บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography, GC) ประกอบด้วยเครื่องตรวจวัด Flame ionization detector (FID) และ Nitrogen phosphorus detector (NPD) รุ่น HP 6890 ของ Hewlett Packard

2. เครื่อง Headspace sample รุ่น 7694 ของ Hewlett Packard

3. คอลัมน์สำหรับเครื่องตรวจวัด FID เป็นคาปิลลาริคอลัมน์ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร เคลือบด้วย 5% Phenly Polysiloxane หนา 0.25 ไมโครเมตร (BP-5) ของ SGE

4. คอลัมน์สำหรับเครื่องตรวจวัด NPD เป็นคาปิลลารีคอลัมน์ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร เคลือบด้วย Dimethyl Polysiloxane หนา 0.25 ไมโครเมตร (BP-1) ของ SGE

5. loop ของเครื่อง Headspace ขนาด 3 มิลลิลิตร ของ Hewlett Packard

6. ฝาอลูมิเนียมพร้อมจุกยางสำหรับปิดขวดบรรจุสาร (vial) ของ Hewlett Packard

7. climper สำหรับรัดฝาและถอดฝา vial ของ Hewlett Packard

8. ขวดบรรจุสาร (vial) ขนาด 10 มิลลิลิตร ของ Hewlett Packard

9. ตู้เย็น (refrigerator) ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส

10. เครื่องอ่างโซนิค (ultrasonic bath) ของ Crest

11. ตู้ดูดความชื้นไฟฟ้า (desiccator) ของ Sanplatec corp

12. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิด 2 ตำแหน่ง ของ Sartorius

13. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด 4 ตำแหน่ง ของ Sartorius

14. เครื่องเขย่า (vortex) Selentific Industries

15. ชุดทดสอบปัสสาวะเบื้องต้นชนิดภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunoassay) ของ บริษัท ABI

16. ไปเปตอัตโนมัติ (autopipette) ขนาด 10, 20, 50, 100, 200 และ 500 ไมโครลิตร ของ Eppendorf

17. ไปเปตอัตโนมัติ (autopipette) ขนาด 1 และ 1- 5 มิลลิลิตร ของ Gilson

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

18. ขวดวัดปริมาตร (volumetic flask) ขนาด 10, 25, 50, 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร

19. ขวดพลาสติกพร้อมฝาพลาสติกเกลียวขนาด 60 และ 500 มิลลิลิตร

20. กระดาษลิตมัส ของ บริษัท Merck

21. ถุงมือยาง ของ Dura

สารเคมี

1. Amphetamine sulphate น้ำหนักโมเลกุล 368.5 purity 100.55% Lot No.069 H 1239 จากกองวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

2. Methamphetamine hydrochloride น้ำหนักโมเลกุล 185.7 purity 99.84% Lot No. SM 001 จากกองวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3. Ephedrine hydrochloride น้ำหนักโมเลกุล 201.7 purity 98.31% Lot No. SE 001 จากกองวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

4. Pseudoephedrine hydrochloride น้ำหนักโมเลกุล 201.7 purity 99.85% Lot No. SPs 001 จากกองวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

5. Caffeine น้ำหนักโมเลกุล 194.2 purity 100% Lot No.143043 จากกองยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

6. Chlorpheniramine metalate น้ำหนักโมเลกุล 390.9 purity 100% Lot No.141034 จากกองยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

7. Brompheniramine metalate น้ำหนักโมเลกุล 435.3 purity 100% Lot No.141035 จากกองยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

8. Phenlypropanolamine hydrochloride น้ำหนักโมเลกุล 187.7 purity 100.34% Lot No.T189058 จากกองวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

9. D-Fenfluramine hydrochloride น้ำหนักโมเลกุล 267.8 purity 99.98% Lot No. 96176 จากกองวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

10. Phentermine hydrochloride น้ำหนักโมเลกุล 185.7 purity 100.16% Lot No.Sphenoo1 (R60189) จากกองวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

11. Codeine phosphate น้ำหนักโมเลกุล 406.4 purity 99.3% Lot No. CPO 1801 จากกองวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

12. สารละลายมาตรฐาน Benzylamie purity 99 % จาก Fluka GC grade
13. Potassium carbonate AR grade ของ Merck
14. Nitrogen purity 99.999% UHP ของ TIG
15. Helium purity 99.999% UHP ของ TIG
16. Hydrogen purity 99.999% UHP ของ TIG
17. Air purity 99.8% HP ของ TIG

วิธีดำเนินการ

1. การเก็บรักษาตัวอย่างปัสสาวะ

เจ้าหน้าที่ตำรวจที่ผ่านการอบรมวิธีการใช้ชุดตรวจสอบเบื้องต้น ทำการเก็บตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ต้องสงสัยหรือผู้เข้ารับการตรวจ ควบคุมการถ่ายปัสสาวะลงในขวดพลาสติกปิดฝาพลาสติกเกลียวขนาดบรรจุ 60 มิลลิลิตร โดยเก็บตัวอย่างปัสสาวะให้มีปริมาณไม่น้อยกว่า 15 มิลลิลิตร ปิดฉลากข้างขวดปัสสาวะแสดงรายละเอียดของตัวอย่าง เช่น ชื่อ-สกุล วันที่เก็บตัวอย่าง หน่วยงานที่เก็บ พร้อมลายมือชื่อเจ้าของปัสสาวะและผู้เก็บตัวอย่าง เก็บรักษาตัวอย่างปัสสาวะในตู้เย็นโดยควบคุมอุณหภูมิประมาณ 4°C หลังจากนั้นเจ้าหน้าที่ตำรวจทำการส่งตัวอย่างปัสสาวะไปที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ อุบลราชธานี ในสภาพแช่เย็น

2. การเตรียมเครื่องแก้ว

ล้างเครื่องแก้วด้วยน้ำยาล้างเครื่องแก้วเรียบร้อยแล้ว นำเครื่องแก้วไปแช่ด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปแช่ด้วยเครื่องอ่างโซนิค นาน 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน

3. การเตรียมสารเคมี

3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยคำนวณจากน้ำหนักโมเลกุลและ purity ของสาร โดยทำการชั่งสาร ดังตารางที่ 3-1 นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ถึงขีดปริมาตร เก็บไว้เป็นสารละลายมาตรฐาน

3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรอย่างละ 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย urine negative (ปัสสาวะที่ปราศจากยาอื่นใดเจือปน) ให้ถึงขีดปริมาตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานแอมเฟตามีน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายมาตรฐานแอมเฟตามีน ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย urine negative ให้ถึงขีดปริมาตร

3.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีน อีฟีดรีน ซูโดอีฟีดรีน คลอเฟนิรามีน เฟนเทอร์มีน บรอมเฟนิรามีน คาเฟอีน ฟีนิลโพรพาโนลามีน ดี-เฟนฟูรามีน และโคเดอีน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมเช่นเดียวกับข้อ 3.3

ตารางที่ 3-1 แสดงการชั่งสารมาตรฐานชนิดต่าง ๆ

ลำดับ	สารมาตรฐาน	ปริมาณสารที่ชั่ง (กรัม)
1	แอมเฟตามีนซัลเฟต	0.1355
2	เมทแอมเฟตามีน ไฮโดรคลอไรด์	0.1247
3	อีฟีดรีน ไฮโดรคลอไรด์	0.1178
4	ซูโดอีฟีดรีน ไฮโดรคลอไรด์	0.1223
5	คลอเฟนิรามีน มาลิเอต	0.1423
6	เฟนเทอร์มีน ไฮโดรคลอไรด์	0.1243
7	บรอมเฟนิรามีน มาลิเอต	0.1364
8	คาเฟอีน	0.1000
9	ฟีนิลโพรพาโนลามีน ไฮโดรคลอไรด์	0.1237
10	ดี-เฟนฟูรามีน ไฮโดรคลอไรด์	0.1158
11	โคเดอีน ฟอสเฟต	0.1289

3.5 การเตรียมสารละลายเบนซิลเอมีน ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายเบนซิลเอมีน ปริมาตร 102 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ถึงขีดปริมาตร เก็บไว้เป็น internal standard

4. หาสภาวะในการแยกที่เหมาะสมของเครื่องมือแก๊สโครมาโตกราฟี และปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อความไวและประสิทธิภาพของวิธี โดยใช้ 2 คอลัมน์ คือ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

คอลัมน์ 1 เป็นคาปิลลารีคอลัมน์ ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร เคลือบด้วย 5% Phenly Polysiloxane หนา 0.25 ไมโครเมตร (BP-5) สำหรับเครื่องตรวจวัด FID

คอลัมน์ 2 เป็นคาปิลลารีคอลัมน์ ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร เคลือบด้วย Dimethyl Polysiloxane หนา 0.25 ไมโครเมตร (BP-1) สำหรับเครื่องตรวจวัด NPD

5. หาสภาวะของเครื่อง Headspace sample ทำการศึกษาโดยเปลี่ยนตัวแปรต่าง ๆ ของเครื่อง

5.1 เวลาที่สารเข้าสู่สมดุล

ศึกษาการหาเวลาที่สมดุล เพื่อทำให้สารเข้าสู่สมดุลในเฮดสเปสโดยทำการตั้งอุณหภูมิของตู้อบของเฮดสเปสที่อุณหภูมิ 80°C และความดัน 25.1 psi

5.1.1 ชั่งปริมาณของโปแตสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) จำนวน 2 กรัม ใส่ในขวดขนาด 10 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด และเติมสารละลายเบนซิลเอมีน จากข้อ 3.5 จำนวน 100 ไมโครลิตร ปิดด้วยฝาอลูมิเนียมพร้อมจุกยาง รัดให้แน่นด้วย climper เขย่าด้วยเครื่อง vortex รอการวิเคราะห์ต่อไป

5.1.2 ตั้งเวลาที่เข้าสู่สมดุลต่าง ๆ กัน คือ 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 นาที ตามลำดับ

5.1.3 นำผลวิเคราะห์มาสร้างกราฟระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับเวลาสมดุลต่าง ๆ

5.2 การเติมเกลือ

ศึกษาหาปริมาณของเกลือที่ต้องใช้เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ระเหยได้ในเฟสที่เป็นไอ โดยใช้เกลือโปแตสเซียมคาร์บอเนต

5.2.1 ตั้งสภาวะของเครื่องเฮดสเปสที่อุณหภูมิ 80°C ความดัน 25.1 psi และเวลาที่สารเข้าสู่สมดุล ตามผลที่ได้จากข้อ 5.1

5.2.2 ชั่งปริมาณเกลือโปแตสเซียมคาร์บอเนต ใส่ในขวด ขนาด 10 มิลลิลิตร ในปริมาณน้ำหนักที่ต่าง ๆ กัน คือ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 กรัม ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักละ 3 ขวด ปิดด้วยกระดาษฟอยล์แล้วปิดทับด้วยพาราฟิล์ม

5.2.3 ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด ลงในข้อ 5.2.2 และเติมสารละลายเบนซิลเอมีน จากข้อ 3.5 จำนวน 100 ไมโครลิตร ปิดด้วยฝาอลูมิเนียมพร้อมจุกยาง รัดให้แน่นด้วย climper เขย่าด้วยเครื่อง vortex รอการวิเคราะห์ต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.2.4 นำผลวิเคราะห์มาสร้างกราฟระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีคกับน้ำหนักของเกลือโปแตสเซียมคาร์บอเนต

5.3 อุณหภูมิที่สารเข้าสู่สมดุล

ศึกษาการหาอุณหภูมิที่สารเข้าสู่สมดุลโดยตั้งอุณหภูมิของตู้อบของเฮดสเปสที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

5.3.1 ตั้งสภาวะของเครื่องเฮดสเปส ที่ความดัน 25.1 psi และ เวลาที่สารเข้าสู่สมดุลตามผลที่ได้จากข้อ 5.1

5.3.2 ตั้งอุณหภูมิที่ค่าต่าง ๆ กัน คือ 70°C, 80°C, 90°Cและ 95°C ตามลำดับ

5.3.3 ชั่งปริมาณเกลือโปแตสเซียมคาร์บอเนต ตามผลที่ได้จากข้อ 5.2 ลงในขวดขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระดาษฟอยล์แล้วปิดทับด้วยพาราฟิล์ม

5.3.4 ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด และเติมสารละลายเบนซิลเอมีน จากข้อ 3.5 จำนวน 100 ไมโครลิตร ปิดด้วยฝาอลูมิเนียมพร้อมจุกยาง รัดให้แน่นด้วย climper เขย่าด้วยเครื่อง vortex รอการวิเคราะห์ต่อไป

5.3.5 นำผลวิเคราะห์มาสร้างกราฟระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีคกับอุณหภูมิต่าง ๆ

5.4 เวลาที่ให้ความดันของแก๊สเข้าในขวด

ศึกษาการหาเวลาในช่วงที่ให้ความดันของแก๊สเข้าในขวดที่เหมาะสม โดย

5.4.1 ตั้งสภาวะของเครื่องเฮดสเปส ที่ความดัน 25.1 psi เวลาที่สารเข้าสู่สมดุลตามผลที่ได้จากข้อ 5.1 และอุณหภูมิที่สารเข้าสู่สมดุล ตามผลที่ได้จากข้อ 5.3

5.4.2 ตั้งเวลาในการให้ความดันของแก๊สเข้าในขวดในเวลาต่าง ๆ กัน คือ 6, 12, 18 และ 24 วินาที ตามลำดับ

5.4.3 ชั่งปริมาณเกลือโปแตสเซียมคาร์บอเนต ตามผลที่ได้จากข้อ 5.2 ลงในขวดขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระดาษฟอยล์แล้วปิดทับด้วยพาราฟิล์ม

5.4.4 ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด และเติมสารละลายเบนซิลเอมีน จากข้อ 3.5 จำนวน 100 ไมโครลิตร ปิดด้วยฝาอลูมิเนียมพร้อมจุกยาง รัดให้แน่นด้วย climper เขย่าด้วยเครื่อง vortex รอการวิเคราะห์ต่อไป

5.4.5 นำผลวิเคราะห์มาสร้างกราฟระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีคกับเวลาต่าง ๆ ในการให้ความดันของแก๊สเข้าในขวด (pressurization time)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.5 เวลาที่สารเข้า sample loop

ศึกษาการหาเวลาของแก๊สจากส่วนเฮดสเปสของขวดที่ผ่านเข้าและไปใน sample loop และผ่านออก (loop fill time)

5.5.1 ตั้งสภาวะของเครื่องเฮดสเปสที่ความดัน 25.1 psi เวลาที่สารเข้าสู่สมดุล ตามผลที่ได้จากข้อ 5.1 อุณหภูมิที่สารเข้าสู่สมดุล ตามผลที่ได้จากข้อ 5.3 และเวลาที่ให้ความดันของแก๊สเข้าในขวด ตามผลที่ได้จากข้อ 5.4

5.5.2 ตั้งเวลาที่แก๊สจากเฮดสเปส เข้า-ออก sample loopในเวลาที่ต่าง ๆ กัน คือ 1.8, 3.6, 5.4 และ 7.2 วินาที ตามลำดับ

5.5.3 ชั่งปริมาณเกลือโปแตสเซียมคาร์บอเนต ตามผลที่ได้จากข้อ 5.2 ลงในขวดขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระดาษฟอยล์แล้วปิดทับด้วยพาราฟิล์ม

5.5.4 ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด และเติมสารละลายเบนซิลเอมีน จากข้อ 3.5 จำนวน 100 ไมโครลิตร ปิดด้วยฝาอลูมิเนียมพร้อมจุกยาง รัดให้แน่นด้วย climper เขย่าด้วยเครื่อง vortex รอการวิเคราะห์ต่อไป

5.5.5 นำผลวิเคราะห์มาสร้างกราฟระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับเวลาต่าง ๆ ที่แก๊สจากเฮดสเปส เข้า-ออก sample loop

5.6 เวลาของสารเข้าสู่สมดุลใน sample loop

ศึกษาการหาเวลาของสารที่ต้องการวิเคราะห์เข้าสู่สมดุลใน sample loop

5.6.1 ตั้งสภาวะของเครื่องเฮดสเปส ที่ความดัน 25.1 psi เวลาที่สารเข้าสู่สมดุล ตามผลที่ได้จากข้อ 5.1 อุณหภูมิที่สารเข้าสู่สมดุล ตามผลที่ได้จากข้อ 5.3 เวลาที่ให้ความดันของแก๊สเข้าในขวด ตามผลที่ได้จากข้อ 5.4 และเวลาที่สารเข้า sample loop ตามผลที่ได้จากข้อ 5.5

5.6.2 ตั้งเวลาที่สารเข้าสู่สมดุลใน sample loop ในเวลาต่าง ๆ กัน คือ 1.8, 2.4, 3.0, 3.6 และ 4.2 วินาที ตามลำดับ

5.6.3 ชั่งปริมาณเกลือโปแตสเซียมคาร์บอเนต ตามผลที่ได้จากข้อ 5.2 ลงในขวดขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระดาษฟอยล์แล้วปิดทับด้วยพาราฟิล์ม

5.6.4 ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด และเติมสารละลายเบนซิลเอมีน จากข้อ 3.5 จำนวน 100 ไมโครลิตร ปิดด้วยฝาอลูมิเนียมพร้อมจุกยาง รัดให้แน่นด้วย climper เขย่าด้วยเครื่อง vortex รอการวิเคราะห์ต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.6.5 นำผลวิเคราะห์มาสร้างกราฟระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีคกับเวลาต่าง ๆ ที่สารเข้าสู่สมดุลใน sample loop (loop equilibration time)

5.7 เวลาที่สารจาก sample loop ฉีดเข้าสู่เครื่อง

ศึกษาเวลาที่สารจาก sample loop ของเฮดสเปส ฉีดเข้าสู่เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่สารเข้าสู่เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี และป้องกันการเกิด carry-over ของสาร

5.7.1 ตั้งสภาวะของเครื่องเฮดสเปส ที่ความดัน 25.1 psi เวลาที่สารเข้าสู่สมดุลตามผลที่ได้จากข้อ 5.1 อุณหภูมิที่สารเข้าสู่สมดุล ตามผลที่ได้จากข้อ 5.3 เวลาที่ให้ความดันของแก๊สเข้าในขวด ตามผลที่ได้จากข้อ 5.4 เวลาที่สารเข้า sample loop ตามผลที่ได้จากข้อ 5.5 และเวลาของสารเข้าสู่สมดุลใน sample loop ตามผลที่ได้จากข้อ 5.6

5.7.2 ตั้งเวลาการฉีดสาร (inject time) ในเวลาต่าง ๆ กัน คือ 60, 90, 120 และ 150 วินาที ตามลำดับ

5.7.3 ชั่งปริมาณเกลือโปแตสเซียมคาร์บอเนต ตามผลที่ได้จากข้อ 5.2 ลงในขวดขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดด้วยกระดาษฟอยล์แล้วปิดทับด้วยพาราฟิล์ม

5.7.4 ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด และเติมสารละลายเบนซิลเอมีน จากข้อ 3.5 จำนวน 100 ไมโครลิตร ปิดด้วยฝาอลูมิเนียมพร้อมจุกยาง รัดให้แน่นด้วย climper เขย่าด้วยเครื่อง vortex รอการวิเคราะห์ต่อไป

5.7.5 นำผลวิเคราะห์สร้างกราฟระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีคกับเวลาการฉีดสารต่าง ๆ

6. Method validation ศึกษาความถูกต้องของวิธีที่ทำการวิเคราะห์ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2541)

6.1 linearity and range

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ หาความสามารถของวิธีโดยให้ผลวิเคราะห์ที่เป็นสัดส่วนทางคณิตศาสตร์กับปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ (analyte) โดยทำการศึกษาทั้งเครื่องตรวจวัด FID และ NPD ดังนี้

6.1.1 ทำการศึกษาโดยใช้ขวดขนาด 10 มิลลิลิตร ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

6.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน อย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้น โดยเตรียมให้ความเข้มข้นครอบคลุมในช่วง 50%-200% ของความเข้มข้นสารที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวอย่างโดยแต่ละช่วงจะมีความเข้มข้นเท่า ๆ กัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6.1.3 ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเฮดสเปสแก๊สโครมาโตกราฟี ตามสภาวะของเครื่องที่ได้ โดยทำการวัดที่ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ

6.1.4 นำผลวิเคราะห์มาสร้างกราฟระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับค่าความเข้มข้น และหาค่า correlation coefficient (r^2)

6.2 precision

การหาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จะต้องมีลักษณะที่เป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุด (homogeneity) และที่ 2 ระดับความเข้มข้น คือ ความเข้มข้นต่ำ และความเข้มข้นสูง ของค่าความเป็นเส้นตรง โดยทำการศึกษาทั้งเครื่องตรวจวัด FID และ NPD ดังนี้

6.2.1 replicability ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 7 ซ้ำ (7 measurements)

6.2.1.1 คำนวณหาค่า Q-test ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

6.2.1.2 คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, *SD*) และค่าความสัมพัทธ์เบี่ยงเบนมาตรฐาน (Relative standard deviation, *RSD*) โดยค่าRSD < 3%

คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (*SD*)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum\left(X_i - \bar{X}\right)^2}{n-1}} \qquad (3)$$

เมื่อ X_i แทน ค่าที่วัดได้แต่ละครั้ง

$\bar{X}$ แทน ค่าเฉลี่ยของการวัด n ครั้ง

n แทน จำนวนครั้งของการวัด

คำนวณหาค่าความสัมพัทธ์เบี่ยงเบนมาตรฐาน (*RSD*)

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \qquad (4)$$

เมื่อ SD แทน ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\bar{X}$ แทน ค่าเฉลี่ย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6.2.2 repeatability (r) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 7 ซ้ำ (7 measurements) โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ เป็นเวลา 5 วัน ภายในห้องปฏิบัติการเดียวกัน

6.2.2.1 คำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละวัน

6.2.2.2 วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าที่วัดได้ในแต่ละวันโดยใช้ analysis of variance (within- run precision and between-run pecision) ดังตารางที่ 3-2

6.2.2.3 คำนวณการวิเคราะห์ความแปรปรวนในวันเดียวกัน ดังตารางที่ 3-3

ตารางที่ 3-2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในวันเดียวกัน

วันที่, m	การวิเคราะห์ครั้งที่ (measurement no, n)							day sum
	1	2	3	4	5	6	7	
1	x_{11}	x_{12}	x_{13}	x_{14}	x_{15}	x_{16}	x_{17}	A
2	x_{21}	x_{22}	x_{23}	x_{24}	x_{25}	x_{26}	x_{27}	B
3	x_{31}	x_{32}	x_{33}	x_{34}	x_{35}	x_{36}	x_{37}	C
4	x_{41}	x_{42}	x_{43}	x_{44}	x_{45}	x_{46}	x_{47}	D
5	x_{51}	x_{52}	x_{53}	x_{54}	x_{55}	x_{56}	x_{57}	E
				grand sum				F

$$a = \sum Xi^2 = \sum \left(X_{11}^2 + X_{22}^2 + \ldots\ldots + X_{55}^2 \right) \quad (5)$$

$$b = \sum \frac{(day\ \ sum)^2}{n} = \sum \frac{\left(A^2 + B^2 + \ldots\ldots + E^2 \right)}{n} \quad (6)$$

$$c = \frac{(grand\ \ sum)^2}{mn} = \frac{F^2}{mn} \quad (7)$$

เมื่อ m แทน จำนวนวันที่ทำการวิเคราะห์

n แทน จำนวนครั้งที่วิเคราะห์ซ้ำต่อวัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-3 คำนวณการวิเคราะห์ความแปรปรวนในวันเดียวกัน

source of variance	df	sum of Sq	Mean Sq	*F-ratio*	F_{obs}	F_{table}
between-run (among-days)	*m-1*	*(b-c)*	sum of Sq/df	Mean Sq (between) / Mean Sq (within)		
within-run	*m(n-1)*	*(a-b)*	sum of Sq/df			
Total	*mn-1*	*(a-c)*				

ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ดูตาราง *F*- distribution

เปรียบเทียบค่า F_{obs} กับ F_{table}

ถ้า F_{obs} มีค่า < F_{table} แสดงว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างการวิเคราะห์ในแต่ละวัน

6.3 accuracy และ %recovery

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ควรมีค่าเท่ากับค่าจริง (true value) หรือมีค่าใกล้เคียงกับค่าจริงที่สุด โดยทำการศึกษาทั้งเครื่องตรวจวัด FID และ NPD ดังนี้

6.3.1 นำตัวอย่างปัสสาวะที่ส่งมาจากสถานีตำรวจมาทำการวิเคราะห์

6.3.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน ลงในตัวอย่างปัสสาวะที่ 3 ระดับความเข้มข้น โดยการเติมสารละลายมาตรฐานให้ครอบคลุมอยู่ในช่วง 50%-150% ของสารที่ต้องการวิเคราะห์และต้องอยู่ในช่วง linearity โดยทำการวิเคราะห์ 7 ซ้ำในแต่ละระดับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

6.3.3 คำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความสัมพัทธ์เบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยค่า *RSD* < 3%

6.3.4 คำนวณหาร้อยละการกลับคืน (%recovery) ของแต่ละระดับความเข้มข้น โดยค่าที่คำนวณได้อยู่ในช่วงที่กำหนดและเป็นค่าที่ยอมรับได้ (acceptance criteria)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

คำนวณหาร้อยละการกลับคืน (%recovery)

$$\%\ recovery = \frac{\left[C_{(std\ +\ samp\ )} - C_{samp} \right]}{C_{std}} \times 100 \qquad (8)$$

เมื่อ C_{std} แทน ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป

C_{samp} แทน ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐาน

$C_{(std+samp)}$ แทน ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายมาตรฐาน

6.4 specificity หรือ selectivity

การหาความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ เพื่อเช็ควิธีว่าไม่มีสารอื่นรบกวนการวิเคราะห์โดยเวลาในการแยกออกมาของสาร ทำการศึกษาทั้งเครื่องตรวจวัด FID และ NPD ดังนี้

6.4.1 resolution การหาสารที่มีสมบัติคล้ายกับสารที่วิเคราะห์ โดยนำสารละลายมาตรฐานอีฟีดรีน ซูโดอีฟีดรีน คลอเฟนิรามีน เฟนเทอร์มีน บรอมเฟนิรามีน คาเฟอีน ฟีนิลโพรพาโนลามีน ดี-เฟนฟูรามีน และโคเดอีน ข้อ 3.4 ทำการวิเคราะห์เหมือนตัวอย่างทุกขั้นตอน และวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานละ 7 ซ้ำ

6.4.1.1 คำนวณหา resolution factor > 2

คำนวณหาค่าความสามารถในการแยกของสาร (resolution, *Rs*)

$$Rs = 2\left(\frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{W_2 + W_1} \right) \qquad (9)$$

เมื่อ t_{R_1} คือ retention time ของ peak ที่ 1

t_{R_2} คือ retention time ของ peak ที่ 2

W_1 คือ ความกว้างของฐาน peak ที่ 1

W_2 คือ ความกว้างของฐาน peak ที่ 2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6.5 LOD (limit of detection) และ LOQ (limit of quantitative)

การหาขีดจำกัดของการตรวจวัด และขีดจำกัดของการตรวจปริมาณวิเคราะห์ โดยทำการศึกษาทั้งเครื่องตรวจวัด FID และ NPD ดังนี้

6.5.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะที่ปราศจากยาอื่นเจือปน (urine negative) ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ

6.5.2 ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเฮดสเปสแก๊สโครมาโตกราฟี ตามสภาวะของเครื่องที่ได้

6.5.3 นำผลวิเคราะห์มาเทียบกับสัญญาณของสารที่ได้ (signal, *S*) กับที่สัญญาณรบกวน (noise, *N*)

LOD = *3 S/N*

LOQ = *10 S/N*

6.6 การหาค่า *K* (Partition coefficient)

การหาค่าคงที่การแพร่กระจาย เป็นการหาความสามารถหรือสัดส่วนในการกลายเป็นไอของสาร

6.6.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยแต่ละช่วงจะมีความเข้มข้นเท่า ๆ กัน

6.6.2 ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเฮดสเปสแก๊สโครมาโตกราฟี ตามสภาวะของเครื่องที่ได้ โดยทำการวัดที่ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ

6.6.3 นำผลวิเคราะห์มาคำนวณหาค่า *K* (Partition coefficient) จากสมการที่ 1

$$K = \frac{C_c}{C_g} \qquad (1)$$

เมื่อ C_c แทน ความเข้มข้นของสารในเฟสที่เป็นสารละลาย

C_g แทน ความเข้มข้นของสารในเฟสที่เป็นไอ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

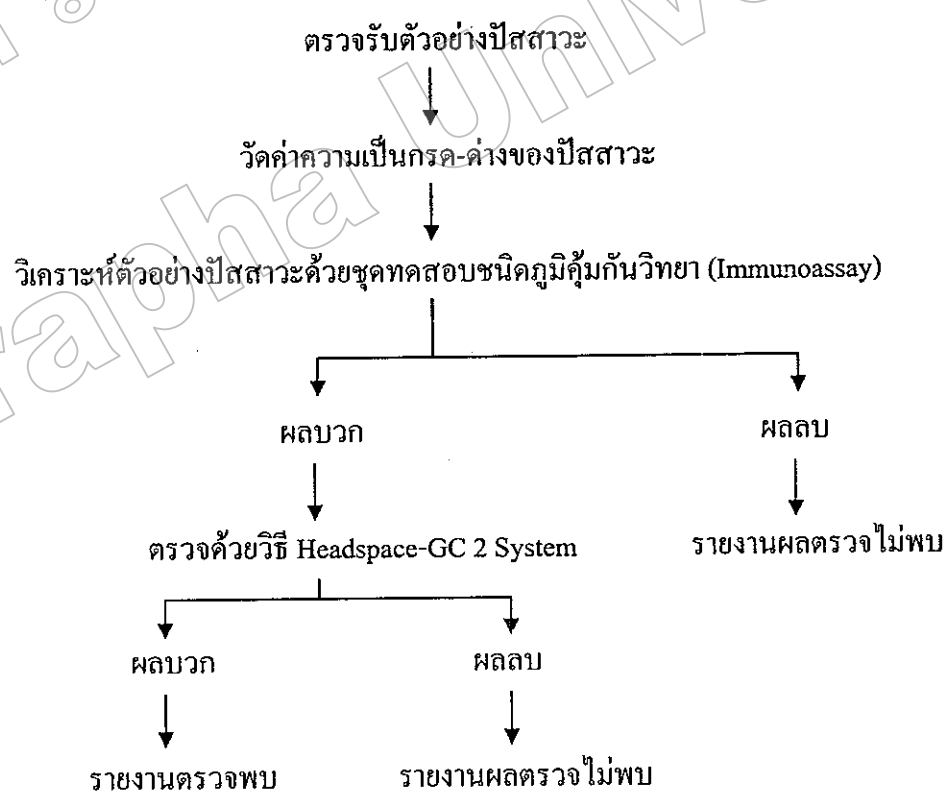
7. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

7.1 นำตัวอย่างปัสสาวะมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกระดาษลิตมัส ทำการบันทึกความเป็นกรด-ด่าง (ดังภาพที่ 3-1)

7.2 ตรวจปัสสาวะเบื้องต้น ด้วยชุดทดสอบชนิดภูมิคุ้มกันวิทยา โดยนำชุดทดสอบมาฉีกซองอลูมิเนียมฟอยล์ออก ใช้หลอดดูดตัวอย่างปัสสาวะหยดลงในหลุมจำนวน 5 หยด ห้ามให้มีฟองอากาศ อ่านผลภายใน 5-8 นาที (ดังภาพที่ 3-2)

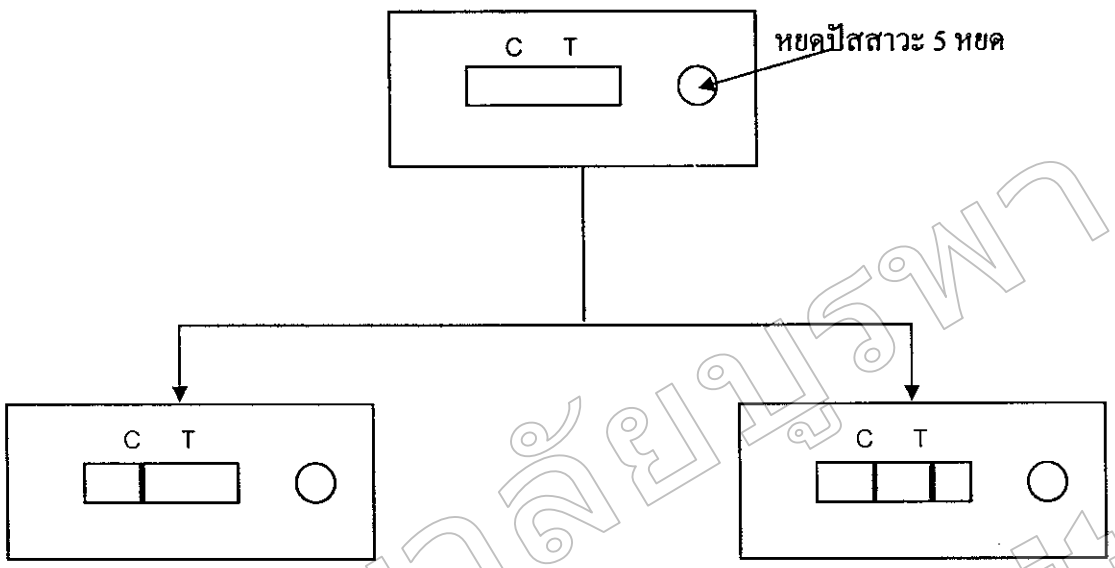
7.3 ชั่งโปแตสเซียมคาร์บอเนตใส่ขวด แล้วปิเปตตัวอย่างปัสสาวะ และเติมสารละลายเบนซิลเอมีน จากข้อ 3.5 เป็น internal standard จำนวน 100 ไมโครลิตร ปิดด้วยฝาอลูมิเนียมพร้อมจุกยาง รัดให้แน่นด้วย climper เขย่าด้วยเครื่อง vortex นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องเฮดสเปสแก๊สโครมาโตกราฟี (ดังภาพที่ 3-3)

7.4 การเตรียมสารละลาย blank โดยใช้ urine negative ทำการเตรียมเหมือนข้อ 7.3 (ดังภาพที่ 3-4)



ภาพที่ 3-1 การวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีน แอมเฟตามีนและยาในตัวอย่างปัสสาวะ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 3-2 การทดสอบตัวอย่างปัสสาวะแบบเบื้องต้นด้วย Immunoassay

ชั่งปริมาณเกลือโปแตสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3)
ลงในขวด (vial) ขนาด 10 มิลลิลิตร
↓
เติมตัวอย่างปัสสาวะ จำนวน 3 มิลลิลิตร ลงในขวด และ
เติม internal standard จำนวน 100 ไมโครลิตร
ปิดด้วยฝาอลูมิเนียมรัดด้วย climper
↓
เขย่าด้วยเครื่อง vortex
↓
วัดด้วยเครื่อง Headspace-GC

ภาพที่ 3-3 การเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีน แอมเฟตามีนและยาในตัวอย่างปัสสาวะ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ชั่งปริมาณเกลือโปแตสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3)

ลงในขวด (vial) ขนาด 10 มิลลิลิตร

↓

เติมปัสสาวะ (urine negative) จำนวน 3 มิลลิลิตร ลงในขวด

และเติม internal standard จำนวน 100 ไมโครลิตร

ปิดด้วยฝาอลูมิเนียมรัดด้วย climper

↓

เขย่าด้วยเครื่อง vortex

↓

วัดด้วยเครื่อง Headspace-GC

ภาพที่ 3-4 การเตรียมสารละลาย blank ในการวิเคราะห์ เมทแอมเฟตามีน แอมเฟตามีนและยาในตัวอย่างปัสสาวะ

การคำนวณ

ตัวอย่างการคำนวณน้ำหนักของสารเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ เพื่อใช้ในการเตรียมสารละลายมาตราฐาน จากตารางที่ 3-1

เมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ สูตรโมเลกุล $C_{10}H_{15}N{\cdot}HCl$ น้ำหนักโมเลกุล 185.7

เมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ หนัก 185.7 กรัม ประกอบด้วยเมทแอมเฟตามีน

= 149.2 กรัม

เมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ หนัก 1 กรัม จะมีเมทแอมเฟตามีน $= \frac{149.2 \times 1}{185.7}$

= 0.8034 กรัม

เนื่องจากความบริสุทธิ์ของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ = 99.84 %

ดังนั้น เมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ 1 กรัม จะมีเนื้อสารเมทแอมเฟตามีน

$= \frac{0.8034 \times 99.84}{100}$

= 0.8021 กรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมทแอมเฟตามีน 0.8021 กรัม มีสารเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ 1 กรัม

ถ้าต้องการเมทแอมเฟตามีน 1 กรัม จะต้องชั่งสารเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์

$$= \frac{1 \times 1}{0.8021}$$

$$= 1.247 \text{ กรัม}$$

ดังนั้นต้องชั่งสารเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ 0.1247 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University