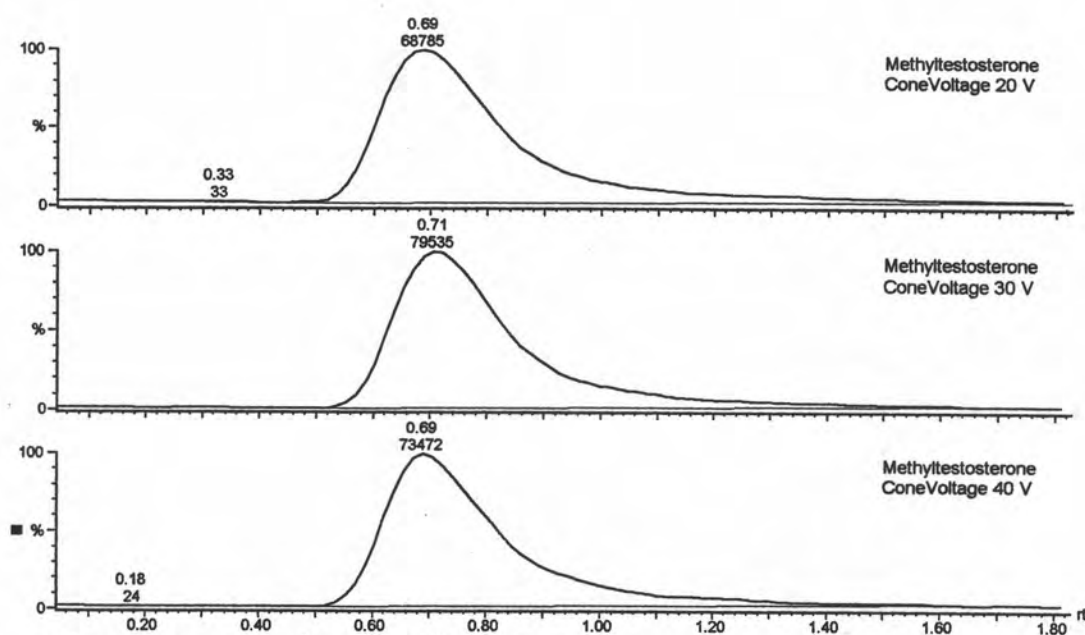
ภาพที่ 44 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Fluoxymesterone

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Fluoxymesterone คือ 40 โวลต์



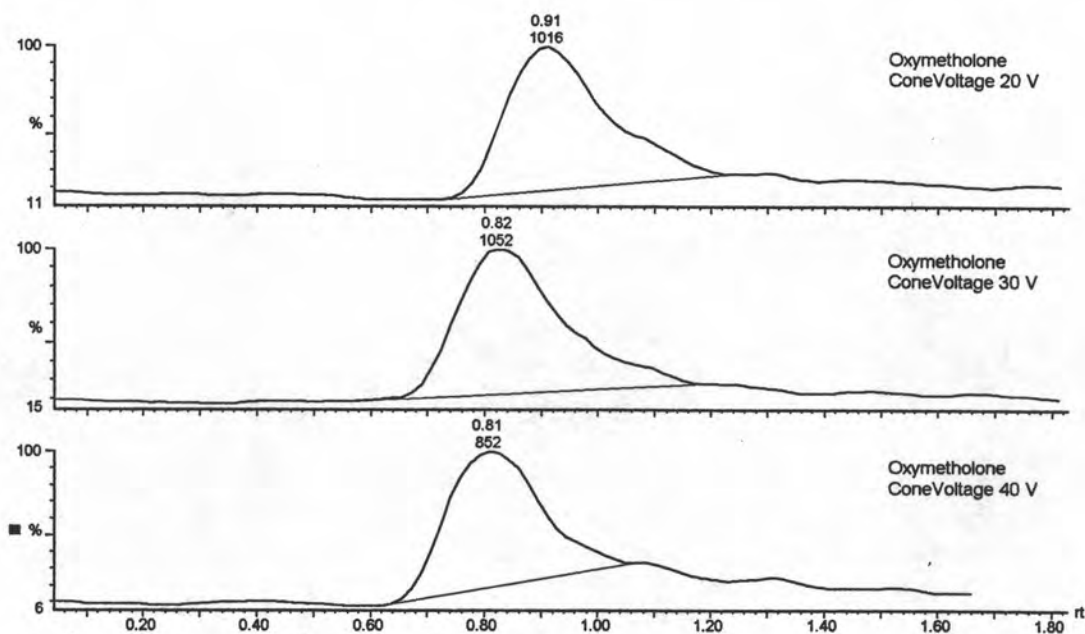
ภาพที่ 45 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Mesterolone

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Mesterolone คือ 40 โวลต์



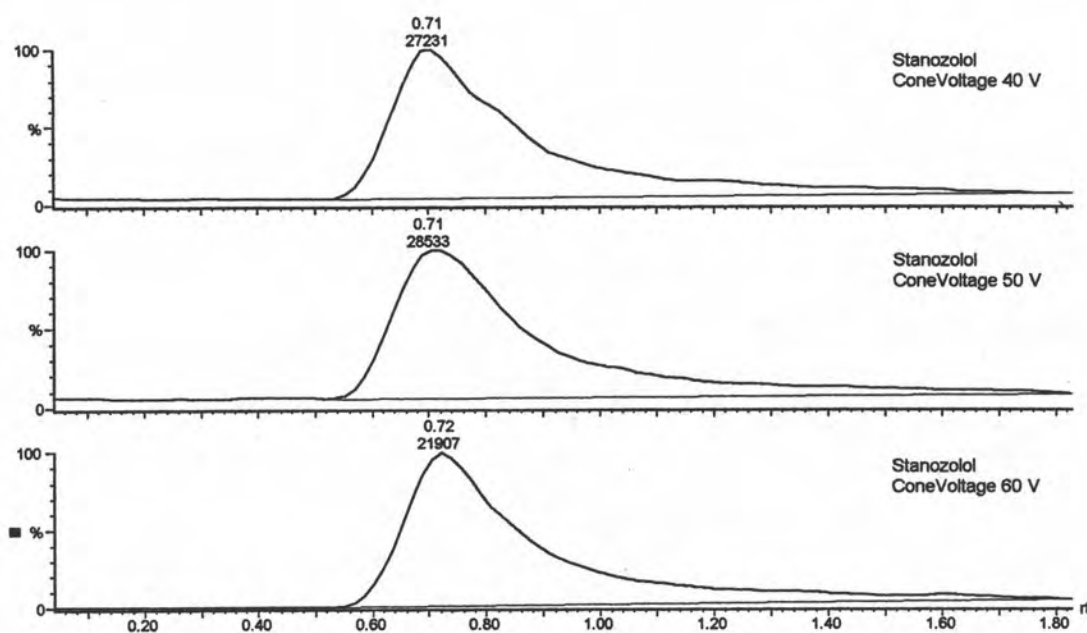
ภาพที่ 46 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Methyltestosterone

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Methyltestosterone คือ 30 โวลต์



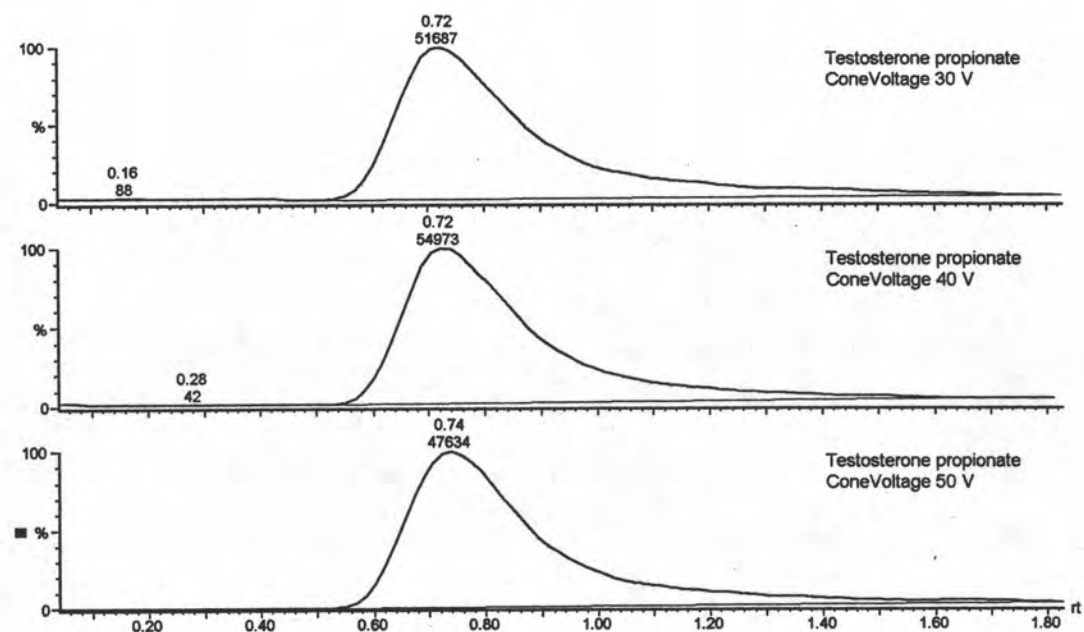
ภาพที่ 47 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Oxymetholone

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Oxymetholone คือ 30 โวลต์



ภาพที่ 48 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Stanozolol

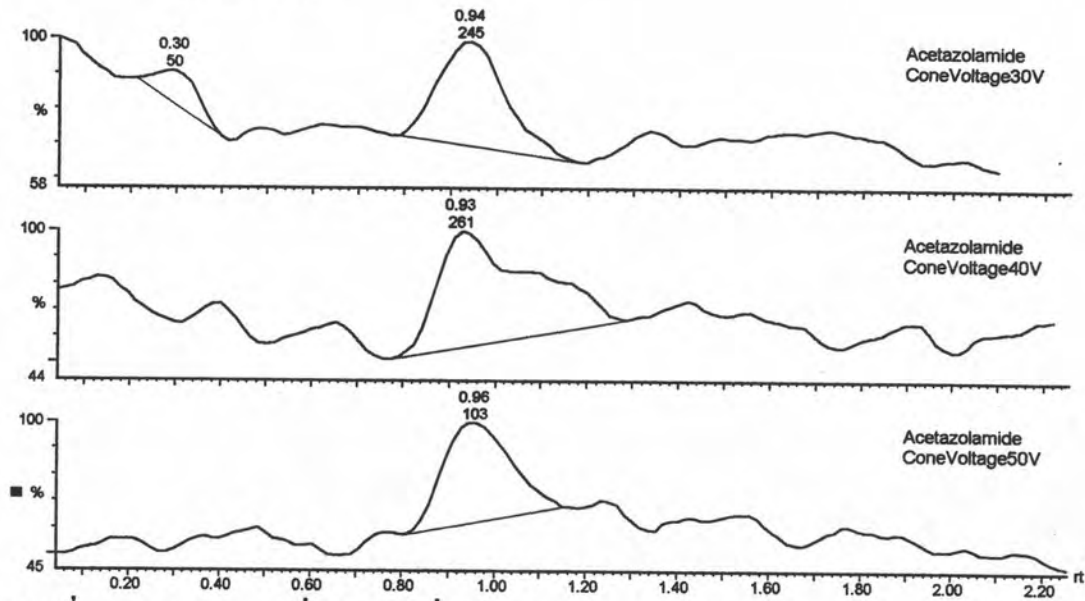
เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Stanozolol คือ 50 โวลต์



ภาพที่ 49 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Testosterone propionate

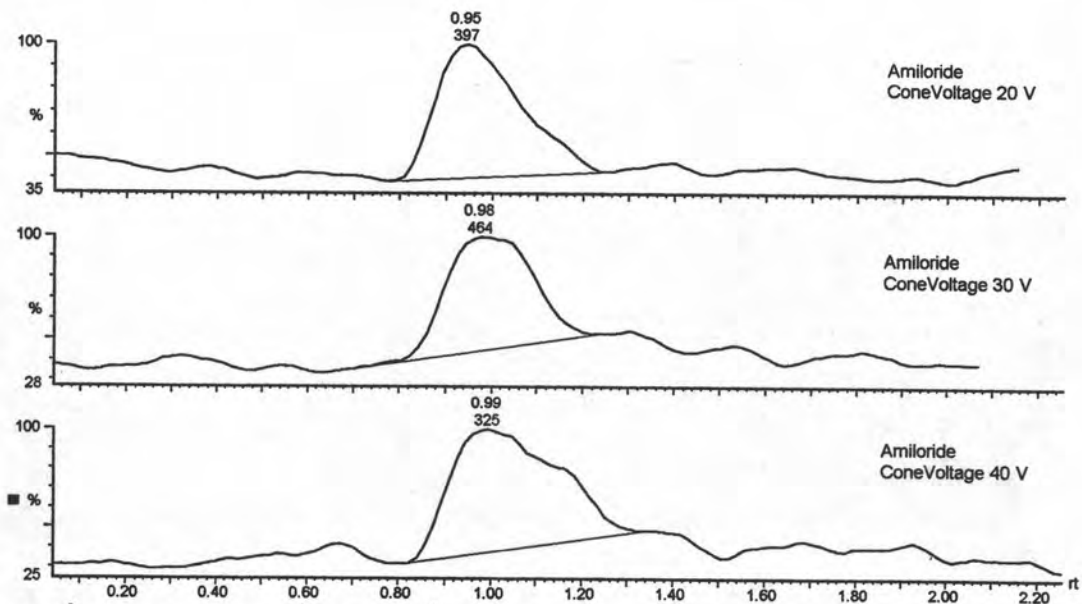
เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Testosterone propionate คือ 40 โวลต์

ยาขับปัสสาวะ



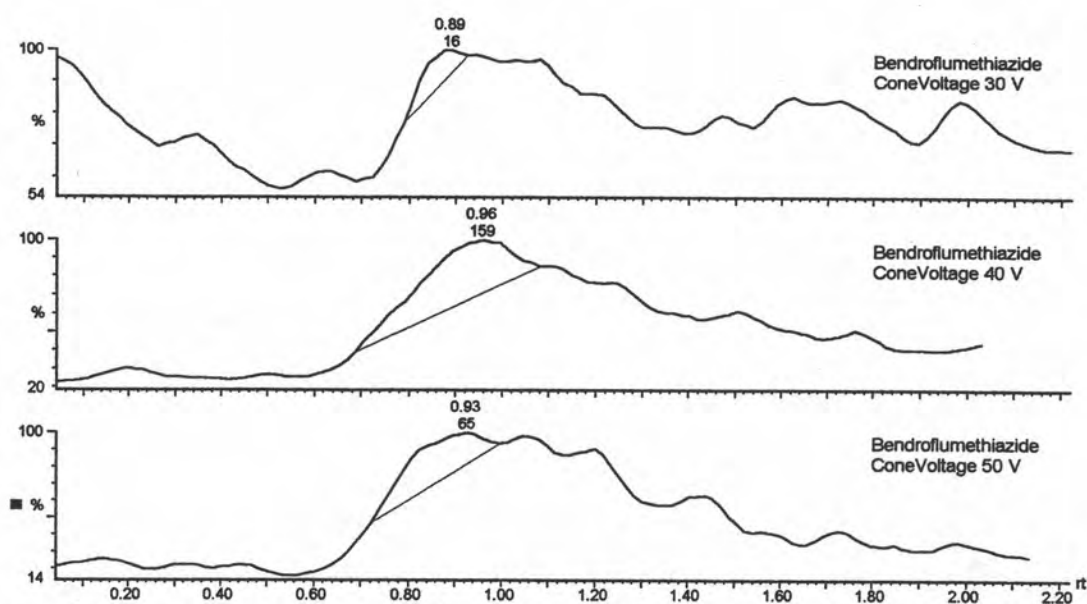
ภาพที่ 50 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Acetazolamide

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Acetazolamide คือ 40 โวลต์



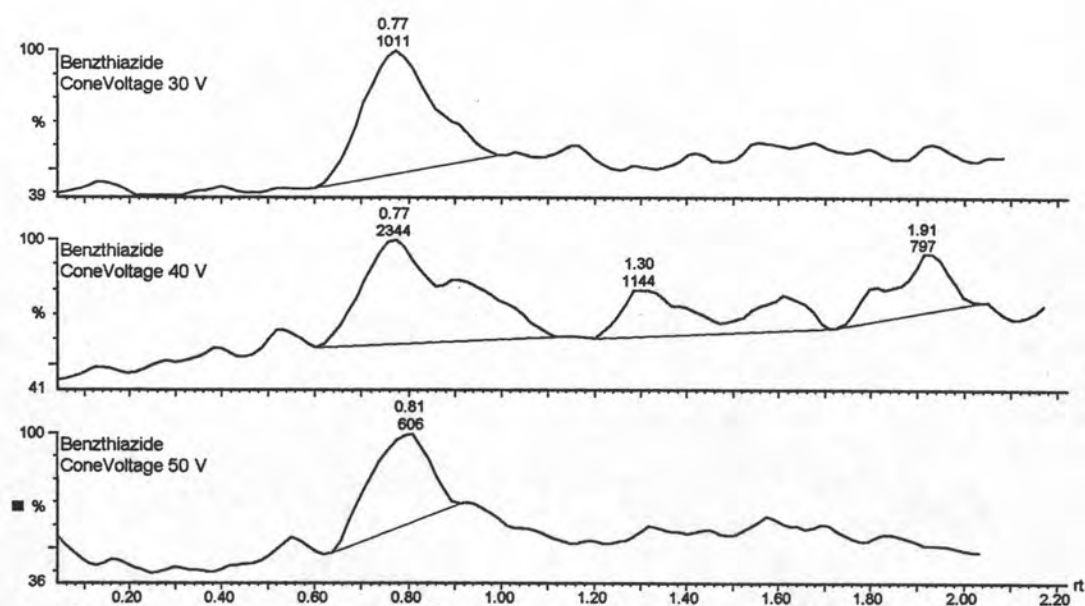
ภาพที่ 51 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Amiloride

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Amiloride คือ 30 โวลต์



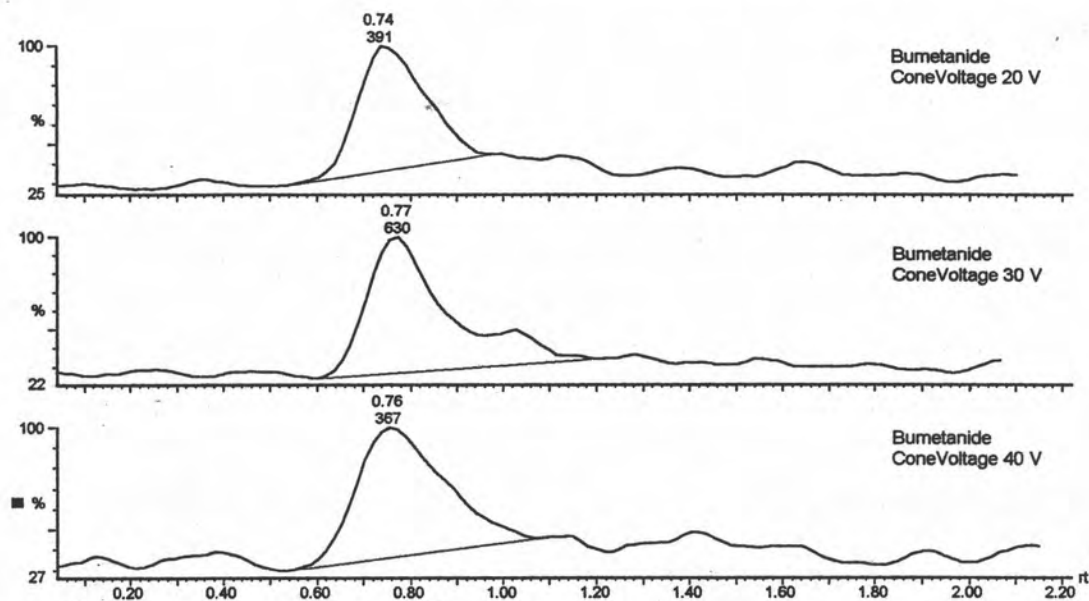
ภาพที่ 52 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Bendroflumethiazide

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Bendroflumethiazide คือ 40 โวลต์



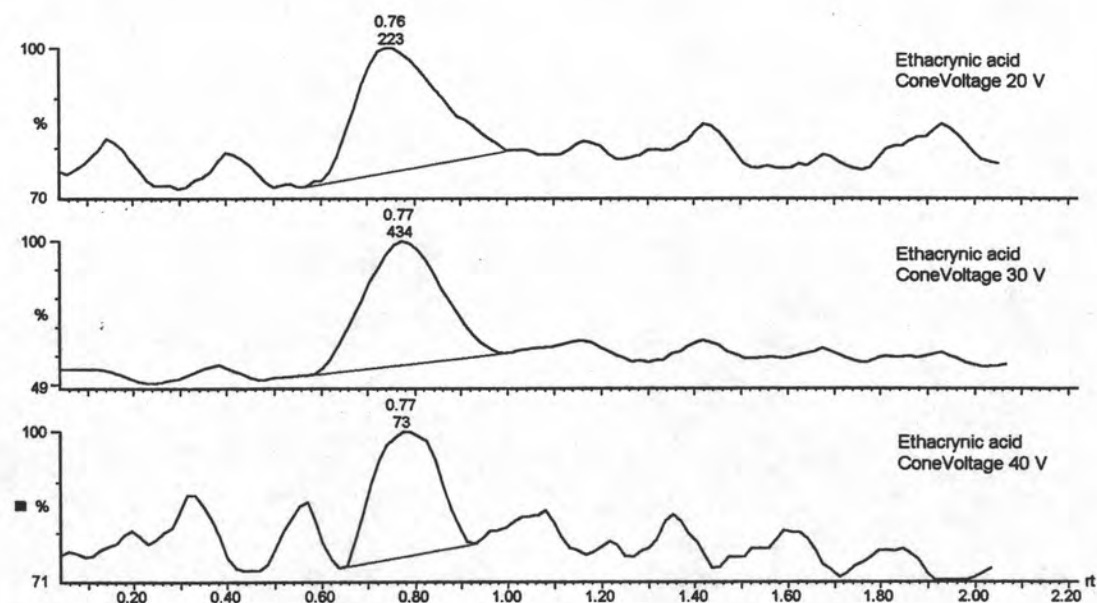
ภาพที่ 53 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Benzthiazide

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Benzthiazide คือ 40 โวลต์



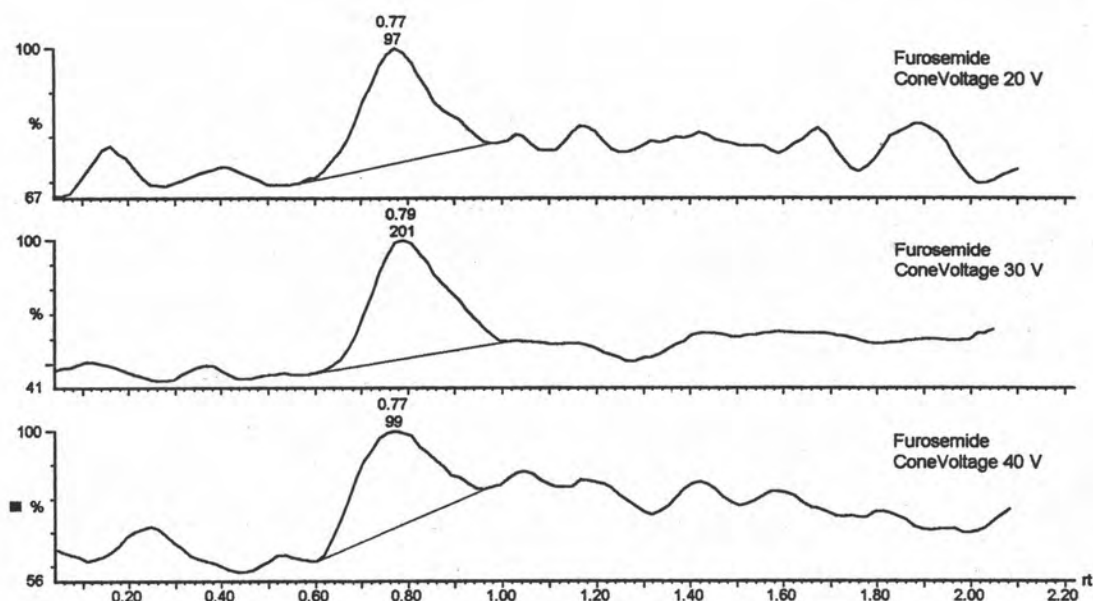
ภาพที่ 54 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Bumetanide

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Bumetanide คือ 30 โวลต์



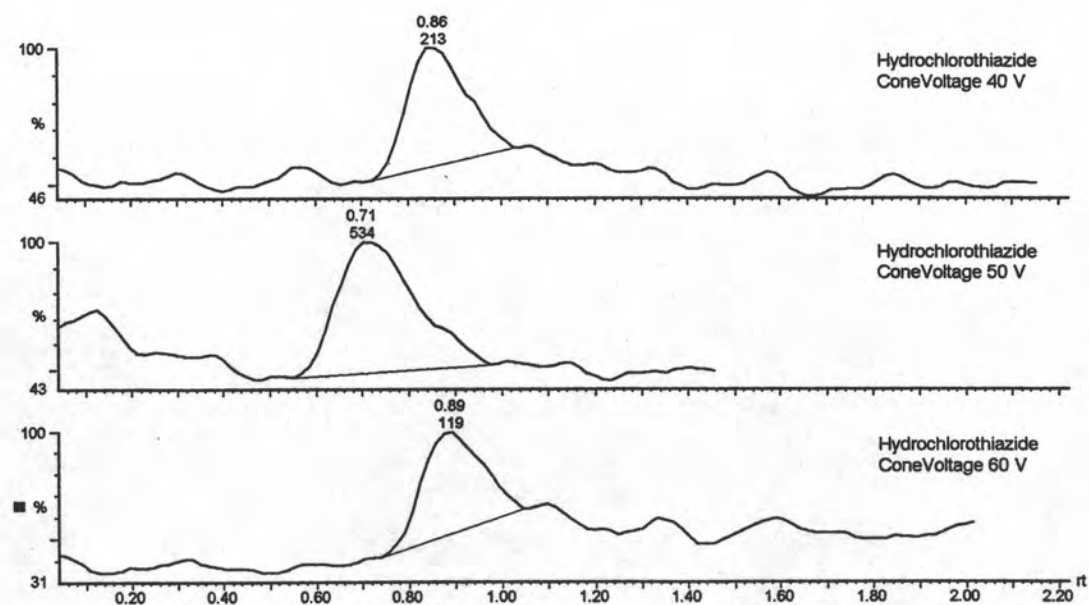
ภาพที่ 55 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Ethacrynic acid

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Ethacrynic acid คือ 30 โวลต์



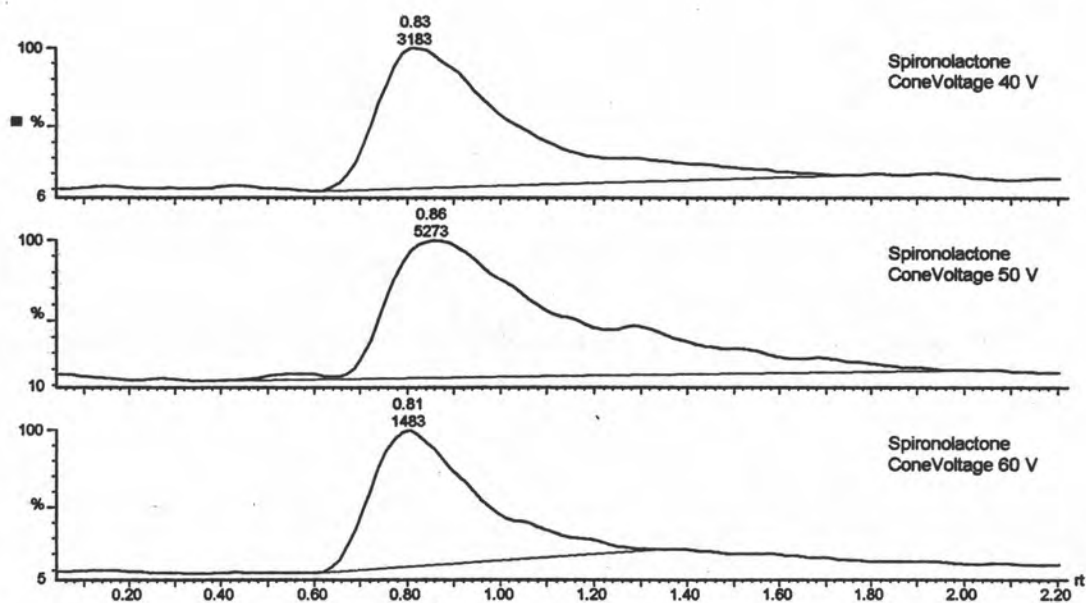
ภาพที่ 56 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Furosemide

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Furosemide คือ 30 โวลต์



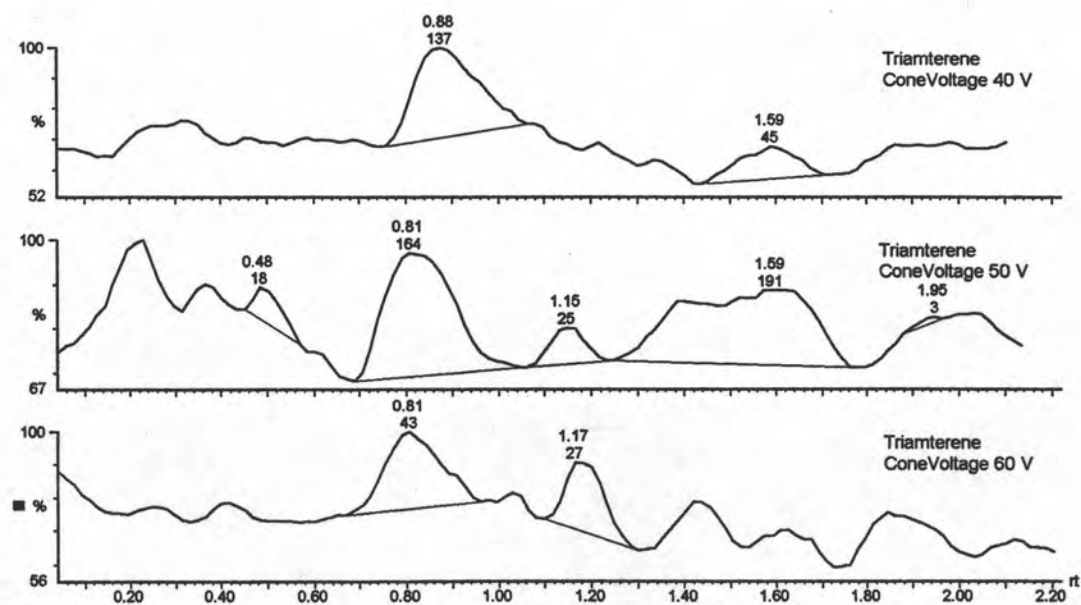
ภาพที่ 57 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Hydrochlorothiazide

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Hydrochlorothiazide คือ 50 โวลต์



ภาพที่ 58 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Spironolactone

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Spironolactone คือ 50 โวลต์

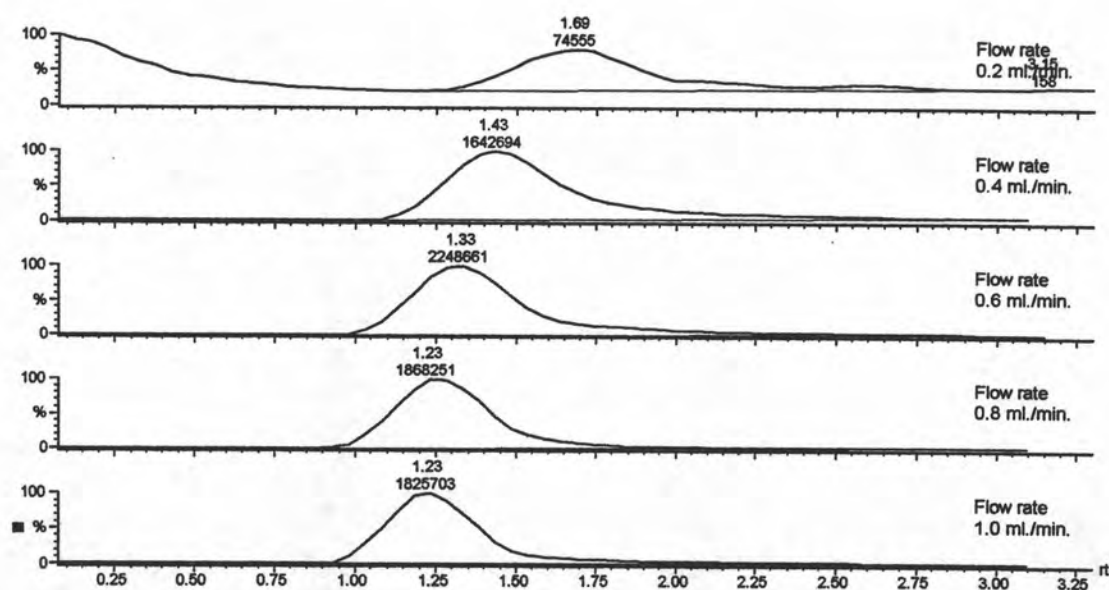


ภาพที่ 59 Cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา Triamterene

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ สามารถสรุปได้ว่า cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ Triamterene คือ 50 โวลต์

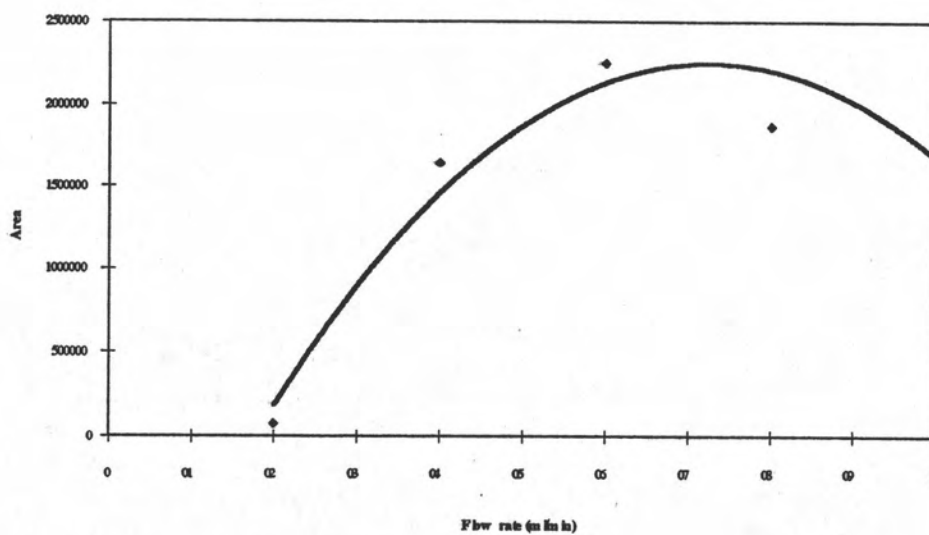
ผลของอัตราการไหลต่อการวิเคราะห์

หลังจากศึกษาการแตกตัวของสารแล้วจึงทำการหาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่สุดโดยเริ่มทดลองฉีด Alprenolol ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยใช้ cone voltage 40 โวลต์ และทดลองเปลี่ยนอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ (Methanol 70 % ในน้ำ) ตั้งแต่ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มล./นาที เนื่องจากการหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ต้องพิจารณาจากความสูงของพีคเปรียบเทียบกับความสูงของสัญญาณรบกวนจึงต้องสรุปผลของอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีผลต่อความสูงของพีคและพื้นที่ใต้พีค ดังภาพที่ 60



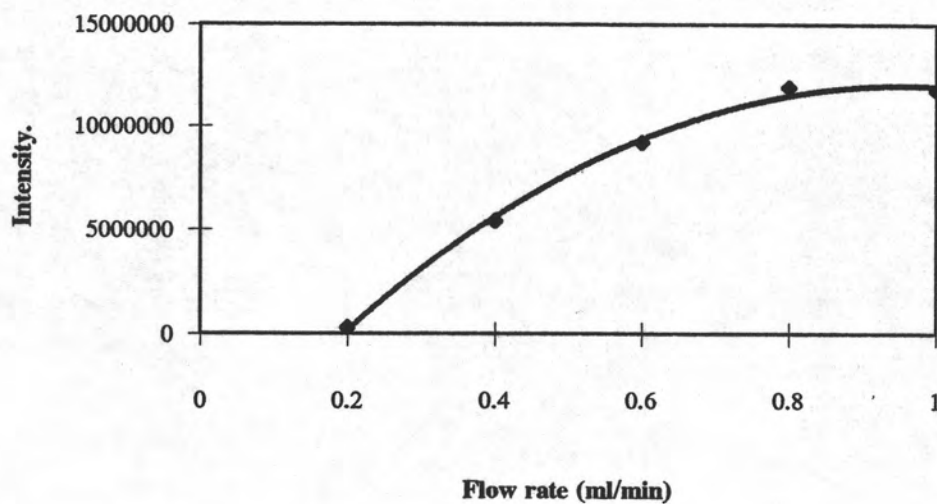
ภาพที่ 60 ผลของอัตราการไหลต่อการวิเคราะห์

หลังจากทำการเปลี่ยนอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่แล้วทำการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่กับพื้นที่ใต้พีค และ อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่กับความสูงของพีคได้ดังนี้



ภาพที่ 61 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่กับพื้นที่ที่ได้พิก

จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่กับพื้นที่ที่ได้พิกสามารถสรุปได้ว่าอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ทำให้ได้พื้นที่ได้กราฟสูงที่สุดคือ 0.7 มล./นาที

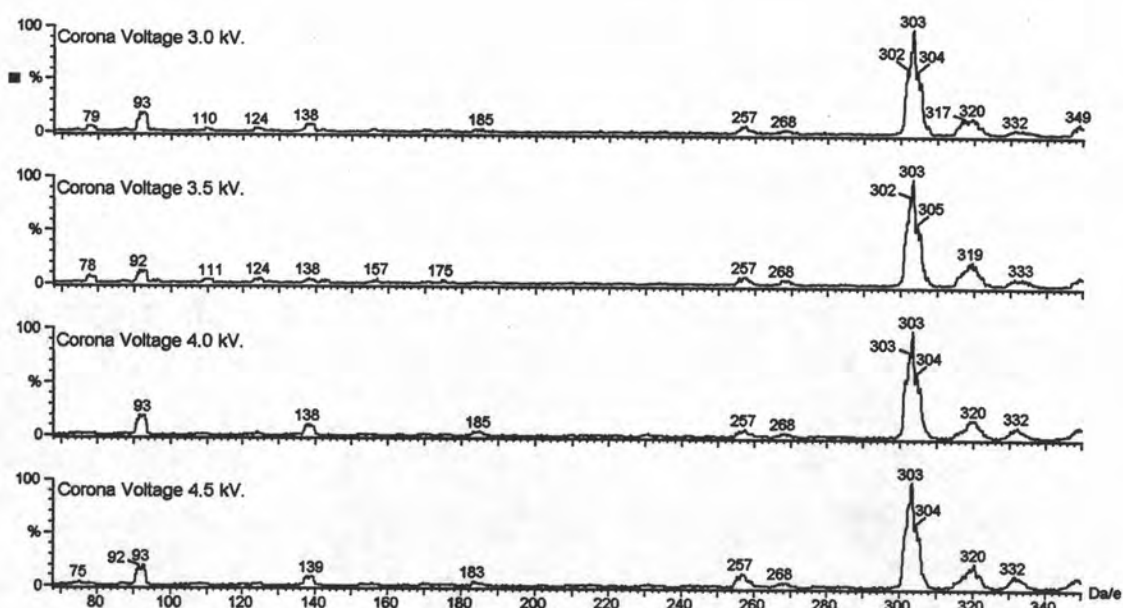


ภาพที่ 62 อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ทำให้พิกสูงที่สุด

จากกราฟแสดงอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ทำให้พีกสูงสุดสามารถสรุปได้ว่า อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่เทคนิค LC/MS สามารถวิเคราะห์ได้คือ 0.8 มล./นาที

ผลของการเปลี่ยน corona voltage

เนื่องจากเทคนิค LC/MS ที่ใช้แหล่งกำเนิดไอออนชนิด APCI ทำให้สารกลายเป็นไอออนโดยใช้ corona discharge electrode ทำให้วัฏภาคเคลื่อนที่กลายเป็นไอออนแล้วจึงเกิดการถ่ายเทโปรตรอน จากวัฏภาคเคลื่อนที่ให้แก่สารที่วิเคราะห์จึงได้ทำการทดลองวิเคราะห์ Ethacrynic acid ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และใช้ Ethanol 70 % ในน้ำ เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยมีอัตราการไหล 0.8 มล./นาที และทำการเปลี่ยนค่า corona voltage ตั้งแต่ 3 kV. ถึง 4.5 kV. เพื่อศึกษาผลต่อการแตกตัวของสารและความไวในการวิเคราะห์



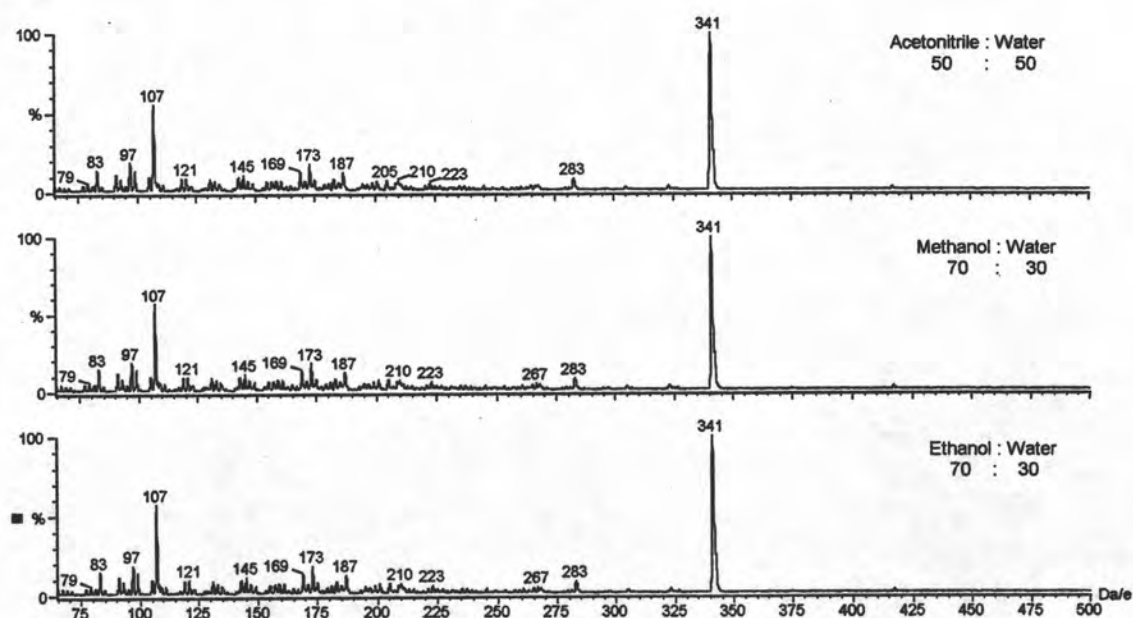
ภาพที่ 63 ผลของการเปลี่ยนค่า Corona Voltage

จากภาพสามารถสรุปได้ว่าการเปลี่ยนค่า Corona Voltage ระหว่าง 3 kV. ถึง 4.5 kV. ไม่มีผลต่อการแตกตัวและความไวในการวิเคราะห์จึงเลือกใช้ Corona Voltage ที่ 3 kV. เนื่องจากเป็นค่าที่ไม่สูงและค้างจนเกินไป และหากใช้ Corona Voltage สูง ๆ เมื่อใช้เครื่องติดต่อกันเป็นเวลา

นาน ๆ หรือใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่สูง ๆ จะทำให้ความต่างศักย์ที่บริเวณ counter electrode สูงขึ้น ซึ่งจะทำให้ความไวในการวิเคราะห์ลดลง

ผลของชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ต่อการวิเคราะห์

เนื่องจากเทคนิค LC/MS ที่ใช้แหล่งกำเนิดไอออนชนิด APCI ทำให้สารกลายเป็นไอออนโดยใช้ corona discharge electrode ทำให้วัฏภาคเคลื่อนที่กลายเป็นไอออนแล้วจึงเกิดการถ่ายเทโปรตรอนจากวัฏภาคเคลื่อนที่ให้แก่สารที่วิเคราะห์ ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาผลที่เกิดจากชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีต่อการวิเคราะห์ โดยทดลองวิเคราะห์ Spironolactone ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยใช้ cone voltage 50 โวลต์ และอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 0.8 มล./นาที และเปลี่ยนชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ 3 ชนิด คือ Acetonitrile : น้ำกลั่น อัตราส่วน 50 : 50, Methanol : น้ำกลั่น อัตราส่วน 70 : 30 และ Ethanol : น้ำกลั่น อัตราส่วน 70 : 30 ได้ผลดังนี้

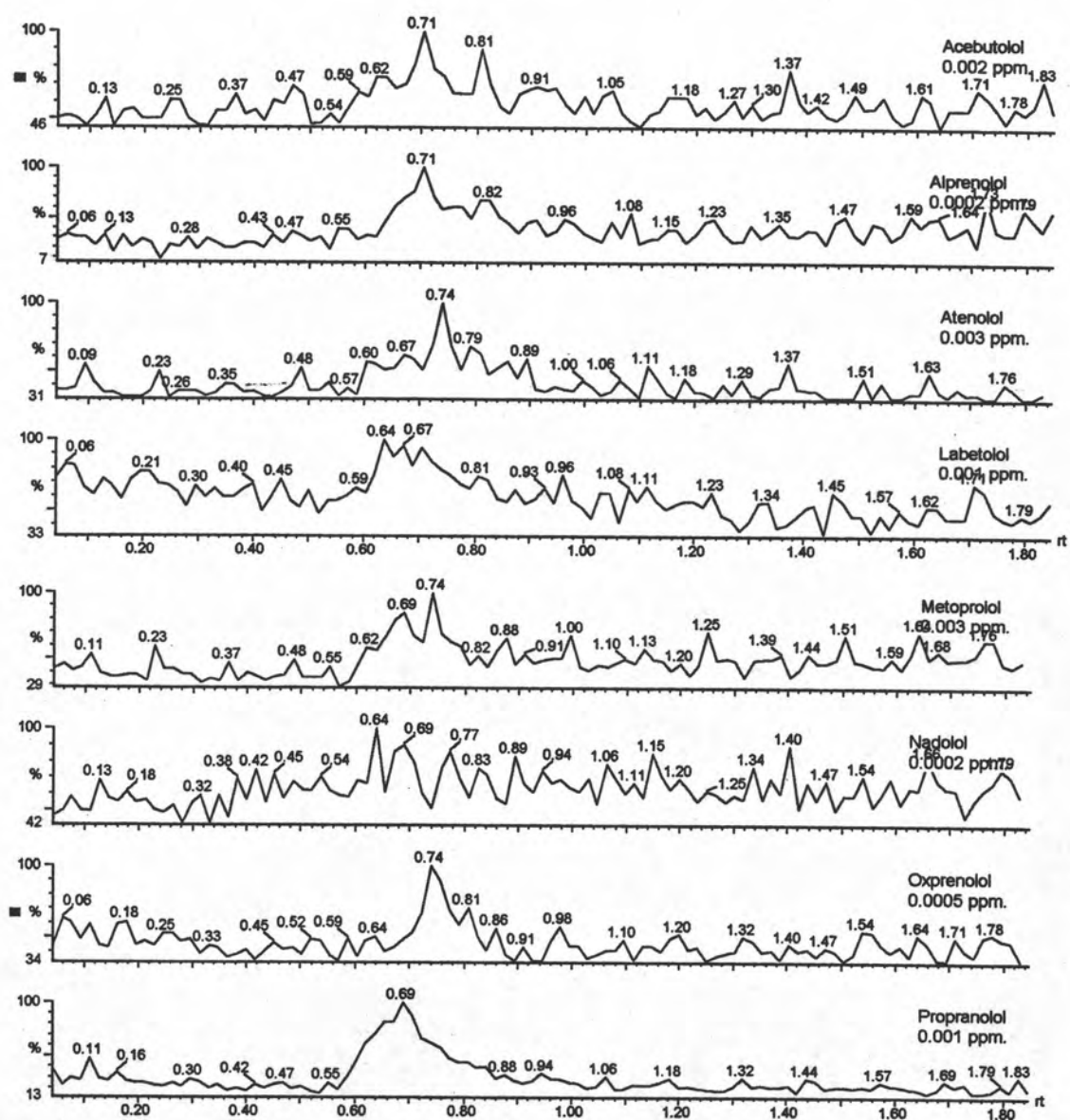


ภาพที่ 64 ผลของวัฏภาคเคลื่อนที่ต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC/MS

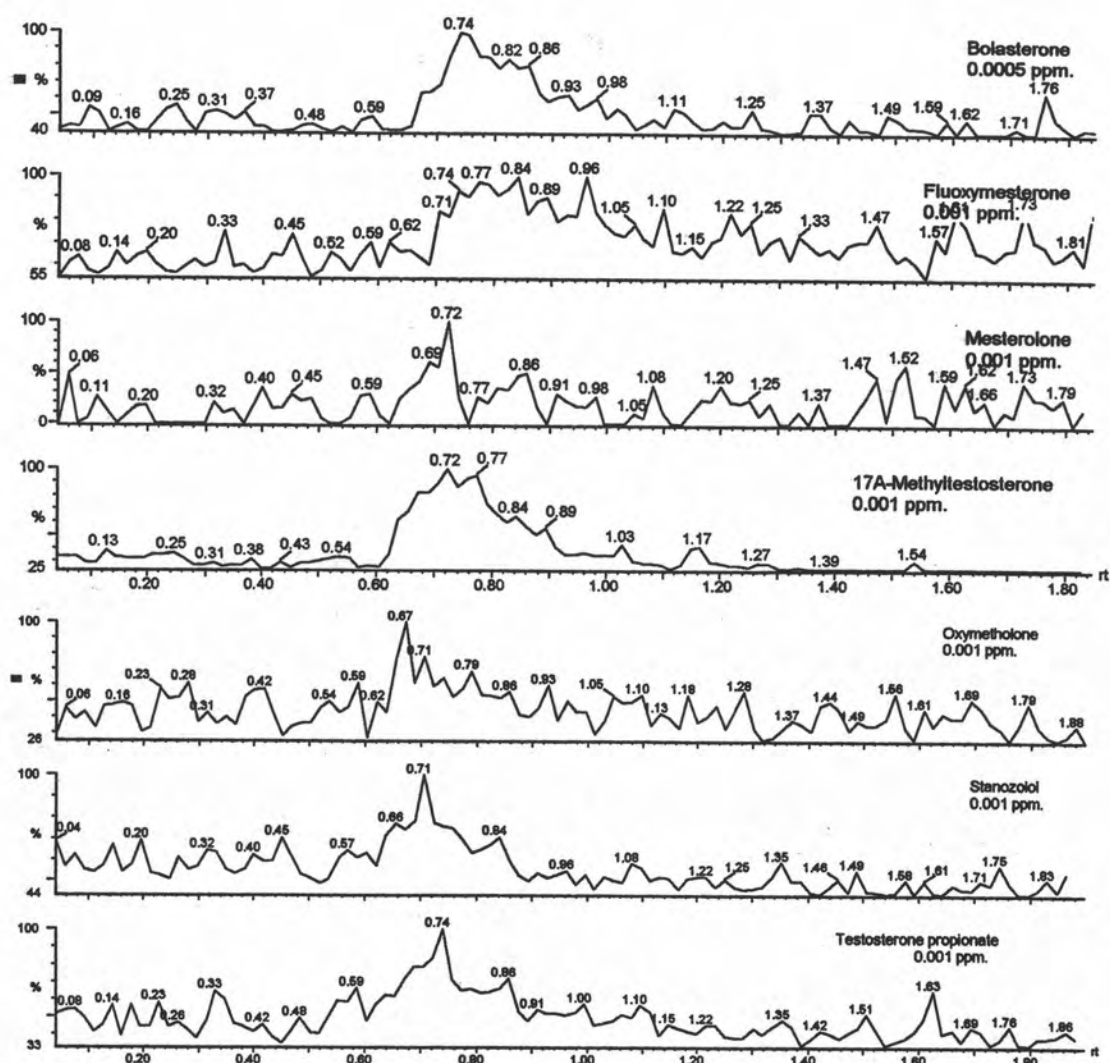
สรุปได้ว่าชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ การวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เหมือนกับตัวทำละลายที่เหมาะสมซึ่งใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เพราะจะทำให้ Base line เรียบเนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ขณะทำการวิเคราะห์

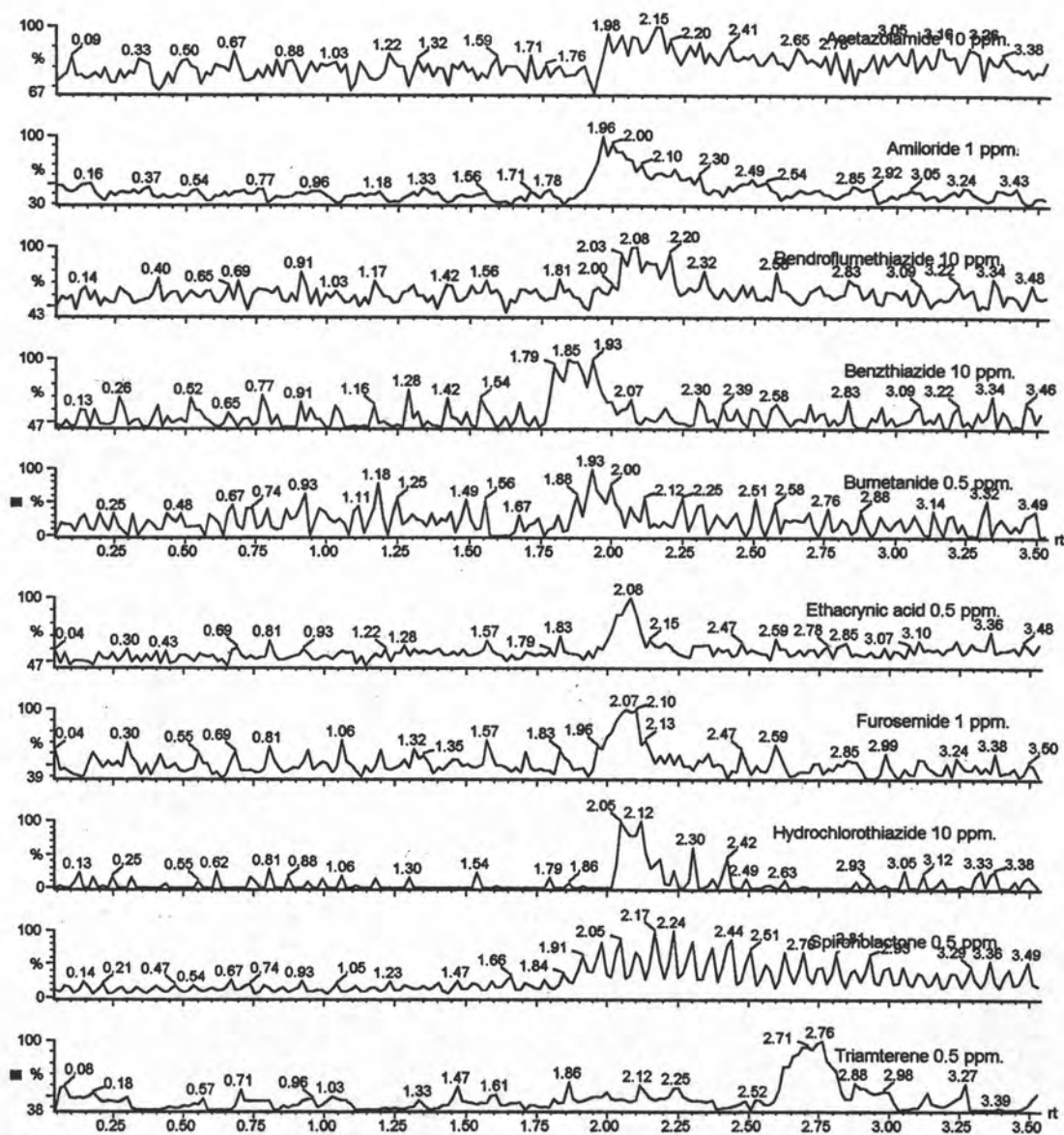
เมื่อทราบค่า cone voltage ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารแต่ละชนิด รวมทั้งทราบอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่แล้ว ได้ทำการทดลองหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบสาร (detection limit) โดยเลือกใช้ปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดสำหรับแต่ละสาร การทดลองในขั้นตอนนี้จะใช้หลักพิจารณา คือ สัญญาณที่บันทึกได้จากสารจะต้องสูงกว่าสัญญาณรบกวนมากกว่า 2 เท่า โดยวัดความสูงของสัญญาณรบกวนจากจุดที่ต่ำที่สุดถึงจุดที่สูงที่สุด (peak to peak) ดังแสดงในภาพที่ 65 - 67



ภาพที่ 65 สัญญาณที่ได้จากเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ขณะทดลองหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบยาปีคั่นบีตา



ภาพที่ 66 สัญญาณที่ได้จากเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ขณะทดลองหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบอะแนบอติสเตอรอยด์



ภาพที่ 67 สัญญาณที่ได้จากเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ขณะทดลองหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบยาขับปัสสาวะ

จากการหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบสารสามารถสรุปได้ดังตารางที่

ตารางที่ 16 Detection limit ของยาปิดกั้นบีตา

ชื่อ	สูตรเคมี	มวลโมเลกุล (Da.)	มวลโมเลกุล + 1 (Da.)	มวลของอิออนที่ เหมาะสม (Da.)	Cone Voltage (โวลต์)	detection limit (ppm.)
Acebutolol	$C_{18}H_{26}N_2O_4$	336.4	337	337	30	0.002
Alprenolol	$C_{15}H_{23}NO_2$	249.3	250	250	40	0.0002
Atenolol	$C_{14}H_{22}N_2O_4$	266.3	267	267	50	0.003
Labetolol	$C_{19}H_{24}N_2O_3$	328.4	329	329	20	0.001
Metoprolol	$C_{15}H_{25}NO_3$	267.4	268	268	30	0.003
Nadolol	$C_{17}H_{27}NO_4$	309.4	310	310	30	0.0002
Oxprenolol	$C_{16}H_{23}NO_3$	265.3	266	266	20	0.0005
Propranolol	$C_{16}H_{21}NO_2$	259.4	260	260	40	0.001

หลังจากหา detection limit ของยาปิดกั้นบีตาแล้วนำมาเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่น ๆ ได้ผลดังนี้ วิธีของ Poole และคณะ (38) ได้ทำการวิเคราะห์ Alprenolol ในพลาสมาโดยใช้ GC/NPD ในการวิเคราะห์ สามารถตรวจพบ Alprenolol ได้ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด 2.5 นาโนกรัม/มล. เปรียบเทียบกับเทคนิค LC/MS ซึ่งสามารถตรวจพบที่ความเข้มข้น 0.2 นาโนกรัม/มล. ซึ่งเทคนิค LC/MS สามารถตรวจพบ Alprenolol ได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า

เปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์ Metoprolol กับวิธีของ Gyllenhaal และ Hoffmann (39) ซึ่งใช้เทคนิค GC/FID ในการวิเคราะห์ พบว่า สามารถวิเคราะห์ Metoprolol ได้ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด 4 - 20 ไมโครโมล/มล. ขึ้นอยู่กับชนิดของเมทาบอลไลท์ของ Metoprolol ซึ่งมีค่าประมาณ 1.07 - 5.4 มก./มล. เปรียบเทียบกับเทคนิค LC/MS ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ 3 นาโนกรัม/มล. ซึ่งเทคนิค LC/MS สามารถตรวจพบได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า

เปรียบเทียบความไวในการวิเคราะห์ Propranolol กับวิธีของ Rule และ Henion (40) ซึ่งทำการวิเคราะห์ Propranolol โดยใช้เทคนิค LC/MS ซึ่งต่อกับคอลัมน์ Immunoaffinity ปรากฏว่าสามารถตรวจพบ Propranolol ได้ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด 2.5 พิโคกรัม/มล. และหากใช้ UV detector ในการตรวจวัดจะสามารถตรวจพบ Propranolol ได้ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด 250 พิโคกรัม/มล. เปรียบเทียบกับเทคนิค LC/MS ซึ่งไม่ได้ใช้คอลัมน์ สามารถตรวจพบ Propranolol ได้ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด 1 นาโนกรัม/มล. ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ Propranolol ของ Rule และ

Henion ซึ่งนำคอลัมน์ Immunoaffinity มาช่วยในการวิเคราะห์สามารถตรวจพบได้ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า

ตารางที่ 17 Detection limit ของอะแนบอลิกสเตอรอยด์

ชื่อ	สูตรเคมี	มวลโมเลกุล (Da.)	มวลโมเลกุล + 1 (Da.)	มวลของไอออนที่ เหมาะสม (Da.)	Cone Voltage (โวลต์)	detection limit (ppm.)
Bolasterone	$C_{21}H_{32}O_2$	316.5	317.5	317	50	0.0005
Fluoxymesterone	$C_{20}H_{26}FO_3$	336.4	337.4	337	40	0.001
Mesterolone	$C_{20}H_{32}O_2$	304.5	305.5	305	40	0.001
Methyltestosterone	$C_{20}H_{30}O_2$	302.5	303.5	303	30	0.001
Oxymetholone*	$C_{21}H_{32}O_3$	332.5	333.5	347	30	0.001
Stanozolol	$C_{21}H_{32}N_2O$	328.5	329.5	329	50	0.001
Testosterone- Propionate	$C_{22}H_{32}O_3$	344.5	345.5	345	40	0.001

หลังจากหา detection limit ของอะแนบอลิกสเตอรอยด์แล้วนำมาเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่น ๆ ได้ผลดังนี้ เปรียบเทียบความไวของอะแนบอลิกสเตอรอยด์ชนิด Stanozolol ซึ่ง Masse และคณะ (37) ได้ทำการวิเคราะห์โดยใช้ GC/MS สามารถตรวจพบ Stanozolol ได้ที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุด 1 นาโนกรัม/มล. สำหรับการวิเคราะห์สารมาตรฐาน หากวิเคราะห์ในปัสสาวะสามารถสามารถตรวจพบ Stanozolol ได้ที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุด 2 นาโนกรัม/มล. ส่วนวิธีของ Choo และคณะ (41) ซึ่งทำการวิเคราะห์ Stanozolol โดยใช้เทคนิค GC/MS สามารถสามารถตรวจพบ Stanozolol ได้ที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุด 1 นาโนกรัม/มล. ซึ่งเทคนิค LC/MS สามารถสามารถตรวจพบ Stanozolol ได้ที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุด 1 นาโนกรัม/มล. ซึ่งเทียบเท่ากับวิธีวิเคราะห์ของ Masse และคณะ และ วิธีของ Choo และคณะ

ตารางที่ 18 Detection limit ของยาขับปัสสาวะ

ชื่อ	สูตรเคมี	มวลโมเลกุล (Da.)	มวลโมเลกุล + 1 (Da.)	มวลของไอออนที่เหมาะสม (Da.)	Cone Voltage (โวลต์)	detection limit (ppm.)
Acetazolamide	$C_4H_6N_4O_3S_2$	222.2	223.2	222	40	10
Amiloride	$C_8H_8ClN_7O$	229.6	230.6	230	30	1
Bendroflumethiazide	$C_{15}H_{14}F_3N_3O_4S_2$	421.4	422.4	322	40	10
Benzthiazide	$C_{15}H_{14}ClN_3O_4S_3$	432.0	433.0	197	40	10
Bumetanide	$C_{17}H_{20}N_2O_6S$	364.4	365.4	365	30	0.5
Ethacrynic acid	$C_{13}H_{12}Cl_2O_4$	303.1	304.1	303	30	0.5
Furosemide	$C_{12}H_{11}ClN_3O_6S$	330.	331.8	251	30	1
Hydrochlorothiazide	$C_7H_8ClN_3O_4S_2$	297.7	298.7	298	50	10
Spirolactone	$C_{24}H_{32}O_4S$	416.6	417.6	341	50	0.5
Triamterene	$C_{12}H_{11}N_7$	253.3	254.3	253	50	0.5

เปรียบเทียบความไวของการวิเคราะห์ยาขับปัสสาวะกับวิธีของ Park และคณะ ซึ่งสามารถตรวจพบยาขับปัสสาวะทุกชนิดยกเว้น Amiloride โดยใช้ความเข้มข้นต่ำที่สุด 0.2 ไมโครกรัม/มล. ส่วน Amiloride สามารถตรวจพบโดยใช้ความเข้มข้นต่ำที่สุด 1 ไมโครกรัม/มล. และวิธีของ Bi และคณะ (42) ใช้เทคนิค GC/MS ตรวจพบ Amiloride ได้โดยใช้ความเข้มข้นต่ำที่สุด 0.12 ไมโครกรัม/มล. และ วิธีของ Saugy และคณะ (43) สามารถตรวจพบ Furosemide โดยใช้เทคนิค HPLC/fluorescence โดยใช้ความเข้มข้นต่ำที่สุด 0.12 ไมโครกรัม/มล. ซึ่งเทคนิค LC/MS สามารถตรวจพบยาขับปัสสาวะชนิด Acetazolamide, Bendroflumethiazide, Benzthiazide และ Hydrochlorothiazide โดยใช้ความเข้มข้นต่ำที่สุด 10 ไมโครกรัม/มล. สามารถตรวจพบยาขับปัสสาวะชนิด Amiloride และ Furosemide โดยใช้ความเข้มข้นต่ำที่สุด 1 ไมโครกรัม/มล. และ สามารถตรวจพบยาขับปัสสาวะชนิด Bumetanide, Ethacrynic acid, Spirolactone และ Triamterene โดยใช้ความเข้มข้นต่ำที่สุด 0.5 ไมโครกรัม/มล. ซึ่งเทคนิค LC/MS มีความไวในการวิเคราะห์ Amiloride เท่ากับวิธีของ Park และคณะ แต่มีความไว้น้อยกว่าวิธีของ Bi และคณะ ส่วนยาขับปัสสาวะชนิดอื่นเทคนิค LC/MS มีความไวในการวิเคราะห์ต่ำกว่าวิธีของ Park และคณะ และ Saugy และคณะ

การทดลองนี้หาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบสารโดยเลือกวิเคราะห์โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับสารแต่ละชนิด ในการวิเคราะห์จริงจะใช้ cone voltage ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารทั้งกลุ่ม ซึ่งต้องทำการทดลองหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบอีกครั้งที่สภาวะดังกล่าว

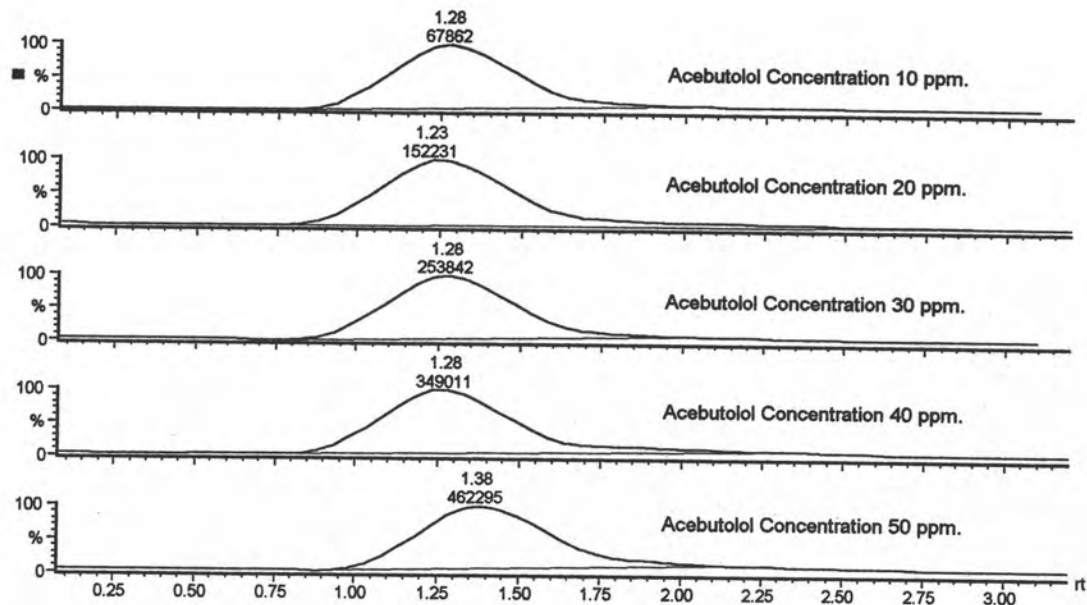
การวิเคราะห์ปริมาณสารต้องห้าม

1. การสร้างกราฟมาตรฐาน

หลังจากทำการหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบสารชนิดต่าง ๆ แล้วจึงทำการหาช่วงที่กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง (linearity range) โดยทดลองในช่วง 0 - 50 ไมโครกรัม/มล. ซึ่งถือว่าเพียงพอในทางปฏิบัติเนื่องจากสารต้องห้ามชนิดต่าง ๆ จะถูกขับออกมาทางปัสสาวะในความเข้มข้นต่ำมาก จึงทดลองหาช่วงที่กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงถึง 50 ไมโครกรัม/มล. เท่านั้น

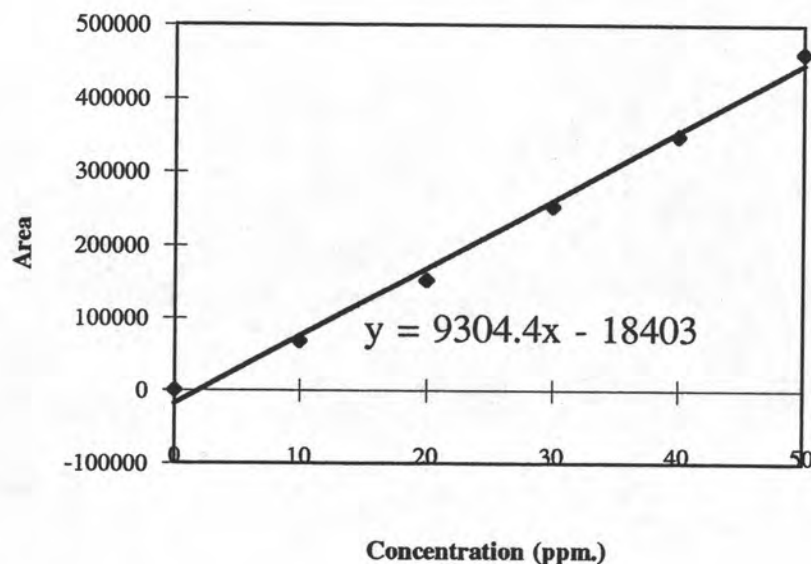
ทำการสร้างกราฟมาตรฐานของสารต้องห้ามชนิดต่าง ๆ โดยใช้ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัม/มล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใช้ Methanol 70 % ในน้ำเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ยาปิดกั้นบีตาและอะแนบอติกสเตอรอยด์ และ Ethanol 70 % ในน้ำเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ยาขับปัสสาวะ ใช้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 0.7 มล./นาที และใช้ cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับสารต้องห้ามแต่ละชนิด หลังจากทำการวิเคราะห์แล้วทำการคำนวณพื้นที่ที่ได้พิกแล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สมการถดถอยเชิงเส้นตรง กราฟมาตรฐานของสารต้องห้ามชนิดต่าง ๆ เป็นดังนี้

ยาปิดกั้นบีตา

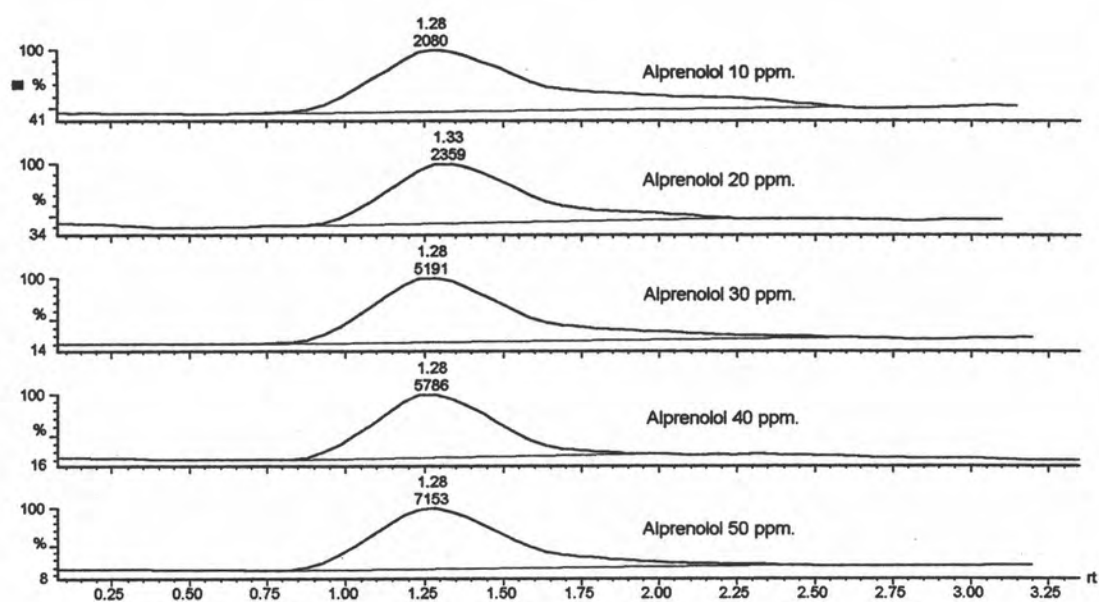


ภาพที่ 68 พื้นที่ใต้กราฟของ Acebutolol ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 69

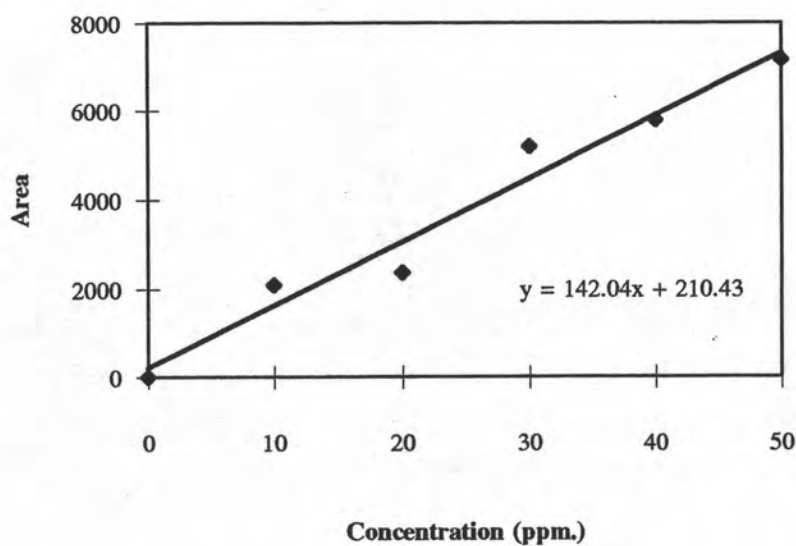


ภาพที่ 69 กราฟมาตรฐานของ Acebutolol

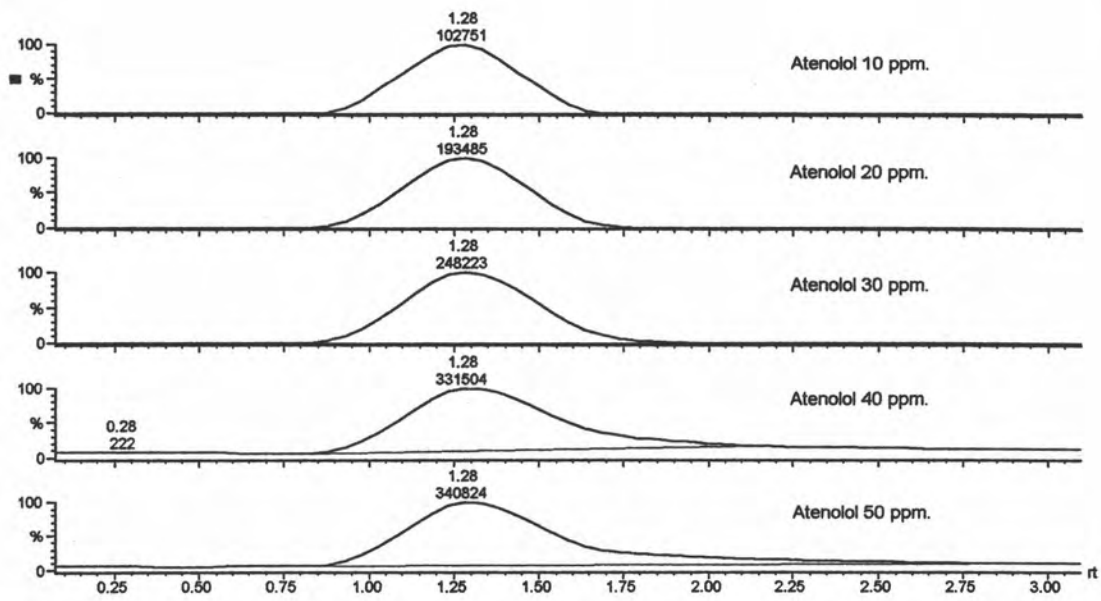


ภาพที่ 70 พื้นที่ใต้กราฟของ Alprenolol ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 71

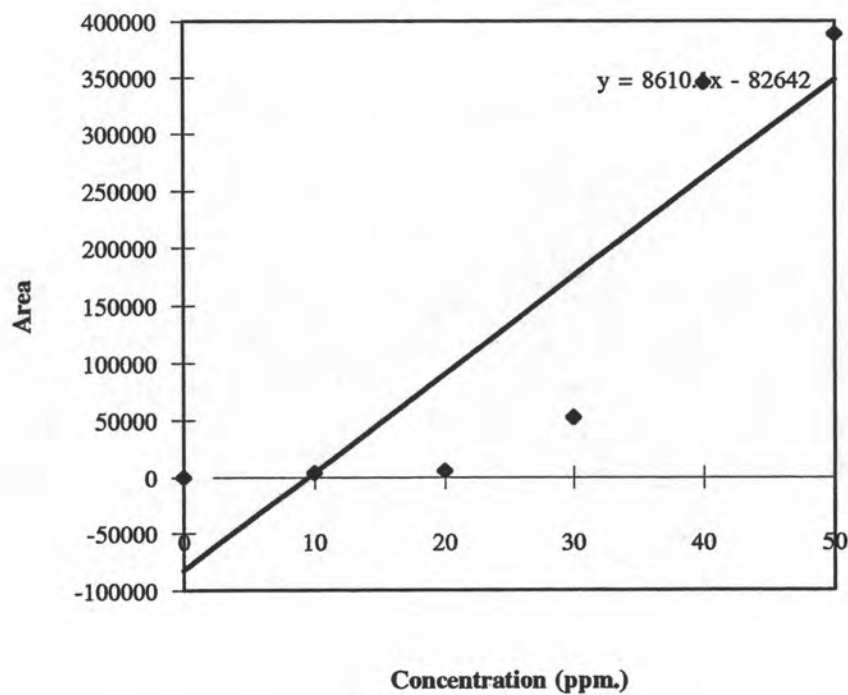


ภาพที่ 71 กราฟมาตรฐานของ Alprenolol

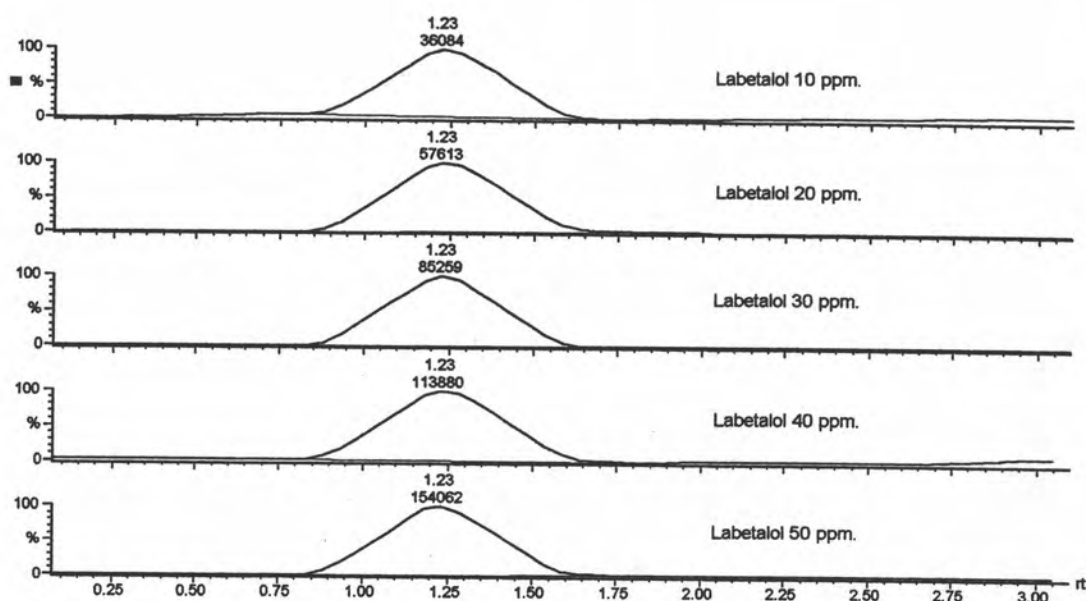


ภาพที่ 72 พื้นที่ใต้กราฟของ Atenolol ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 73

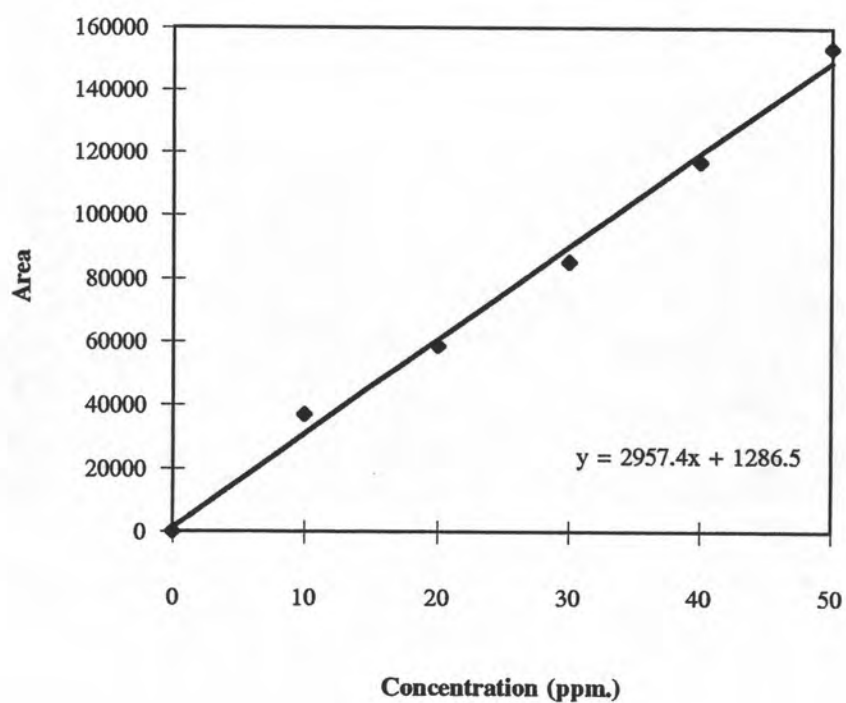


ภาพที่ 73 กราฟมาตรฐานของ Atenolol

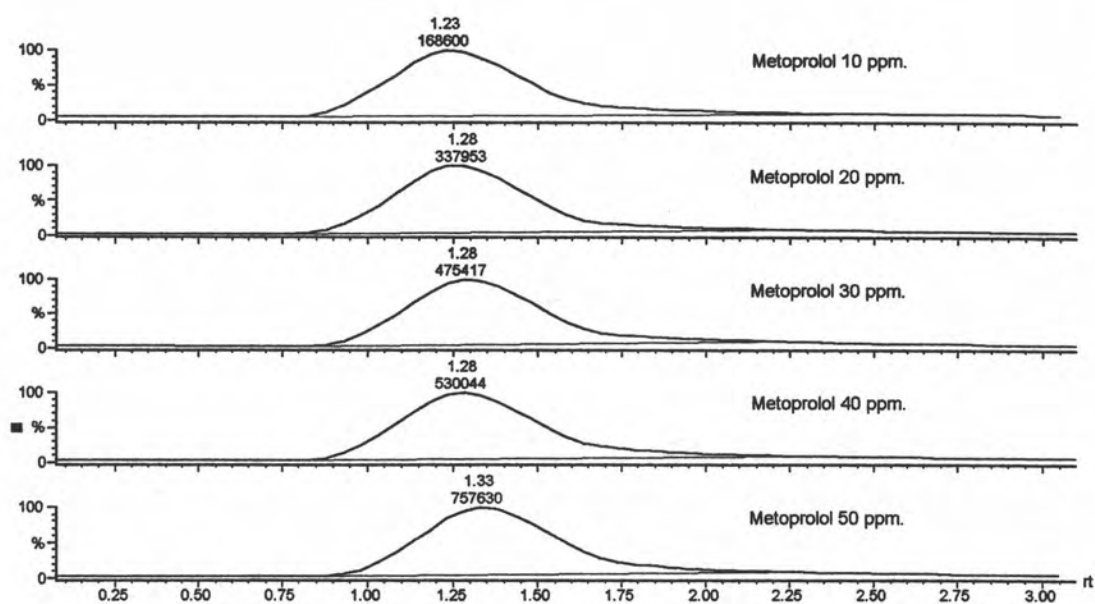


ภาพที่ 74 พื้นที่ใต้กราฟของ Labetalol ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm. 75

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 75

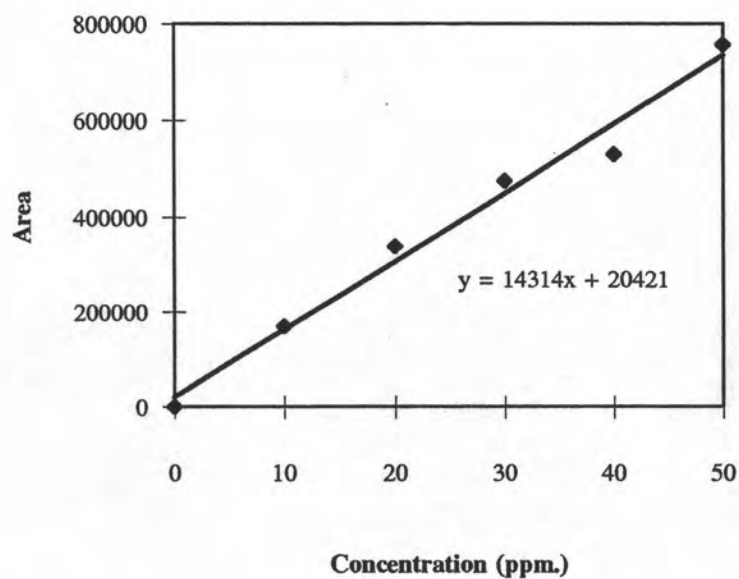


ภาพที่ 75 กราฟมาตรฐานของ Labetalol

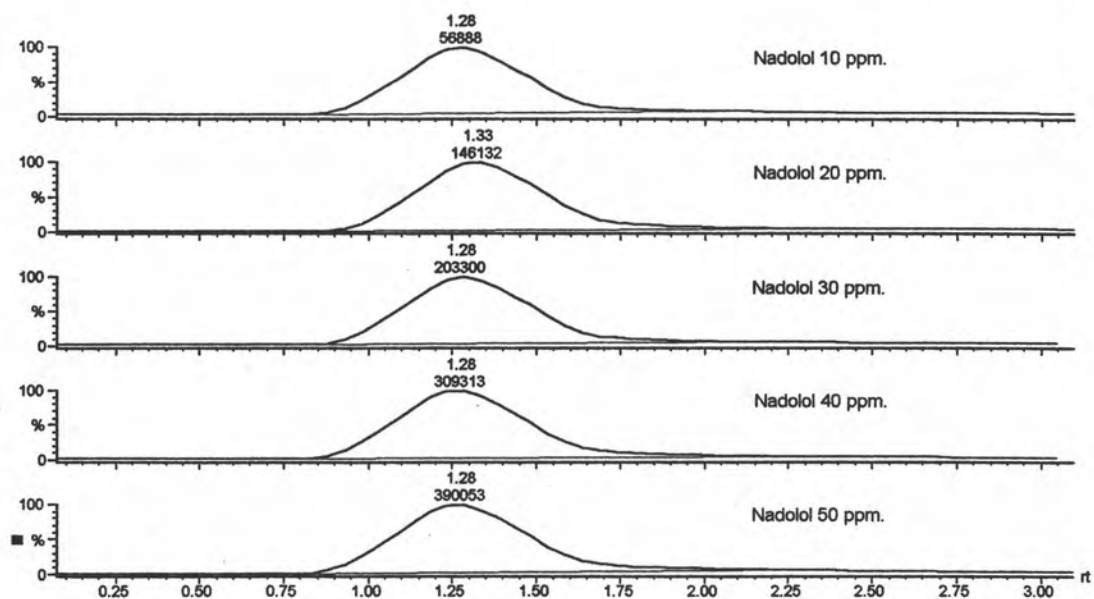


ภาพที่ 76 พื้นที่ใต้กราฟของ Metoprolol ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 77

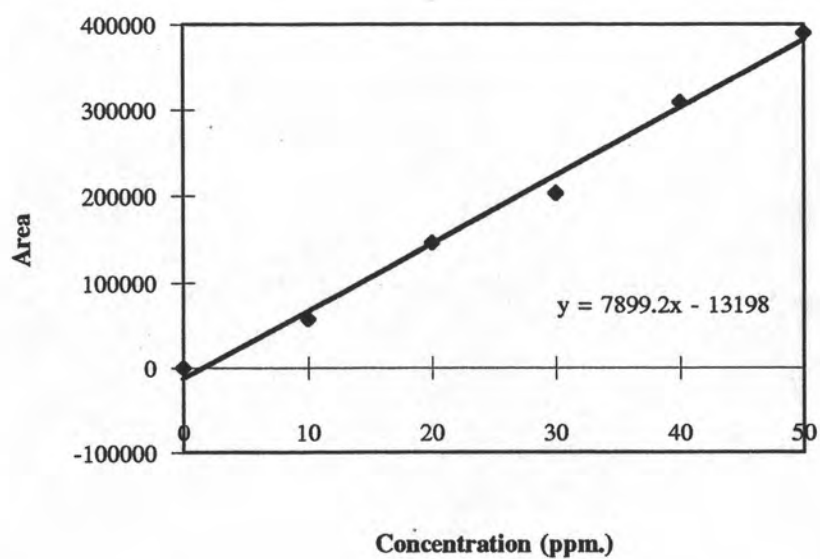


ภาพที่ 77 กราฟมาตรฐานของ Metoprolol

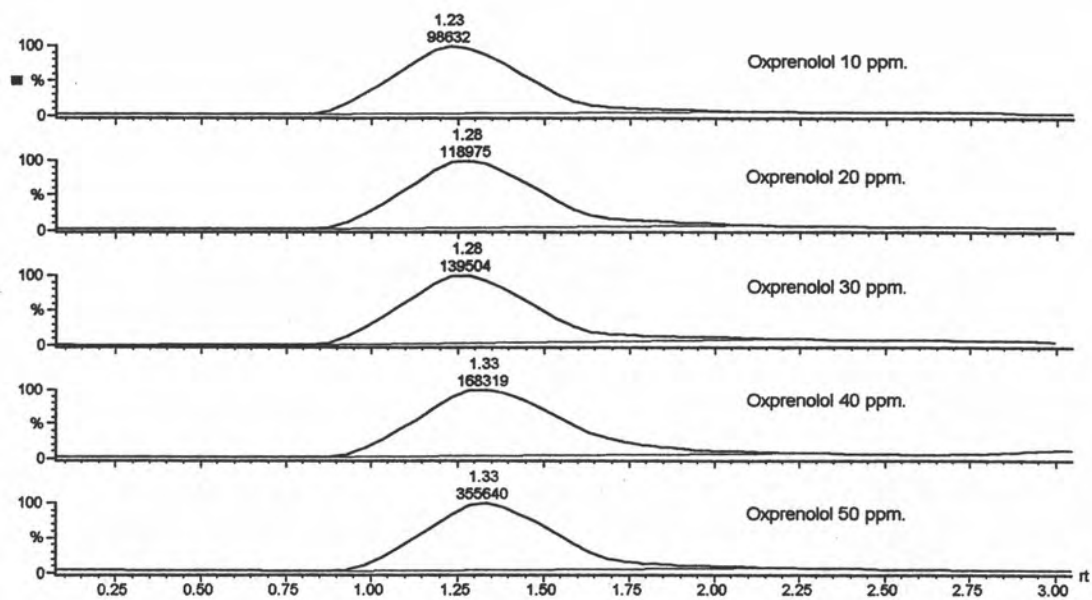


ภาพที่ 78 พื้นที่ใต้กราฟของ Nadolol ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 79

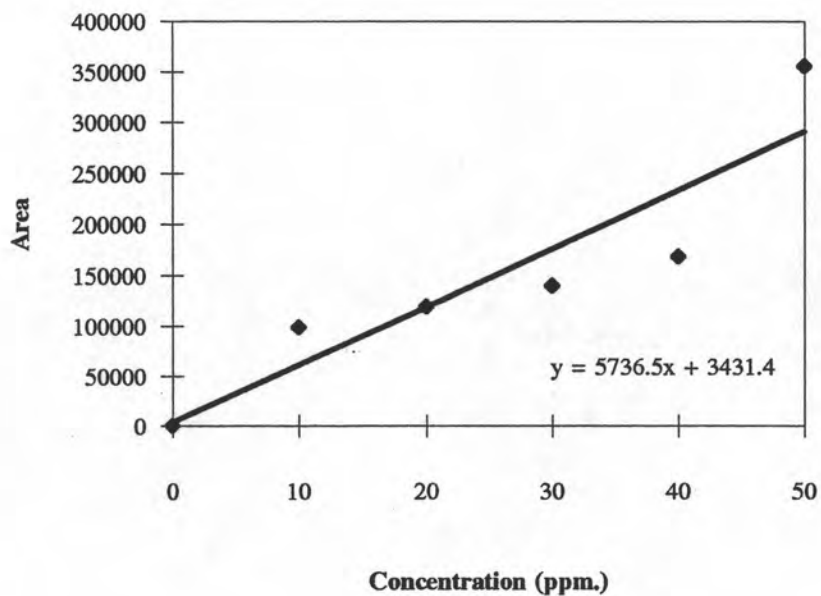


ภาพที่ 79 กราฟมาตรฐานของ Nadolol

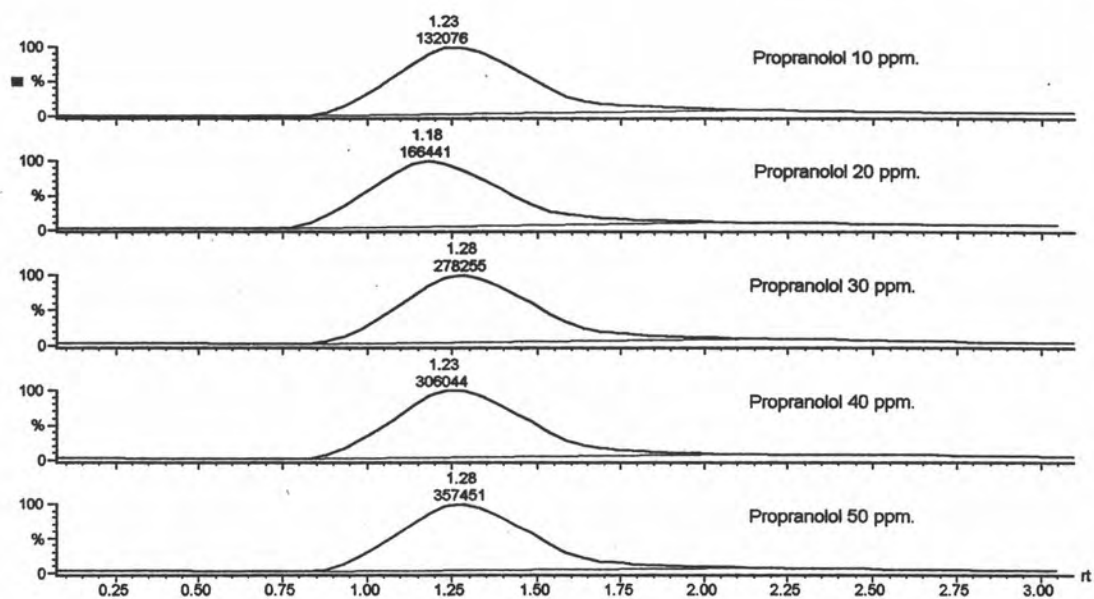


ภาพที่ 80 พื้นที่ใต้กราฟของ Oxprenolol ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 81

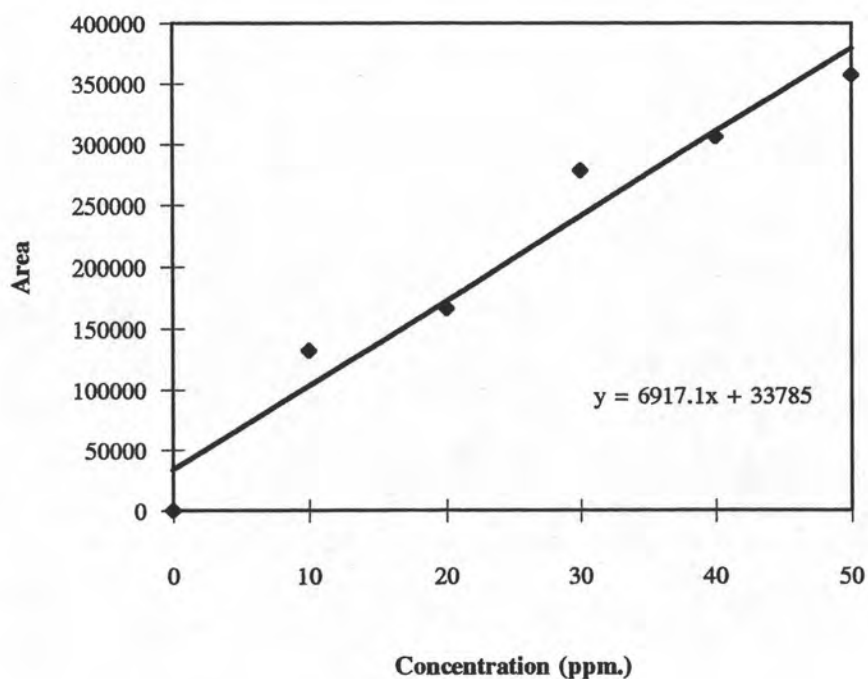


ภาพที่ 81 กราฟมาตรฐานของ Oxprenolol

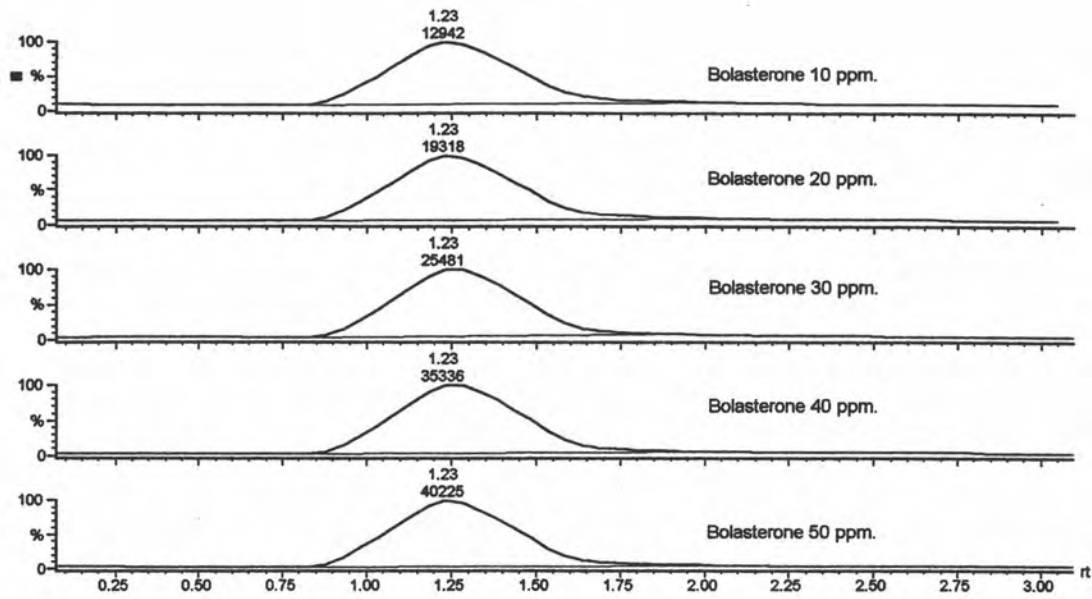


ภาพที่ 82 พื้นที่ใต้กราฟของ Propranolol ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 83

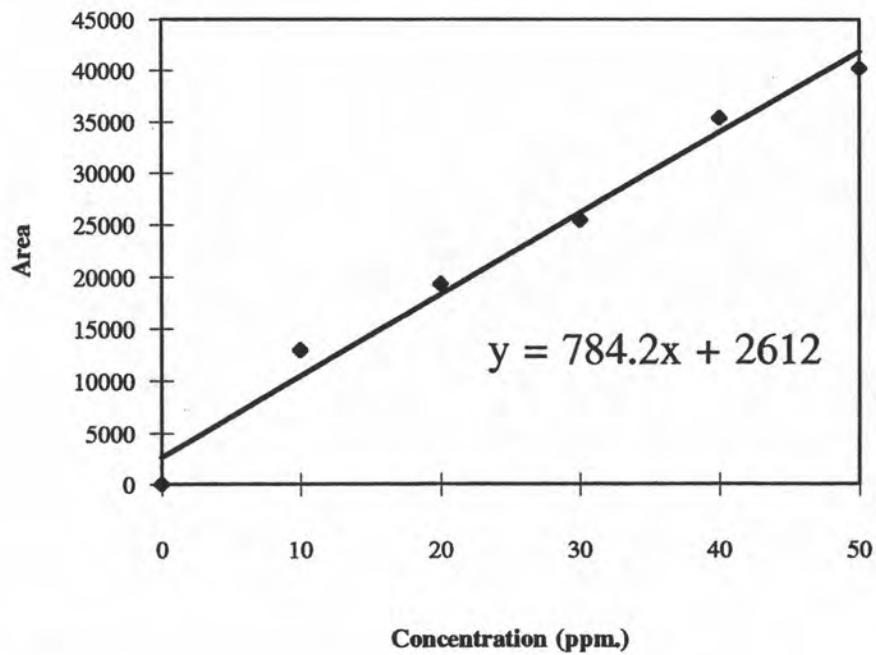


ภาพที่ 83 กราฟมาตรฐานของ Propranolol

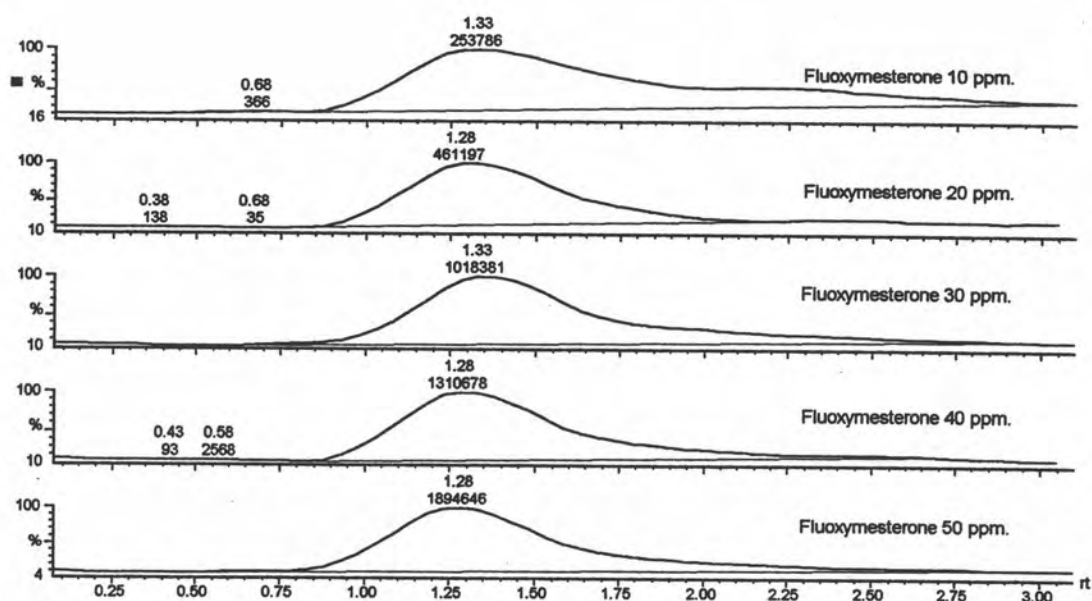


ภาพที่ 84 พื้นที่ใต้กราฟของ Bolasterone ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 85

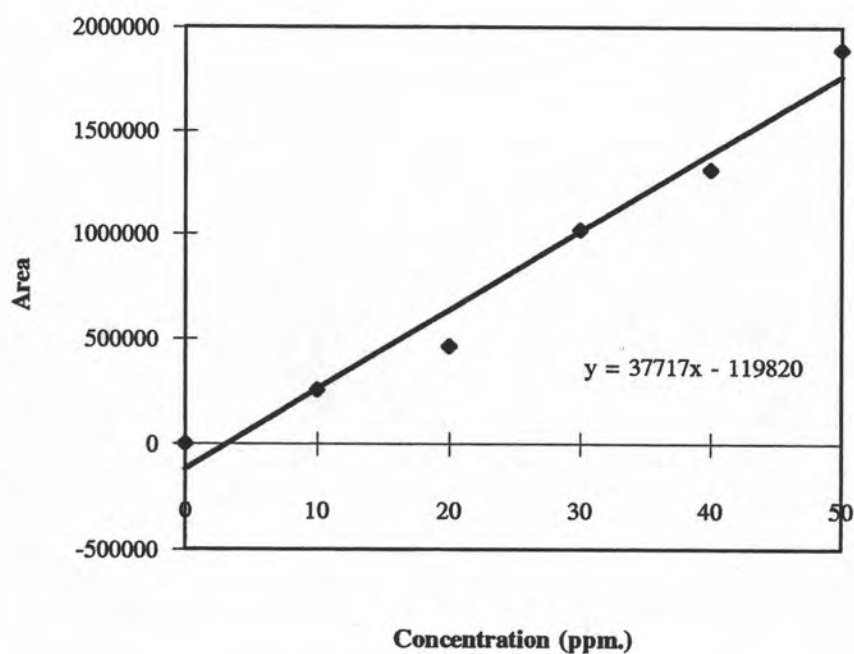


ภาพที่ 85 กราฟมาตรฐานของ Bolasterone

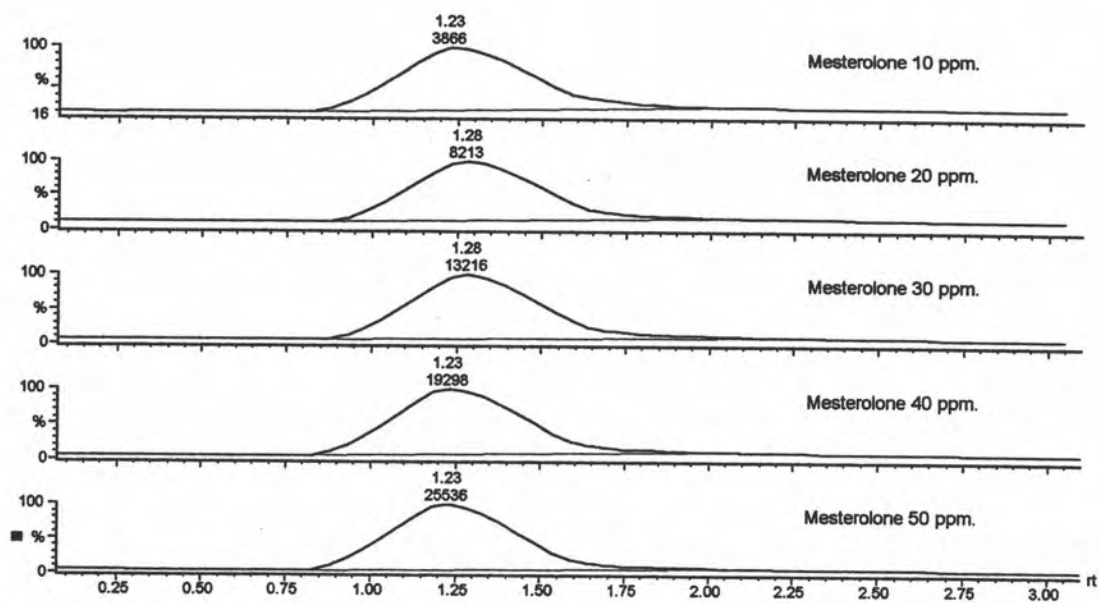


ภาพที่ 86 พื้นที่ใต้กราฟของ Fluoxymesterone ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ที่ได้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 87

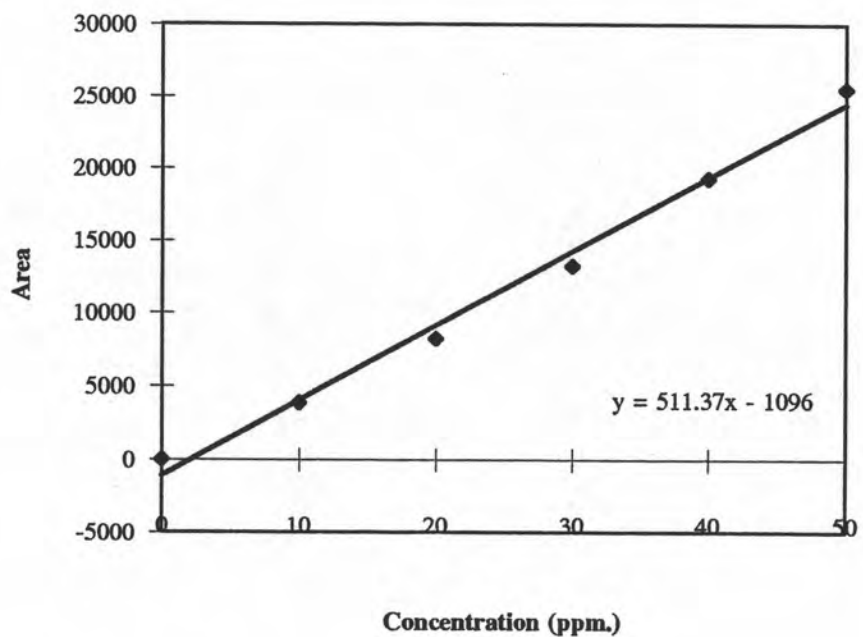


ภาพที่ 87 กราฟมาตรฐานของ Fluoxymesterone

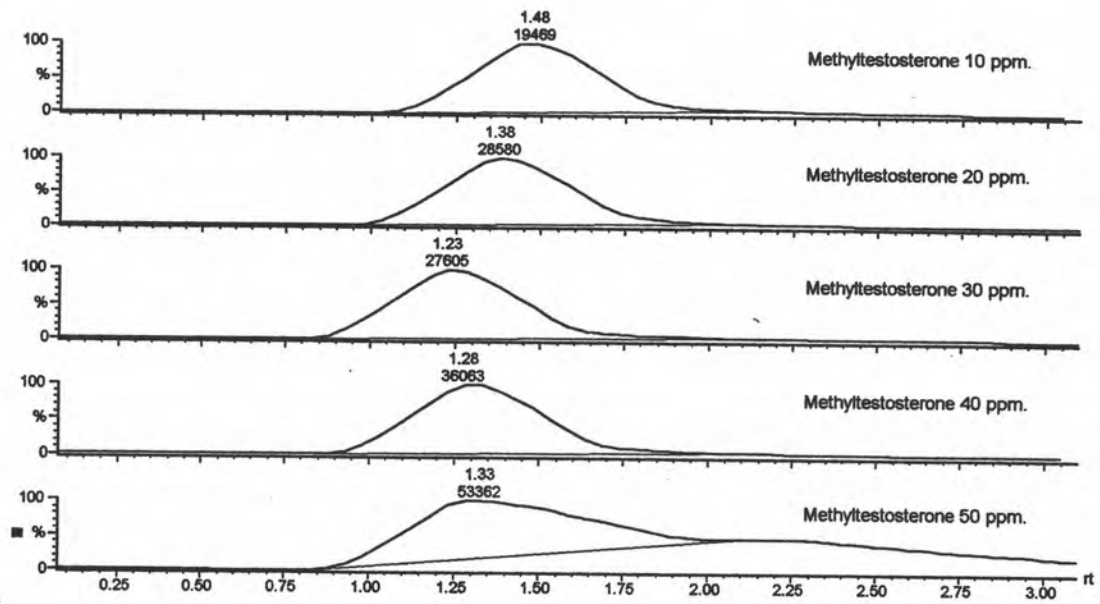


ภาพที่ 88 พื้นที่ใต้กราฟของ Mesterolone ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 89

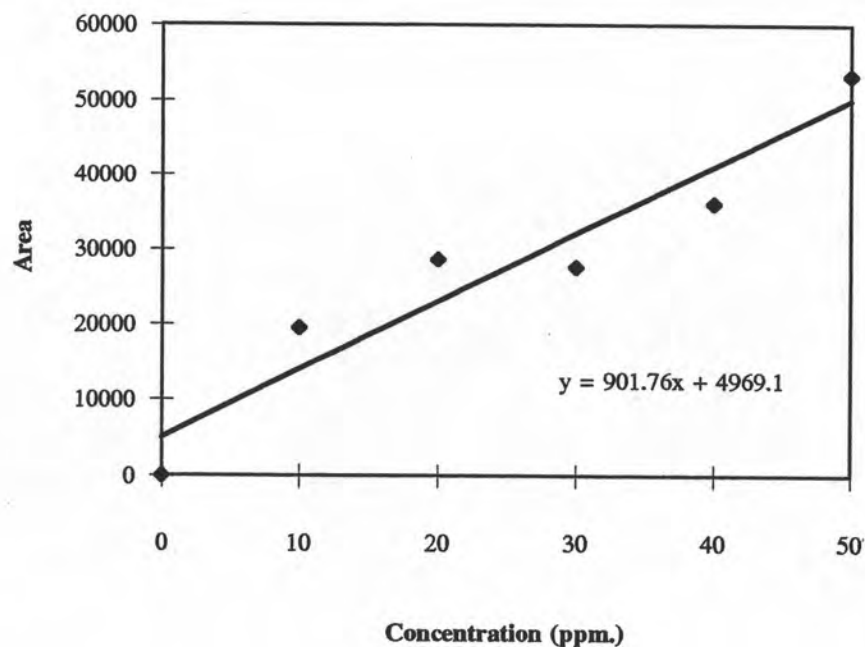


ภาพที่ 89 กราฟมาตรฐานของ Mesterolone

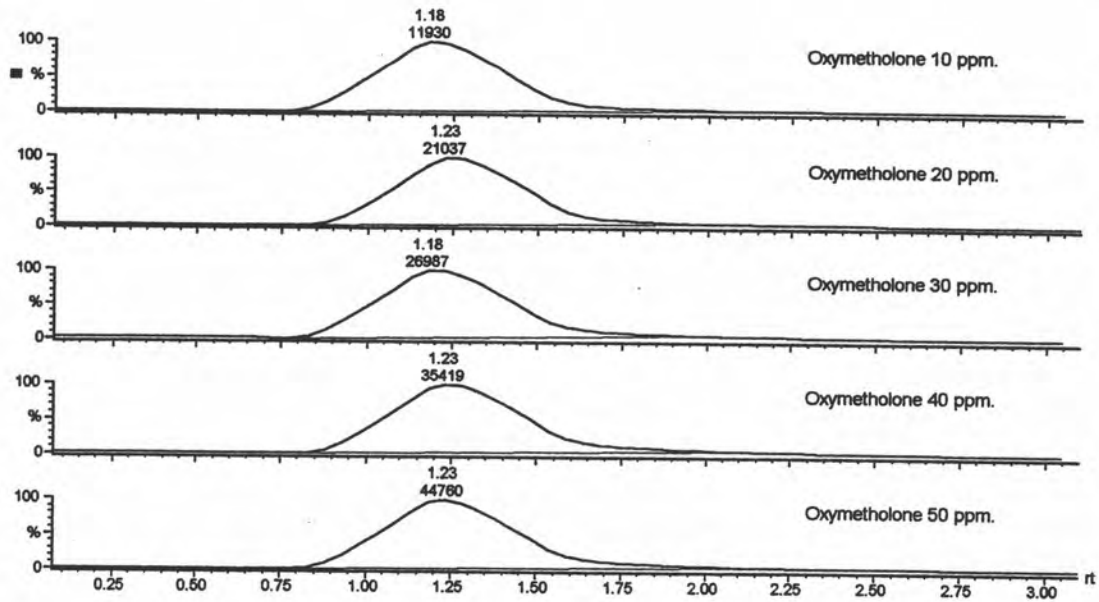


ภาพที่ 90 พื้นที่ใต้กราฟของ Methyltestosterone ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 91

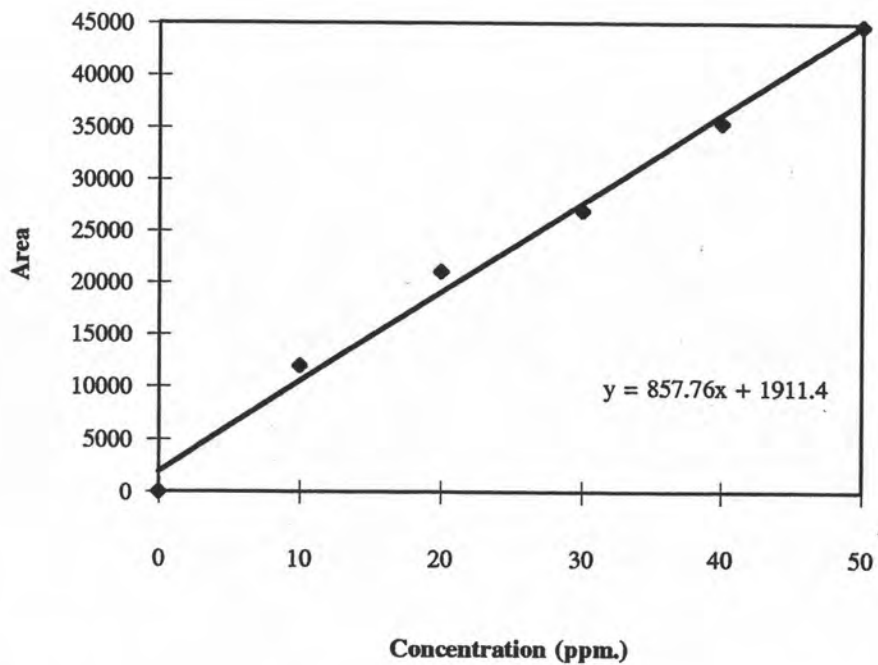


ภาพที่ 91 กราฟมาตรฐานของ Methyltestosterone

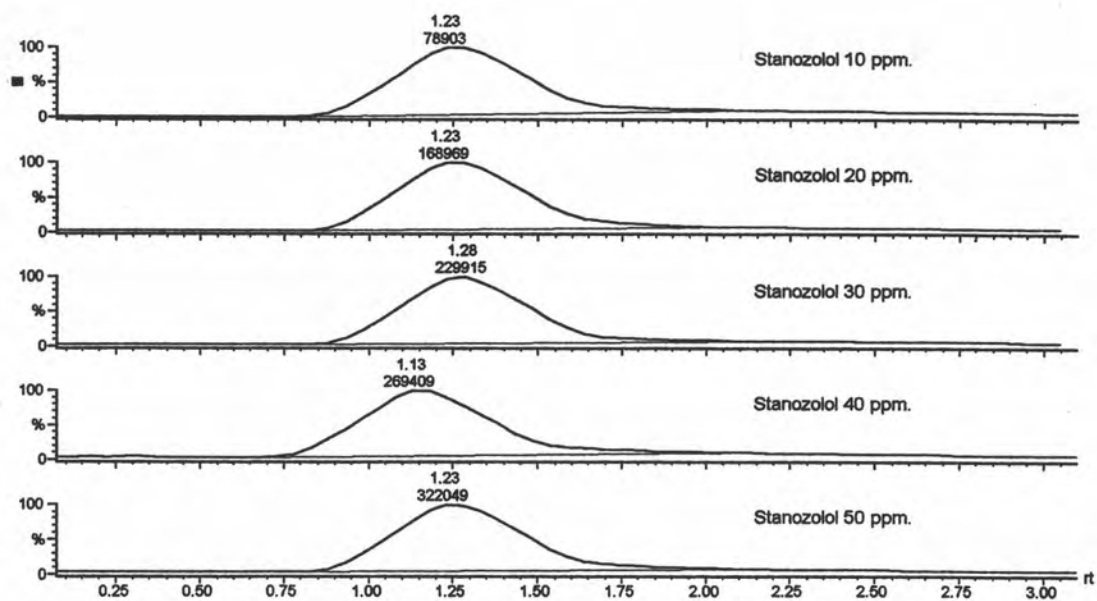


ภาพที่ 92 พื้นที่ใต้กราฟของ Oxymetholone ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 93

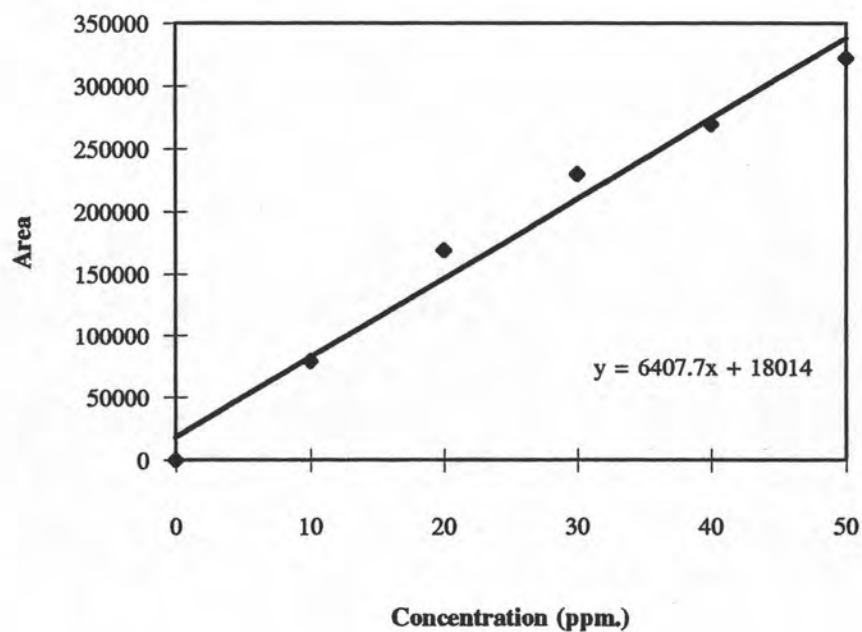


ภาพที่ 93 กราฟมาตรฐานของ Oxymetholone

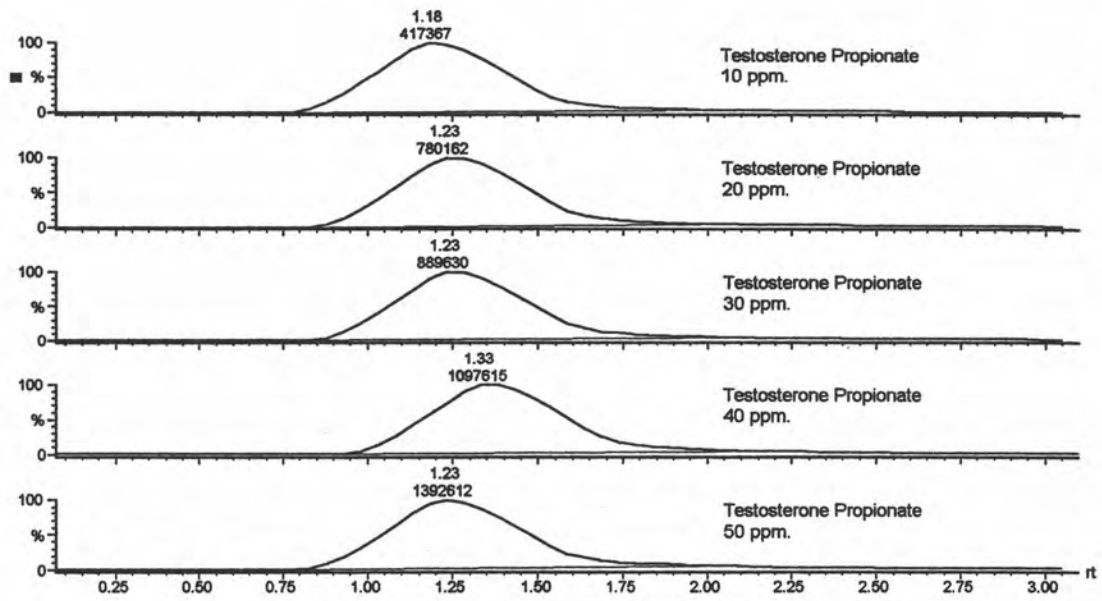


ภาพที่ 94 พื้นที่ใต้กราฟของ Stanozolol ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 95

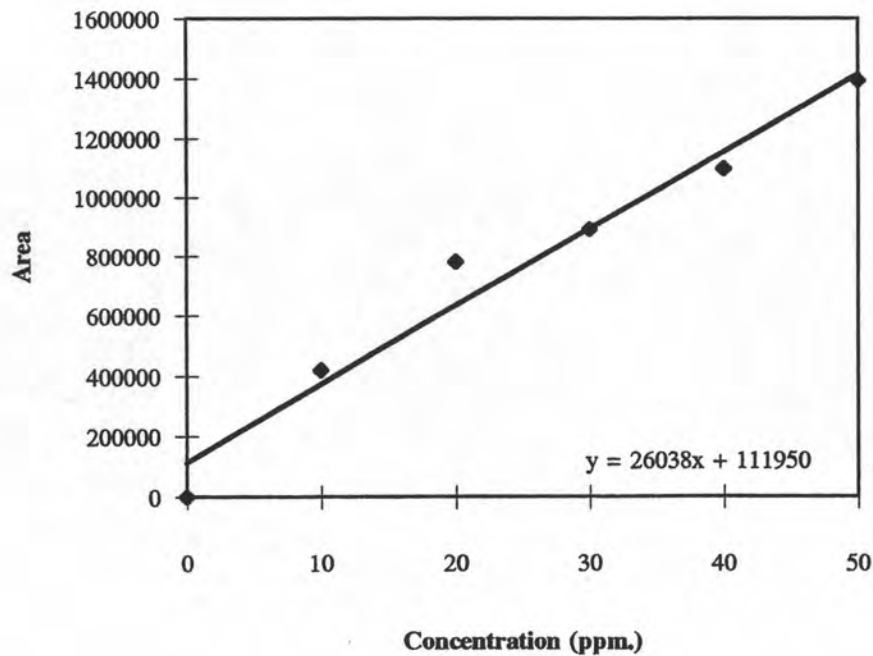


ภาพที่ 95 กราฟมาตรฐานของ Stanozolol

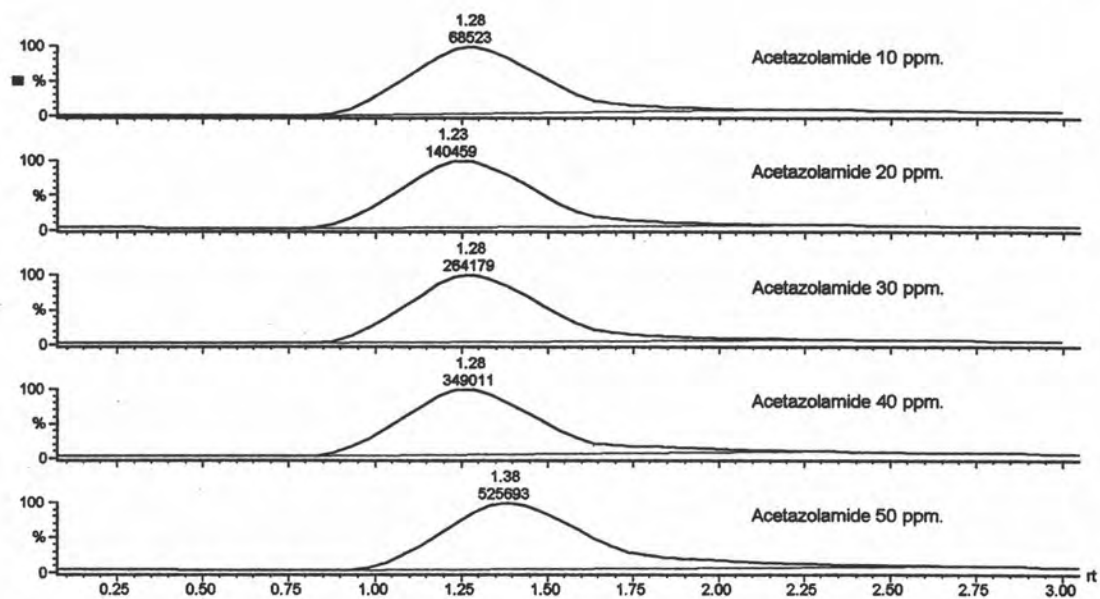


ภาพที่ 96 พื้นที่ใต้กราฟของ Testosterone propionate ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 97

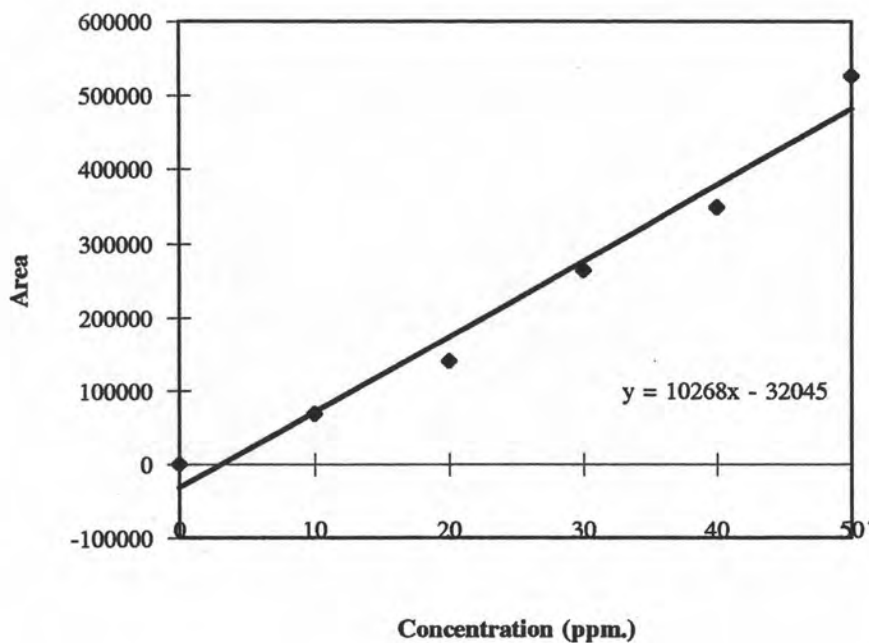


ภาพที่ 97 กราฟมาตรฐานของ Testosterone propionate

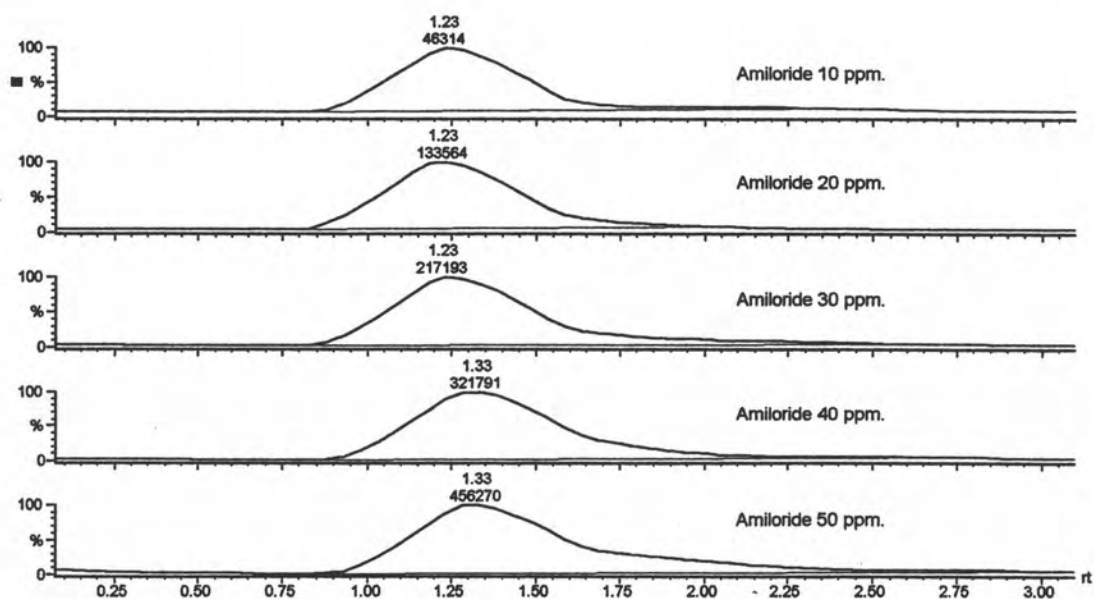


ภาพที่ 98 พื้นที่ใต้กราฟของ Acetazolamide ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 99

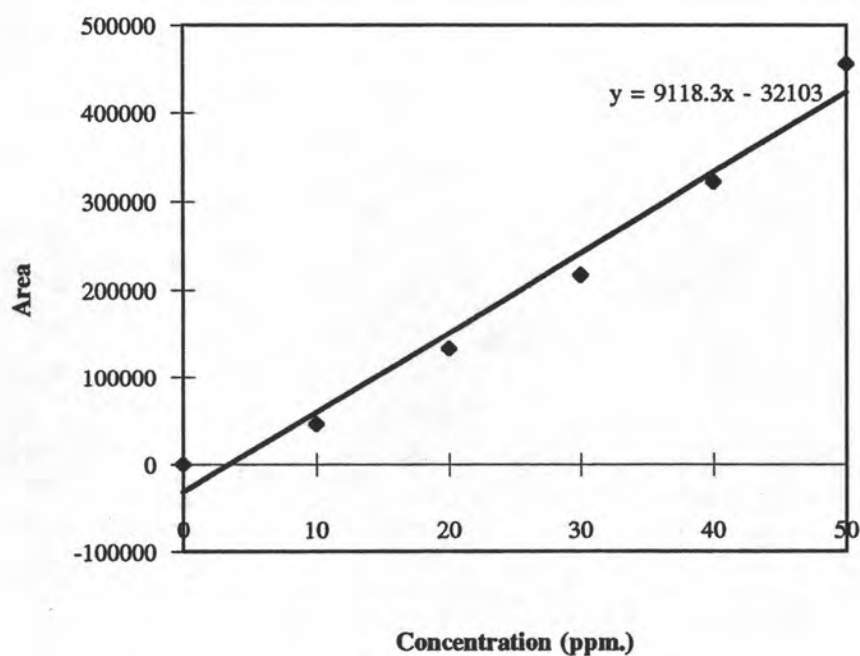


ภาพที่ 99 กราฟมาตรฐานของ Acetazolamide

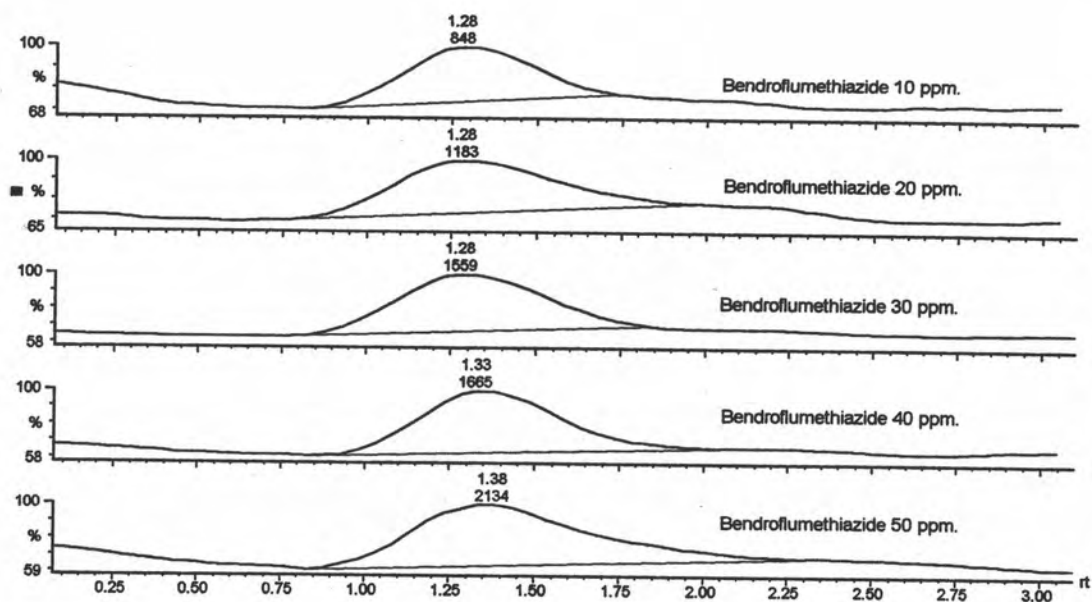


ภาพที่ 100 พื้นที่ใต้กราฟของ Amiloride ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 101

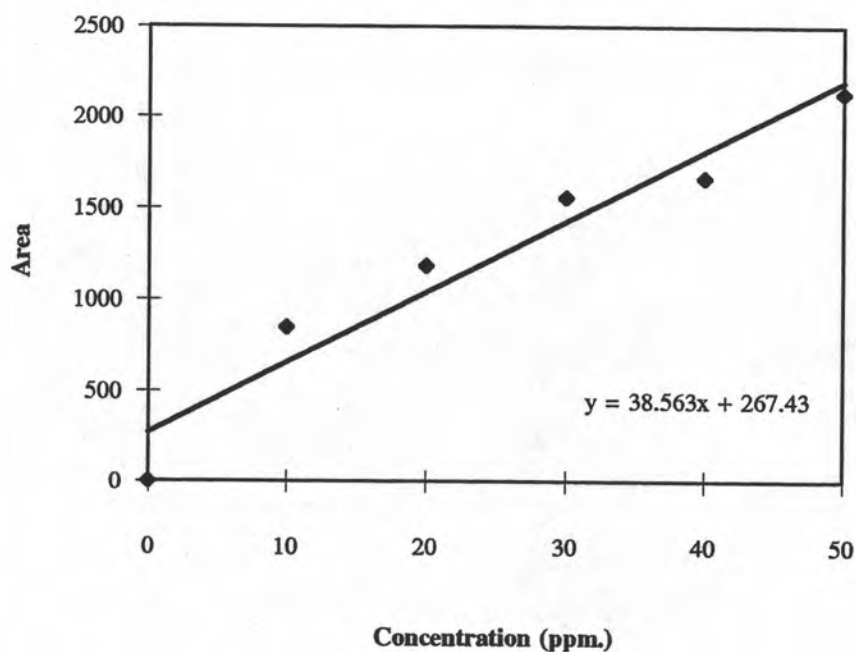


ภาพที่ 101 กราฟมาตรฐานของ Amiloride

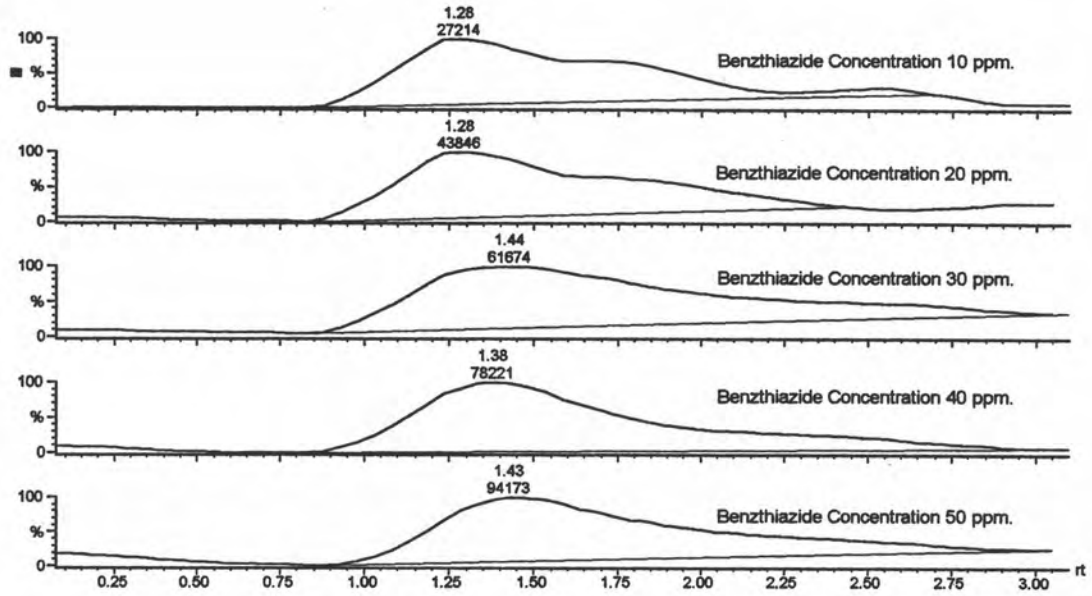


ภาพที่ 102 พื้นที่ใต้กราฟของ Bendroflumethiazide ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 103

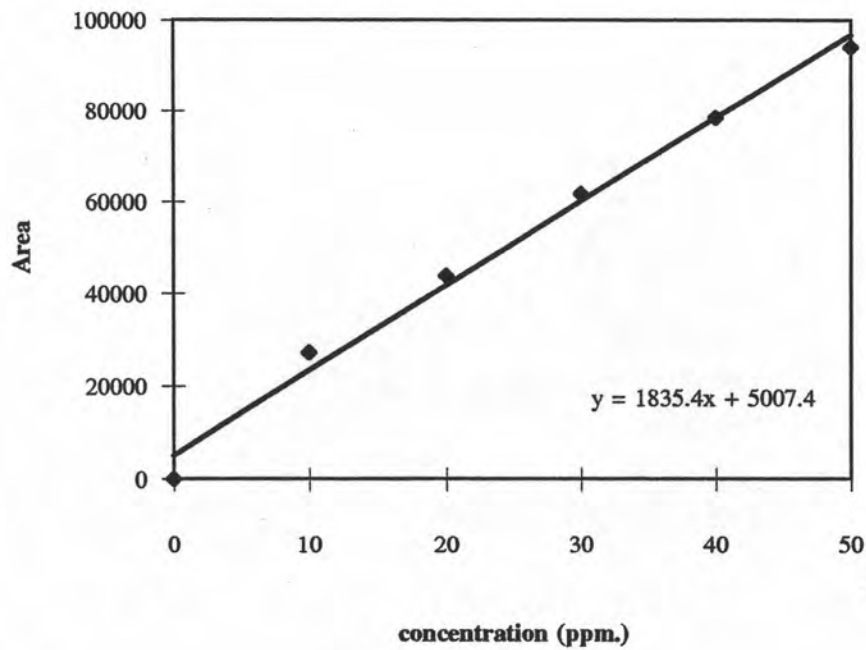


ภาพที่ 103 กราฟมาตรฐานของ Bendroflumethiazide

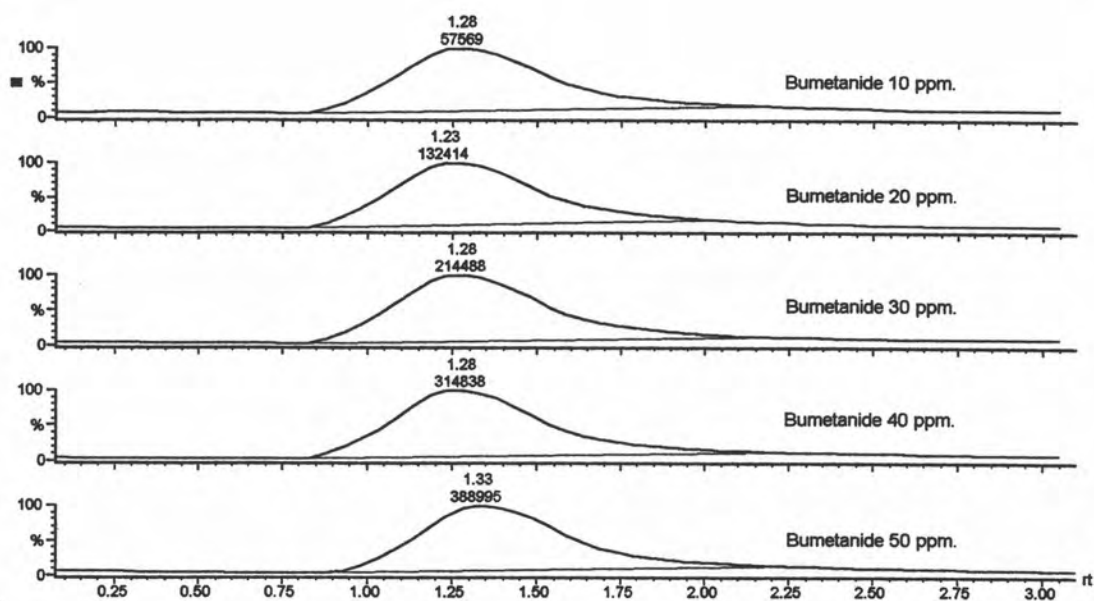


ภาพที่ 104 พื้นที่ใต้กราฟของ Benzthiazide ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 105

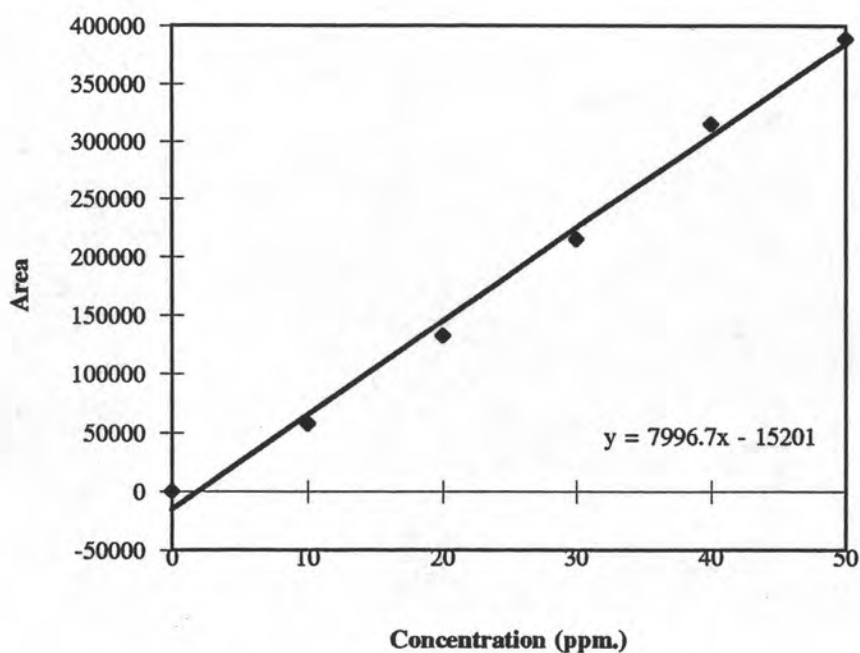


ภาพที่ 105 กราฟมาตรฐานของ Benzthiazide

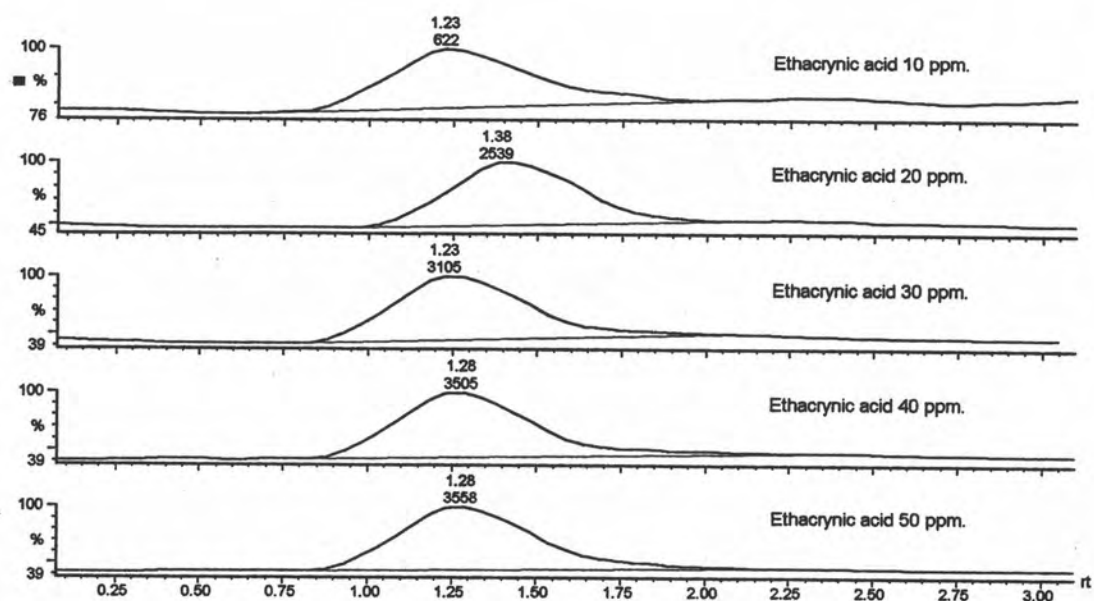


ภาพที่ 106 พื้นที่ใต้กราฟของ Bumetanide ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 107

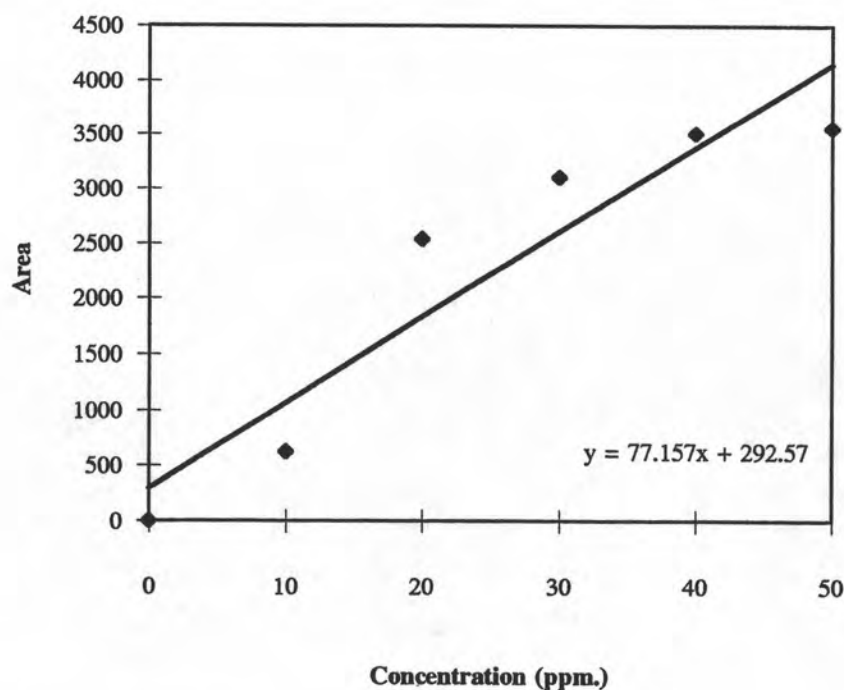


ภาพที่ 107 กราฟมาตรฐานของ Bumetanide

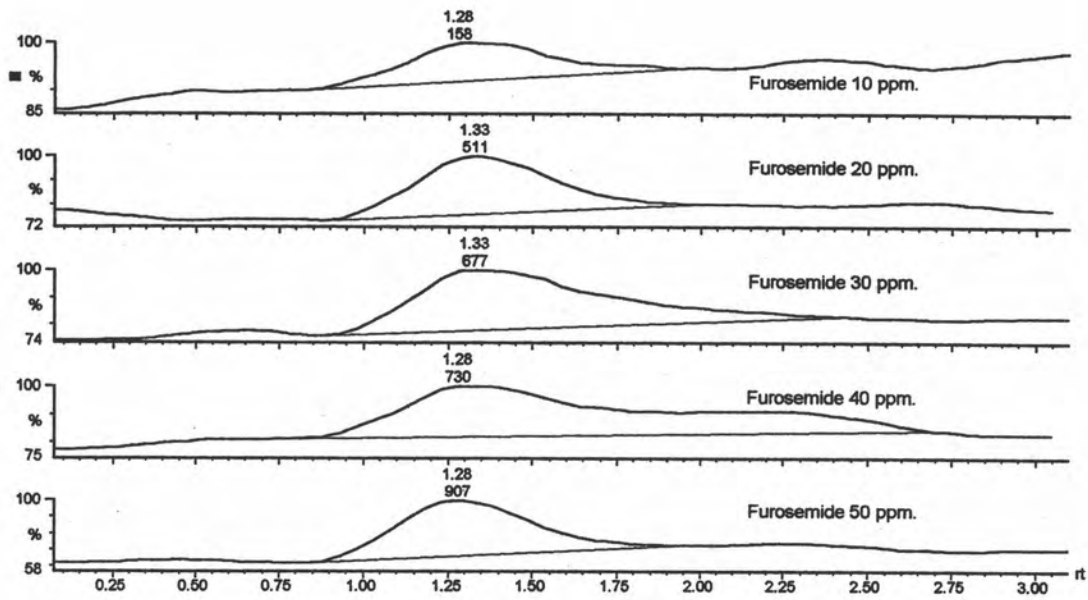


ภาพที่ 108 พื้นที่ใต้กราฟของ Ethacrynic acid ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 109

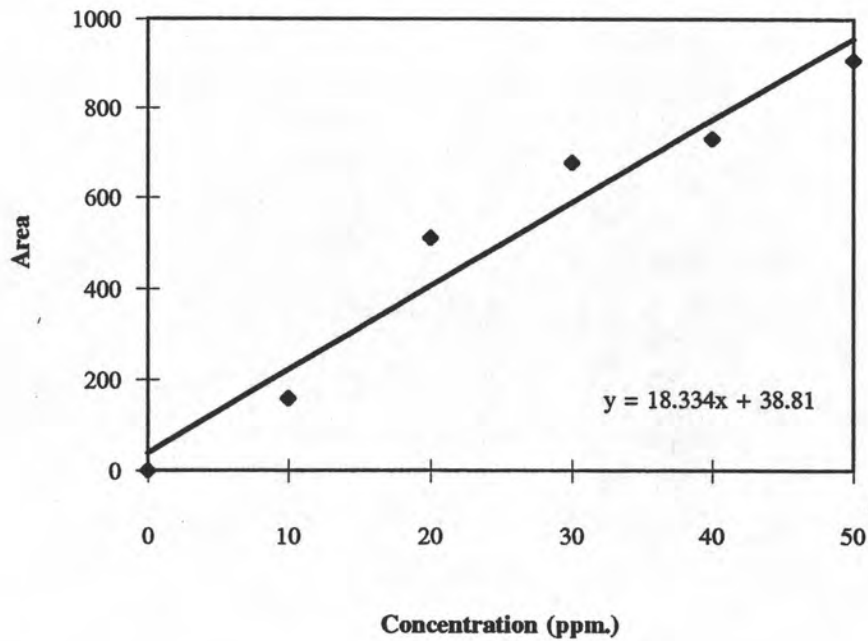


ภาพที่ 109 กราฟมาตรฐานของ Ethacrynic acid

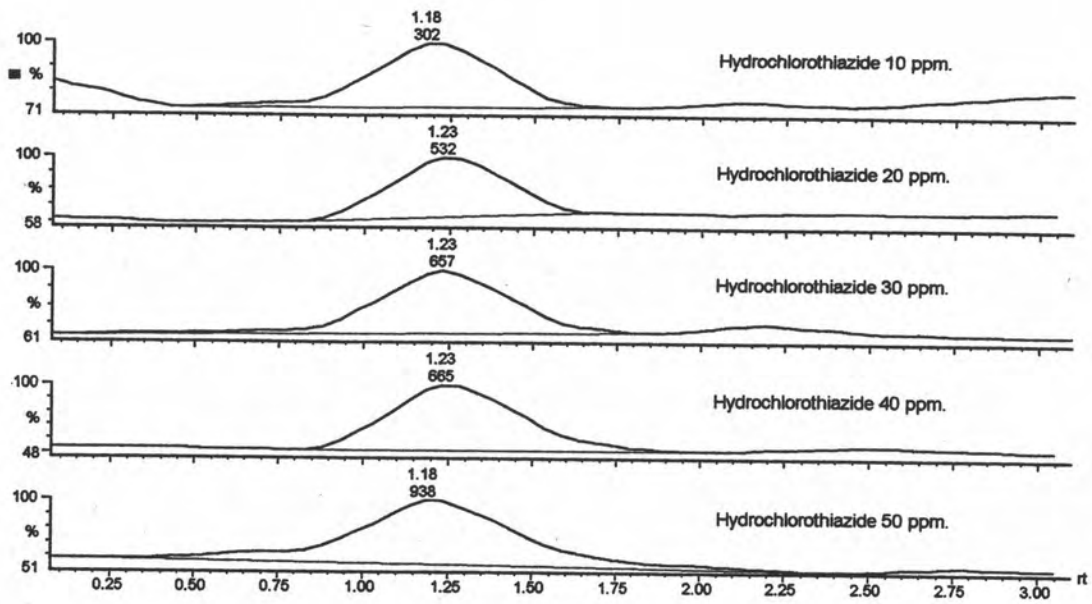


ภาพที่ 110 พื้นที่ใต้กราฟของ Furosemide ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 111

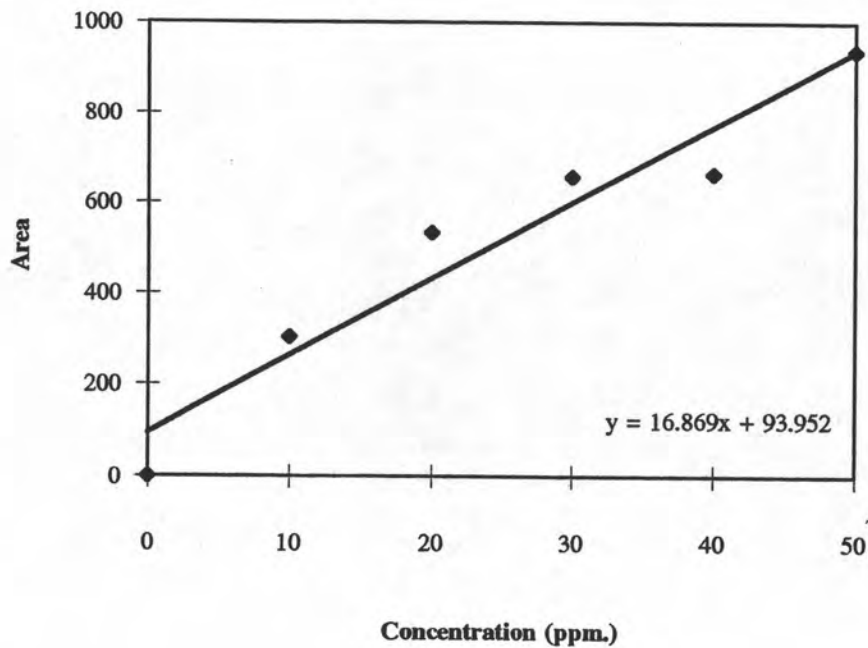


ภาพที่ 111 กราฟมาตรฐานของ Furosemide

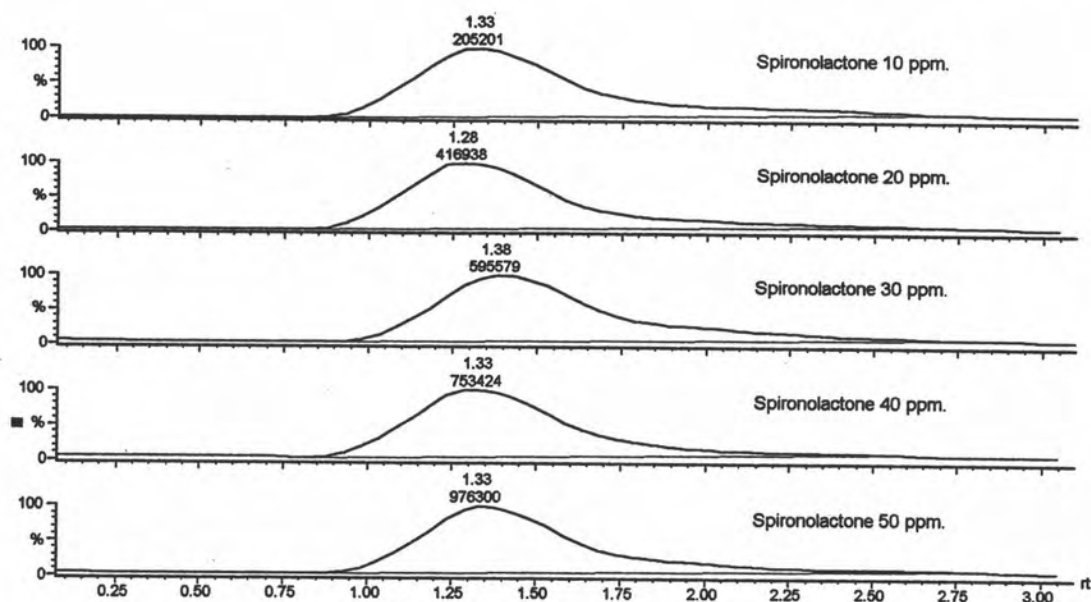


ภาพที่ 112 พื้นที่ใต้กราฟของ Hydrochlorothiazide ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 113

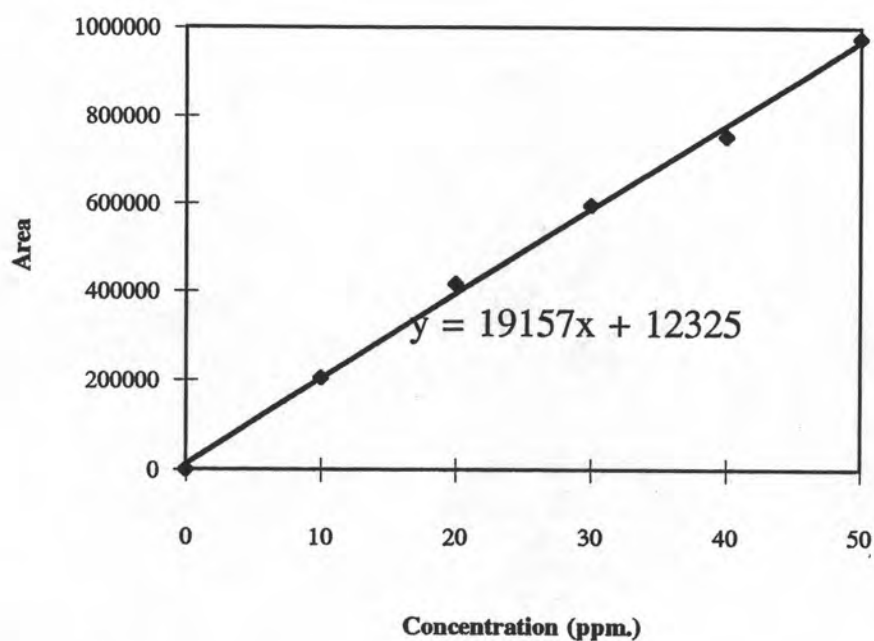


ภาพที่ 113 กราฟมาตรฐานของ Hydrochlorothiazide

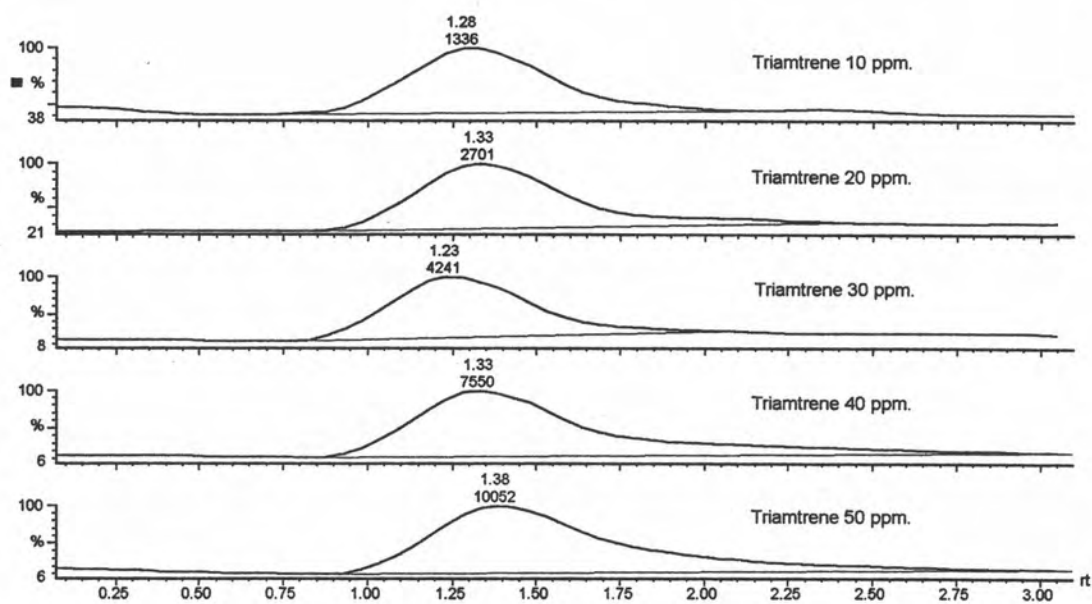


ภาพที่ 114 พื้นที่ใต้กราฟของ Spirolactone ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 115

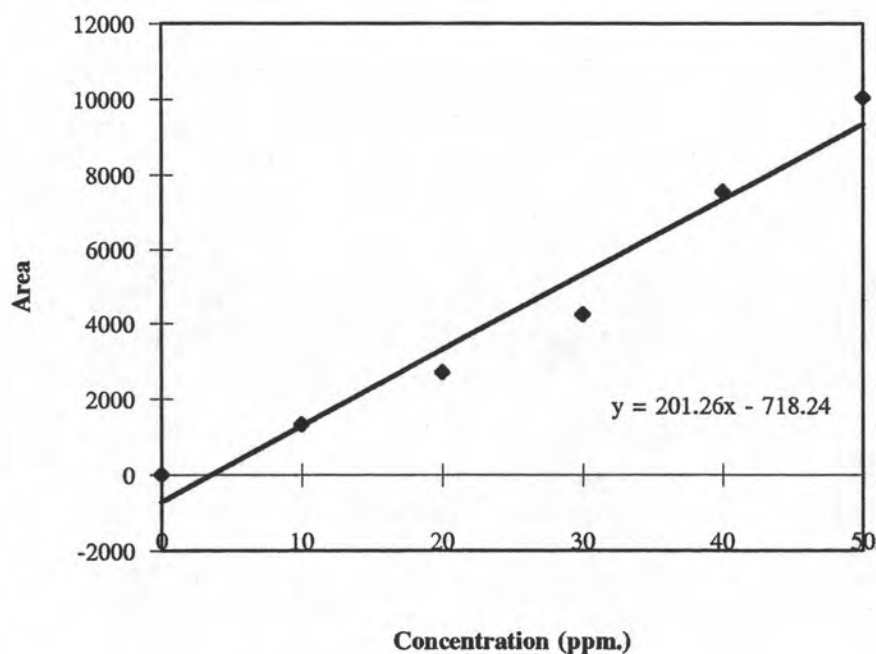


ภาพที่ 115 กราฟมาตรฐานของ Spirolactone



ภาพที่ 116 พื้นที่ใต้กราฟของ Triamterene ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm.

หลังจากคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเรียบร้อยแล้วจึงทำการสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ 117



ภาพที่ 117 กราฟมาตรฐานของ Triamterene

2. ผลการสกัดกลับ

หลังจากสร้างกราฟมาตรฐานเรียบร้อยแล้วจึงทำการหา % ของการสกัดกลับ โดยการนำปัสสาวะที่ปราศจากสารต้องห้ามทุกชนิดมาเติมสารต้องห้ามชนิดต่าง ๆ ให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล. แล้วนำไปทำการสกัดตามวิธีวิเคราะห์สารต้องห้ามกลุ่มนั้น ๆ แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณโดยใช้กราฟมาตรฐานที่ได้สร้างขึ้น แล้วนำผลที่ได้มาทำการคำนวณ ผลของ % การสกัดกลับของสารต้องห้ามชนิดต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 19 - 21

ตารางที่ 19 % ของการสกัดกลับของยาปิดกั้นบีตา

ชื่อ	%Recovery
Acebutolol	79.4
Alprenolol	49.0
Atenolol	69.7
Labetolol	36.0
Metoprolol	77.9
Nadolol	39.8
Oxprenolol	9.70
Propranolol	70.8

ตารางที่ 20 % ของการสกัดกลับของอะแนบอกลิสเตอรอยด์

ชื่อ	%Recovery
Bolasterone	77.0
Fluoxymesterone	56.2
Mesterolone	61.1
Methyltestosterone	46.5
Oxymetholone	86.7
Stanozolol	100
Testosterone propionate	40.8

ตารางที่ 21 % ของการสกัดกลับของยาขับปัสสาวะ

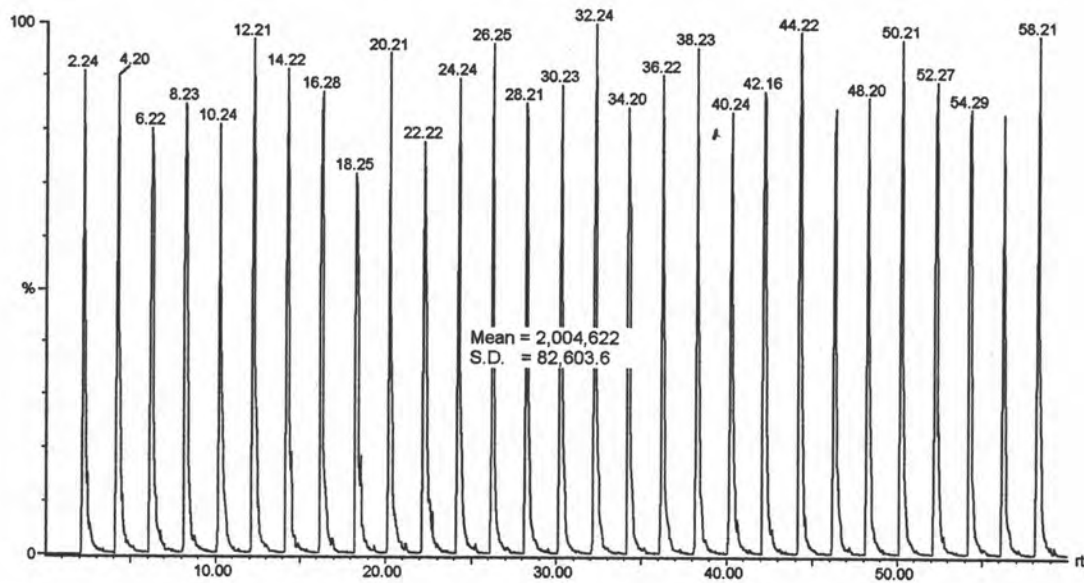
ชื่อ	%Recovery
Acetazolamide	33.6
Amiloride	38.5
Bendroflumethiazide	3.0
Benzthiazide	47.6
Bumetanide	37.0
Ethacrynic acid	96.4
Furosemide	79.7
Hydrochlorothiazide	35.6
Spironolactone	3.9
Triamterene	2.8

การหา % ของการสกัดกลับ (% Recovery) ช่วยให้การวิเคราะห์สะดวกและรวดเร็วขึ้น และหากใช้ internal standard ร่วมด้วยจะช่วยประหยัดเวลาในการวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยการหา % ของการสกัดกลับของสารแต่ละชนิดและของ internal standard แล้วนำมาคำนวณค่าความเข้มข้นโดยอาศัยความสัมพันธ์ที่ได้ทดลองไว้โดยไม่ต้องสร้างกราฟมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์ และยังมีประโยชน์ในการตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ในกรณีตัวอย่างนั้นตรวจไม่พบสารต้องห้ามแต่สามารถตรวจพบ internal standard แสดงว่าปัสสาวะตัวอย่างนั้นไม่มีสารต้องห้ามจริง (ลดการเกิดผลลบเทียม) และสามารถใช้ตรวจสอบความผิดพลาดของปริมาณที่อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนการสกัดหรือความผิดพลาดที่เกิดในกระบวนการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค LC/MS

การวิเคราะห์ซ้ำ

จากการทดลองวิเคราะห์ Alprenolol ความเข้มข้น 25 ppm. ปริมาตร 50 ไมโครลิตรใช้ Methanol 70 % ในน้ำเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่โดยมีอัตราการไหล 0.8 มล./นาที ใช้ cone voltage 40 โวลต์ โดยการฉีดสารซ้ำ ๆ กัน 29 ครั้ง แล้วนำมาคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ แล้วนำมาคำนวณค่า

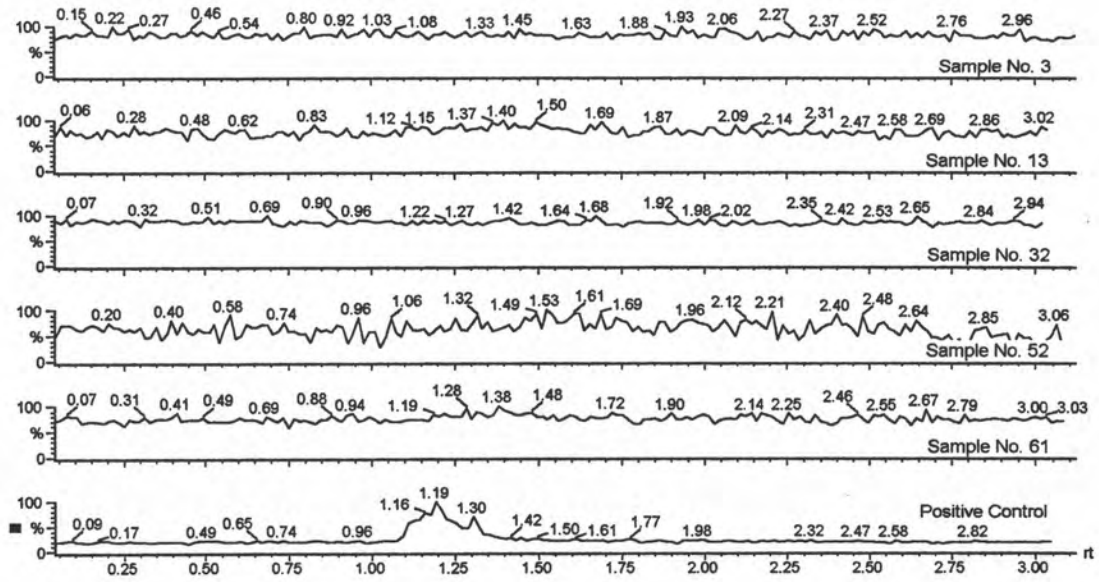
เฉลี่ยเลขคณิตได้เท่ากับ 2,004,622 ตารางหน่วยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 82,604 ตารางหน่วย ดังภาพที่ 118



ภาพที่ 118 ผลการวิเคราะห์ซ้ำ

ตัวอย่างการวิเคราะห์จริง

เมื่อทดลองครบทุกขั้นตอนแล้วจึงทำการทดสอบวิเคราะห์ปัสสาวะจริง โดยตัวอย่างปัสสาวะทั้ง 5 ตัวอย่างนี้ การกีฬาแห่งประเทศไทยเก็บได้เก็บปัสสาวะจากนักกีฬาชิงปืน เพื่อตรวจหายาปิดกั้นปัสสาวะ ปรากฏว่าไม่พบยาปิดกั้นปัสสาวะทุกตัวอย่าง และได้วิเคราะห์ปัสสาวะที่เดิมยาปิดกั้นปัสสาวะตามมาตรฐานทุกชนิดโดยมีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล. แล้วทำการวิเคราะห์ทุกขั้นตอนเหมือนตัวอย่างจริง ดังแสดงในภาพที่ 119



ภาพที่ 119 ตัวอย่างการวิเคราะห์จริง

จะเห็นว่าทุกตัวอย่างไม่ปรากฏพีกบนโครมาโทแกรม แต่ปีสภาวะควบคุมที่ได้เติมยาปิดกั้นบีตาลงไปปรากฏพีกให้เห็นเด่นชัด