การพัฒนาเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของเหลวสำหรับการวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะโดยแก๊สโครมาโทกราฟี

ราตรี ศิริชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
พ.ศ.2553

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

DEVELOPMENT OF LIQUID – LIQUID EXTRACTION FOR THE DETERMINATION OF METHAMPHETAMINE IN URINE BY GAS CHROMATOGRAPHY

RATREE SIRICHAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

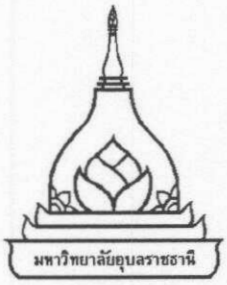
MEJOR IN CHEMISTRY

FACULTY OF SCIENCE

UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

YEAR 2010

COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

เรื่อง การพัฒนาเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของเหลวสำหรับการวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะโดยแก๊สโครมาโทกราฟี

ผู้วิจัย ร้อยตำรวจเอกหญิง ราตรี ศิริชัย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ อินทรประเสริฐ)

..... กรรมการ

(ดร.มะลิวรรณ อมตธงไชย)

..... กรรมการ

(ดร.สุดาพร ตังควนิช)

..... คณบดี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ อินทรประเสริฐ)

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี รับรองแล้ว

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุทิศ อินทร์ประสิทธิ์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ปฏิบัติราชการแทนอธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2553

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ อินทรประเสริฐ ที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นในการศึกษาตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เป็นอย่างดีมาตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์ ซึ่งทำให้ผู้วิจัยได้รับแนวทางในการศึกษาค้นคว้าหาความรู้และประสบการณ์อย่างกว้างขวางในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ จึงขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.มะลิวรรณ อมตธงไชย คณะกรรมการสอบปากเปล่าและคณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ข้อเสนอแนะในการปรับปรุงแก้ไข ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.สุดาพร ตังควนิช คณะกรรมการสอบป้องกันที่ได้กรุณาให้ข้อเสนอแนะในการปรับปรุงแก้ไขจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.อัญชลี สำเภา คณะกรรมการสอบปากเปล่าที่ได้กรุณาให้ข้อเสนอแนะในการปรับปรุงแก้ไขจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์อมรรัตน์ วงศ์กลม ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จด้วยดี

ขอขอบพระคุณ สำนักงานพิสูจน์หลักฐาน จังหวัดอุบลราชธานี ที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการและเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จด้วยดี

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดอุบลราชธานี ที่ให้คำปรึกษาและสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จด้วยดี

ขอขอบพระคุณครอบครัว พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จด้วยดี

คุณประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ ขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณบิดามารดาและครูอาจารย์ที่กรุณาอบรมสั่งสอนให้ความรู้และสิ่งดีงามแก่ผู้วิจัย

ร.ต.อ.หญิง ร. ศ

(ร้อยตำรวจเอกหญิง ราตรี ศิริชัย)

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : การพัฒนาเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของเหลวสำหรับการวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะโดยแก๊สโครมาโทกราฟี

โดย : ราตรี ศิริชัย

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา : เคมี

ประธานกรรมการที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ อินทรประเสริฐ

ศัพท์สำคัญ : เมทแอมเฟตามีน ปัสสาวะ GC - FID ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ การสกัดด้วยเฟสของเหลว

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการพัฒนาเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของเหลวสำหรับการสกัดเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ โดยใช้สารสกัด ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัดและมีประสิทธิภาพในการสกัดวิธีหนึ่ง การทดลองใช้สารสกัด ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน บิวทิลอะซิเตท และเฮกเซน ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด เช่น วิธีการผสมสาร, สารสกัด, ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และระยะเวลาในการสกัด พบว่าสภาวะการสกัดโดยใช้ไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นสารสกัด ผสมสารด้วยเครื่อง vortex เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเวลาในการสกัด 1 นาที ให้ผลการสกัดดีที่สุด หลังจากสกัดตรวจวิเคราะห์ปริมาณเมทแอมเฟตามีนโดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีด้วยตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน คอลัมน์ชนิด Rtx - 5 ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร อุณหภูมิของส่วนฉีดสารตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานที่ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของตัวตรวจวัดที่ 300 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 150 องศาเซลเซียส กราฟมาตรฐานให้ช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 0.5 - 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9996 ขีดต่ำสุดของการตรวจวัด มีค่า 0.0315 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและขีดต่ำสุดของการหาปริมาณ มีค่า 0.0625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละการคืนกลับโดยการเติมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ลงในปัสสาวะ มีค่าอยู่ในช่วง 93.40 - 100.18 % ค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน มีค่าอยู่ในช่วง 3.42 - 6.74 % และ 2.81 - 7.43 % วิธีนี้สามารถนำไปใช้ตรวจวัดปริมาณเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะของผู้เสพสารเสพติด จึงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์

ABSTRACT

TITLE : DEVELOPMENT OF LIQUID LIQUID EXTRACTION FOR THE DETERMINATION OF METHAMPHETAMINE IN URINE BY GAS CHROMATOGRAPHY

BY : RATREE SIRICHAI

DEGREE : MASTER OF SCIENCE

MAJOR : CHEMISTRY

CHAIR : ASST. PROF. JANPEN INTARAPRASERT, Ph.D.

KEYWORDS : METHAMPHETAMINE / URINE / GC - FID / METHOD VALIDATION LIQUID - LIQUID EXTRACTION

The objective of this research was to develop the extraction technique for metham phetamine in urine sample by using organic extractant which was an easy, quick and efficient technique. Dichloromethane, butyl acetate and hexane were studied as extraction solvents. The optimum conditions for extraction technique such as, mixing methods, various concentrations of sodium hydroxide solution and extracting times were investigated. It was found that dichloromethane; vortex mixer, 5 M NaOH and extraction time for 1 minute revealed the best result of the extraction. After extraction, methamphetamine was determined by gas chromatography coupled with flame ionization detector (GC - FID). Rtx - 5 column (0.25 mm x 30 m) with 0.25 μm of film thickness was used. An Injector, detector and column temperatures were 250, 300 and 150 Celsius degrees, respectively. The calibration curve of methamphetamine was constructed in a range of 0.5 - 50 μg/mL. The correlation coefficient (r^2) was 0.9996. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.0315 μg/mL and 0.0625 μg/mL, respectively Recovery efficiencies were determined by adding measured amount of methamphetamine hydrochloride to the urine sample prior to extraction. The recovery ranged from 93.40 - 100.10% were obtained. The intra and inter-day precision were 3.41 - 6.73% and 2.81 - 7.43%, respectively. The developed extraction method can be applied for methamphetamine determination in drug - addicted urine and be an optional method used in forensic science.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ญ
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและลักษณะสำคัญของยาเสพติด	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตการศึกษา	3
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.5 สถานที่ทำการทดลอง	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ความหมายยาเสพติดให้โทษ	5
2.2 ประเภทยาเสพติดให้โทษ	5
2.3 ระยะเวลาการออกฤทธิ์	6
2.4 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเมทแอมเฟตามีน	6
2.5 การสังเคราะห์เมทแอมเฟตามีน	9
2.6 เมตาบอลิซึมและการขับออกของเมทแอมเฟตามีน	10
2.7 หลักการพื้นฐานด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของเหลว (Liquid - Liquid Extraction)	13
2.8 การสกัดด้วยเฟสของเหลว	14
2.9 ประสิทธิภาพการสกัด	14

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.10 หลักการพื้นฐานแก๊สโครมาโทกราฟี	15
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	30
3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	40
3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	40
3.3 สารเคมี	41
3.4 วิธีดำเนินการ	41
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องแก๊สโครมาโท - กราฟีและปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ที่มีผลต่อการวิเคราะห์	50
4.2 กราฟมาตรฐาน (Calibration Curves) และขีดจำกัดของการตรวจวัด (Detection Limit)	59
4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการสกัด	60
4.4 สภาวะที่เหมาะสมของการทดลอง	66
4.5 ผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	66
4.6 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารเมทแอมเฟตามีนไฮโดร - คลอไรด์ในตัวอย่าง	70
5 สรุปผลการทดลอง	**72**
เอกสารอ้างอิง	**74**
ภาคผนวก	**78**
ประวัติผู้วิจัย	**83**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การละลายได้ของเมทแอมเฟตามีน	9
2.2	ตัวอย่างเทคนิคการแยก	13
3.1	Analyte %Recovery สำหรับการพิจารณายอมรับที่ความเข้มข้นต่างๆ (ตามAOAC)	46
3.2	Analyte %Recovery สำหรับการพิจารณายอมรับของสารตกค้างจากยาฆ่าแมลงและยาสัตว์ตกค้างในอาหาร(ตาม Cordex)	46
3.3	แสดงค่า expected % RSD ที่คำนวณจาก Horwitz's Equation ที่ความเข้มข้นต่างๆ	48
3.4	เกณฑ์ของค่า HORRAT ที่ยอมรับ อาจใช้เกณฑ์ที่ AOAC และ Codex กับ EU	48
4.1	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) และขีดจำกัดของการตรวจวัด	59
4.2	ผลของชนิดของเครื่องผสมสารที่ใช้ในการสกัดสารละลายเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ใน Spike Urine Sample	60
4.3	ผลของการใช้ไดคลอโรมีเทน บิวทิลอะซิเตทและเฮกเซน เป็นสารสกัดในการสกัดสารละลายเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ใน Spike Urine Sample	62
4.4	ผลของการเติมสารละลายความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ค่าต่างๆ ลงในสารสกัดสารละลายเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ใน Spike Urine Sample	63
4.5	ผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดสารละลายเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ใน Spike Urine Sample	65
4.6	สภาวะเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี	66
4.7	ขีดจำกัดต่ำสุดขอการตรวจวัดและขีดจำกัดของการตรวจปริมาณวิเคราะห์	68
4.8	ค่าร้อยละการกลับคืนได้ของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์	68
4.9	ความเที่ยงของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intraday)	69
4.10	ความเที่ยงของการวิเคราะห์ระหว่างวัน (interday)	69
4.11	ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะ	71

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	สูตรโครงสร้าง สูตรโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล จุดเดือดหรือจุดหลอมเหลวของสารเสพติด	8
2.2	วิธีเมตาบอไลต์ของแอมเฟตามีนในมนุษย์	12
2.3	วิธีเมตาบอไลต์ของเมทแอมเฟตามีนในมนุษย์	12
2.4	ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี	15
2.5	ส่วนฉีดสารที่มีรูปแบบการฉีดสารแบบเข้าหมด	17
2.6	ส่วนฉีดสารที่มีรูปแบบการฉีดสารแบบแยกส่วน	18
2.7	โครมาโทแกรม	19
2.8	ตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน	20
2.9	การแยกในแก๊สโครมาโทกราฟี	22
2.10	การแพร่กระจายแบบธรรมดา	26
2.11	การแพร่กระจายแบบเอ็ดดี	26
2.12	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า H กับ $\bar{u}$	29
3.1	การวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ	49
4.1	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิส่วนฉีดสาร 230, 250, 260, 270 และ280 °C	51
4.2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของส่วนฉีดสารและพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สภาวะการทดลอง คือ อุณหภูมิของคอลัมน์150 °C (1 นาที) 20 °C /minถึง 260 °C (3.50 นาที) อุณหภูมิตัวตรวจวัด 300 °C อัตราการไหลของแก๊สพา 0.8 ml/min	52
4.3	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิคอลัมน์ 100, 120, 150, 180 และ 200 °C	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของคอลัมน์และพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สภาวะการทดลองคือ อุณหภูมิของส่วนฉีดสาร250 °C อุณหภูมิตัวตรวจวัด 300 °C อัตราการไหลของแก๊สพา 0.8 mL/min	54
4.5	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิตัวตรวจวัด 270, 280, 290, 300 และ 310 °C	55
4.6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของตัวตรวจวัดและพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สภาวะการทดลองคือ อุณหภูมิของส่วนฉีดสาร 250 °C อุณหภูมิของคอลัมน์ 150 °C (1 นาที) 20 °C /min ถึง 260 °C (3.50 นาที) อัตราการไหลของแก๊สพา 0.8 mL/min	56
4.7	โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อัตราการไหลของแก๊สพา (flow rate) 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที	57
4.8	กราฟ Van Deemter Plotระหว่างอัตราการไหลของแก๊สพา (flow rate) สภาวะการทดลอง คือ อุณหภูมิของส่วนฉีดสาร 250 °C อุณหภูมิของคอลัมน์ 150 °C (1 นาที) 20 °C /min ถึง 260 °C (3.50 นาที)	58
4.9	กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์	59
4.10	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผสมสารด้วยเครื่อง shaker และ vortex	61
4.11	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, และ 1.0ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารสกัดได้แก่ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน และบิวทิลอะซิเตท	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.12	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้แก่ 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 โมลาร์	64
4.13	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เวลาในการสกัด ได้แก่ 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 นาที	65
4.14	แสดงความเป็นเส้นตรงของเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ	67
4.15	โครมาโทแกรมของเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะ	70

คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ

สัญลักษณ์และอักษรย่อ	คำอธิบาย
cm	เซนติเมตร
°C	องศาเซลเซียส
g	กรัม
mL	มิลลิลิตร
mm	มิลลิเมตร
µm	ไมโครเมตร
mg/g	มิลลิกรัมต่อกรัม
M	โมลาริตี
ppm	ส่วนในล้านส่วน
ppb	ส่วนในพันล้านส่วน
% RSD	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
SD	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
mg/L	มิลลิกรัมต่อลิตร
µg/L	ไมโครกรัมต่อลิตร
µg/kg	ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม
mg/kg	มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
LOD	ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด
LOQ	ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ
µg/mL	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

บทที่ 1
บทนำ

ประเทศไทยมีการแพร่ระบาดของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 โดยใช้ในฐานทัพของอเมริกา ต่อมาใช้กันอย่างกว้างขวางในกลุ่มผู้ขับขี่รถบรรทุกและรถโดยสาร กลุ่มคนงานในภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม กลุ่มแรงงานแบกหาม กลุ่มแรงงานตัดอ้อย เพื่อเป็นยาแก้ง่วงให้ทำงานได้ทนทานมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีการใช้ในกลุ่มเยาวชนทั้งในและนอกสถานศึกษาเพื่อความบันเทิง ความสนุกสนาน เมื่อปี พ.ศ.2518 แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน จัดเป็นวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทประเภท 2 ตาม พ.ร.บ.วัตถุที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท ในปัจจุบันจัดเป็นสารเสพติดให้โทษชนิดร้ายแรงประเภทที่ 1 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษปี พ.ศ.2522 การใช้ยาในระยะแรกทำให้ร่างกายเกิดการตื่นตัวตลอดเวลา ทำให้หัวใจเต้นเร็ว ความดันโลหิตเพิ่ม ใจสั่น เมื่อหมดฤทธิ์ยาจะหลับและอ่อนเพลียผิดปกติ ถ้าใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้เกิดความคิดสับสน เบื่ออาหาร เพ้อคลั่งและประสาทหลอน เกิดอาการทางจิตถ้าได้รับยาในขนาดสูงจะมีฤทธิ์กดประสาทและระบบหายใจทำให้หมดสติถึงตายได้ จึงจัดเป็นยากระตุ้นประสาท ปัจจุบันเรียกสารกลุ่มนี้ว่า "ยาบ้า" (กรมการแพทย์, 2542)

1.1 ความเป็นมาและลักษณะสำคัญของยาเสพติด

เมทแอมเฟตามีน (Methamphetamine) เป็นสารที่ไม่ได้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ได้โดยสังเคราะห์ขึ้นเป็นครั้งแรก เมื่อปี ค.ศ.1919 โดยนักเภสัชวิทยาชาวญี่ปุ่นชื่อ A.Ogata ซึ่งเป็นเวลาใกล้เคียงที่แอมเฟตามีน (Amphetamine) ถูกสังเคราะห์ขึ้นมา สมบัติของสารกลุ่มแอมเฟตามีนจะมีผลต่อประสาทซิมพาเทติค (Sympathetic nerve) ทำให้สารกลุ่มนี้ใช้เป็นยาเพื่อทำให้หลอดเลือดขยายตัว ใน ค.ศ.1932 ถูกผลิตเป็นยาดมสำหรับบรรเทาอาการหวัดคัดจมูก ยานี้มีฤทธิ์กระตุ้นประสาทส่วนกลาง ทำให้วงการแพทย์นำมาใช้รักษาอาการซึมเศร้า อาการทางจิตในสตรีระยะใกล้หมดประจำเดือน คนสูงอายุ ผู้ป่วยโรคง่วงหลับ (Narcolepsy) หรือใช้เป็นยาลดความอ้วน ทั้งนี้ต้องอยู่ภายใต้การดูแลของแพทย์อย่างใกล้ชิด แต่ระยะหลังมีการนำไปใช้นอกเหนือไปจากวัตถุประสงค์ในทางการแพทย์ (กรมการแพทย์, 2542)

สารแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในยาบ้าถูกดูดซึมได้ดีในทางเดินอาหารและดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดกระจายไปตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย ออกฤทธิ์ที่สมอง

และขับออกจากร่างกายได้หลายทาง โดยอาจจะถูกขับออกมาทางลมหายใจ เหงื่อและปัสสาวะ ในการตรวจวิเคราะห์สารเมทแอมเฟตามีนสามารถตรวจพบได้ในตัวอย่างที่มาจากร่างกาย เช่น เลือด น้ำลาย เส้นผมและปัสสาวะ ซึ่งภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากเสพยาบ้าสารออกฤทธิ์ในยาบ้าจะถูกขับออกทางปัสสาวะในปริมาณค่อนข้างสูง การเก็บตัวอย่างปัสสาวะจึงทำได้ง่ายกว่าการเจาะเลือด การเก็บน้ำลายและเส้นผม ดังนั้นจึงนิยมตรวจหาผู้เสพยาบ้าในปัสสาวะด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น การทดสอบเบื้องต้นด้วยปฏิกิริยาเคมีและทางภูมิคุ้มกันวิทยาและตรวจยืนยันผลด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography: TLC) โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas - Chromatography: GC) หรือแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปคโตเมตรี (Gas Chromatography Mass Spectrometry: GC - MS) เป็นต้น (พุทธรักษา วรานุศุภากุล, 2553)

ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีนในปัสสาวะส่วนใหญ่จะใช้เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีและแก๊สโครมาโทกราฟี เพราะเป็นวิธีการตรวจยืนยันขั้นพื้นฐานที่มีราคาถูก แต่มีข้อจำกัด คือ ในแต่ละขั้นตอนของการเตรียมและการตรวจวัดตัวอย่าง จะใช้เวลานาน สำหรับการสกัดเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะโดยทั่วไปทำได้โดยวิธี Solid phase microextraction, (SPME) วิธี Liquid Liquid microextraction, (LLE) วิธี Pre on column และวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งวิธีดังกล่าว ต้องใช้ขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างหลายขั้นตอนได้แก่ ขั้นตอนการสกัด ขั้นตอนการกำจัดสิ่งปนเปื้อน ขั้นตอนการทำให้เข้มข้นก่อนการวิเคราะห์และขั้นตอนการวิเคราะห์ ซึ่งในขั้นตอนการกำจัดสารอินทรีย์ปนเปื้อนสามารถทำได้โดยใช้ วิธี Solid Phase Extraction (SPE) ขั้นตอนการทำให้สารสกัดเข้มข้นขึ้นอาจทำโดยการระเหยตัวทำละลาย การที่สารตัวอย่างต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอน อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สูญเสียสารเป้าหมายที่ระเหยง่ายได้ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่สิ้นเปลืองวัสดุ ค่าใช้จ่ายสูง ต้องใช้แรงงานและใช้เวลาในการวิเคราะห์มาก และมักเกิดปัญหาเกี่ยวกับการใช้ตัวทำละลายมากซึ่งตัวทำละลายที่ใช้ยังเป็นตัวทำละลายที่มีพิษอีกด้วย

การสกัดระบบของเหลว - ของเหลว (LLE) คือการแยกองค์ประกอบของสารที่ต้องการออกจากสารละลายที่เป็นของเหลวโดยใช้ตัวทำละลาย (solvent) อีกตัวหนึ่งที่เป็นของเหลวซึ่งไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับสารละลายข้างต้น โดยทั่วไปการแยกสารด้วยการ SPME มักมีค่าใช้จ่ายสูงกว่า LLE ดังนั้นจึงสามารถใช้การสกัดแบบ LLE เป็นทางเลือกหนึ่งได้ ในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเทคนิคการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบ LLE โดยใช้ตัวทำละลายเป็นสารสกัดและประยุกต์ใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีที่มีตัวตรวจวัดเฟลมไอออไนเซชัน (Gas Chromatography - Flame Ionization detector: GC - FID) นำมาตรวจวัดเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ หลังจากการสกัดด้วยตัวทำละลาย

ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็วและประหยัดค่าใช้จ่าย อีกทั้งเทคนิค GC - FID เป็นเครื่องมือที่มีใช้อย่างแพร่หลายในหน่วยงานทางด้านวิทยาศาสตร์ ให้ผลการตรวจวัดที่มีค่าถูกต้องแม่นยำ และเชื่อถือได้เพื่อประโยชน์ในทางการแพทย์และงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ต่อไป (วรางค์ บุญช่วย และดวงพร อภิกันตพันธ์, 2541)

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของเหลว เช่น เครื่องผสมสาร ชนิดของตัวทำละลาย ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เวลาที่ใช้ในการสกัด เป็นต้น

1.2.2 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีด้วยตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน

1.2.3 เพื่อศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) สำหรับตรวจวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของเหลว

1.2.4 เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคที่พัฒนาได้กับตัวอย่างจริง

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1.3.1 ศึกษาวิธีการสกัดเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะตัวอย่างที่เตรียมในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีด้วยตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน และศึกษาตัวแปร (parameter) ต่างๆ ของวิธีการสกัด

1.3.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีด้วยตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชันโดยการใช้สารมาตรฐาน

1.3.3 ชนิดของยาเสพติด คือ เมทแอมเฟตามีน

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีการและสภาวะสกัดสำหรับการวิเคราะห์หาเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะที่มีความเหมาะสม สะดวก มีความถูกต้อง แม่นยำ มีประสิทธิภาพ ราคาถูก และสามารถนำมาใช้ในการปฏิบัติงานได้ และประยุกต์ใช้เทคนิคที่พัฒนาได้กับตัวอย่างจริง

1.5 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ พิสูจน์หลักฐาน จังหวัดอุบลราชธานี

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความหมายของยาเสพติดให้โทษ

ยาเสพติดให้โทษ คือ ยาเสพติดให้โทษ ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 (ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2528 และฉบับที่ 3 พ.ศ. 2530) ซึ่งหมายถึง สารเคมีหรือวัตถุชนิดใดๆ ซึ่งเมื่อเสพเข้าสู่ร่างกายไม่ว่าจะรับประทาน ดม สูบ ฉีดหรือด้วยประการใดๆ แล้ว ทำให้เกิดผลต่อร่างกายและจิตใจในลักษณะสำคัญเช่น ต้องเพิ่มขนาดการเสพขึ้นเป็นลำดับ มีการถอนยาเมื่อขาดยา มีความต้องการเสพทั้งทางร่างกายและจิตใจอย่างรุนแรงตลอดเวลาและสุขภาพโดยทั่วไปจะทรุดโทรมลง กับให้รวมตลอดถึงพืชหรือส่วนของพืชที่เป็นหรือให้ผลผลิตเป็นยาเสพติดให้โทษ หรืออาจใช้ผลิตเป็นยาเสพติดให้โทษและสารเคมีที่ใช้ในการผลิตยาเสพติดให้โทษด้วย ทั้งนี้ตามที่รัฐมนตรีประกาศในราชกิจจานุเบกษา แต่ไม่หมายความถึงยาสามัญประจำบ้านบางตำราตามกฎหมายว่าด้วยยาที่มียาเสพติดให้โทษผสมอยู่ ยาเสพติดให้โทษแบ่งได้ 5 ประเภท (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 135 (พ.ศ. 2539) เรื่องระบุชื่อและประเภทยาเสพติดให้โทษ ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 (Hiroyuki, I. et al., 2008)

2.2 ประเภทของยาเสพติดให้โทษ

ยาเสพติดให้โทษประเภท 1 เช่นเฮโรอีน เมทแอมเฟตามีน เอ็มดีเอ็มเอ (ยาอี) ยาเสพติดให้โทษประเภทนี้ไม่มีประโยชน์ทางการแพทย์

ยาเสพติดให้โทษประเภท 2 เช่น มอร์ฟีน โคดีอีน เพทิดีน เมทาโดน และฝิ่น ยาเสพติดให้โทษประเภทนี้มีประโยชน์ทางการแพทย์ แต่ก็มีโทษมาก ดังนั้นจึงต้องใช้ภายใต้การควบคุมของแพทย์และใช้เฉพาะในกรณีที่จำเป็นเท่านั้น

ยาเสพติดให้โทษประเภท 3 เป็นยาสำเร็จรูปที่ผลิตขึ้นตามทะเบียนตำรับ ที่ได้รับอนุญาตจากกระทรวงสาธารณสุขแล้ว มีจำหน่ายตามร้านขายยา ได้แก่ ยาแก้ไอ ที่มีตัวยาโคดีอีน หรือยาแก้ท้องเสียที่มีตัวยาไดเฟนอกซินเป็นต้น ยาเสพติดให้โทษประเภท 3 มีประโยชน์ทางการแพทย์และมีโทษน้อยกว่ายาเสพติดให้โทษอื่นๆ

ยาเสพติดให้โทษประเภท 4 เป็นน้ำยาเคมีที่นำมาใช้ในการผลิตยาเสพติดให้โทษประเภท1 ได้แก่ น้ำยาเคมี อาซิติกแอนไฮไดรด์ อาซิติลคลอไรด์ เอทิลิดีน ไดอาเซตท สารเออร์โกเมทรีน และคลอซูโดอีเฟดรีน ยาเสพติดให้โทษประเภทนี้ส่วนใหญ่ไม่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดรักษาอาการของโรคแต่อย่างใด

ยาเสพติดให้โทษประเภท 5 ได้แก่ พืชกัญชา พืชกระท่อม พืชฝิ่น และพืชเห็ดขี้ควาย ยาเสพติดให้โทษประเภทนี้ไม่มีประโยชน์ทางการแพทย์ (วรางค์ บุญช่วย และดวงพร อภิกันตพันธ์, 2541)

2.3 ระยะเวลาการออกฤทธิ์

วิธีการสูบควันหรือไอระเหย	ออกฤทธิ์ทันที
วิธีสูดผงยาเข้าโพรงจมูก	ออกฤทธิ์ภายใน 3 - 5 วินาที
วิธีฉีดเข้าหลอดเลือดดำ	ออกฤทธิ์ภายใน 15 - 30 วินาที
วิธีกิน	ออกฤทธิ์ภายใน 30 นาที

โดยสามารถออกฤทธิ์ได้อย่างยาวนาน 8 - 24 ชั่วโมง ดังนั้นการเสพซ้ำหลายๆ ครั้งใน 1 วัน จะส่งผลให้ปริมาณเมทแอมเฟตามีนในเลือดสูงขึ้น อาการประสาทหลอนและคลุ้มคลั่ง จึงมักปรากฏให้เห็นในหมู่ผู้เสพที่เสพซ้ำวันละหลายครั้งเป็นส่วนใหญ่ (Lillsunde, P. and Korte, T, 1997)

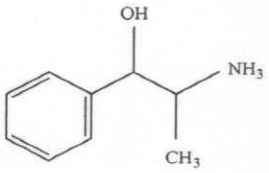
2.4 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีเมทแอมเฟตามีน

ยาบ้า มีลักษณะเป็นยาเม็ดกลมแบนขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6 - 8 มิลลิเมตร ความหนาประมาณ 3 มิลลิเมตร น้ำหนักเม็ดยา ประมาณ 80 - 100 มิลลิกรัม มีสีต่างๆ กัน เช่น สีส้ม สีน้ำตาล สีม่วง สีชมพู สีเทา สีเหลือง และสีเขียว เป็นต้น มีสัญลักษณ์ที่ปรากฏบนเม็ดยา เช่น ฬ, ?,M , PG, WY, สัญลักษณ์รูปดาว, รูปพระจันทร์เสี้ยว, 99 หรืออาจเป็นลักษณะของเส้นแบ่งครึ่งเม็ด ซึ่งสัญลักษณ์เหล่านี้อาจปรากฏบนเม็ดยาด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้าน หรืออาจเป็นเม็ดเรียบทั้งสองด้านก็ได้ (Kataoka, H., Lord, H.L. and Pawliszyn, J, 2000)

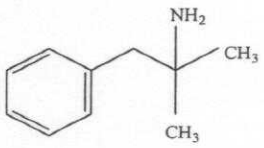
เมทแอมเฟมีนและแอมเฟตามีนเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในยาบ้า ซึ่งเป็นยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 1 ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 135 (พ.ศ. 2539) เรื่องระบุชื่อและประเภทยาเสพติดให้โทษ ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ สมบัติทางเคมีและทางกายภาพของเมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีนเป็นยาเสพติดให้โทษที่สังเคราะห์ขึ้น โดยมีสารไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ โมเลกุลประกอบด้วยวงเบนซีนและเชื่อมติดกัน โดยใช้พันธะ C - C และมีหมู่เอ

มีนร่วมอยู่ด้วย ตัวอย่างสูตรโครงสร้าง สูตรโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล จุดเดือดหรือจุดหลอมเหลว ของยาเสพติดและยา จำนวน 6 ชนิด ดังภาพที่ 2.1

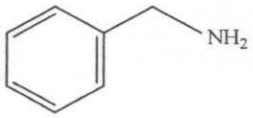
เมทแอมเฟตามีนลักษณะเป็นผงผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น มีรสขม อยู่ในรูปเกลือไฮโดรคลอไรด์ละลายน้ำและอัตราของน้ำกับเอทานอล คลอโรฟอร์ม ไม่ละลายในอีเทอร์ ตารางที่ 2.1 แสดงการละลายของเมทแอมเฟตามีนในตัวทำละลายชนิดต่างๆ รูปแบบที่นำมาใช้อาจเป็น ยาเม็ด แคปซูล ผงยา หรือเป็นผลึกใสคล้ายน้ำแข็ง “ice” เป็นอนุพันธ์ของแอมเฟตามีนสำหรับแอมเฟตามีนลักษณะเป็นผงผลึกสีขาวอยู่ในรูปซัลเฟตละลายในน้ำ 1 : 9 ในอีเทอร์ 1 : 15 ไม่ละลายในคลอโรฟอร์มและอีเทอร์ (พุทธรักษา วรานุศุภากุล, 2553)



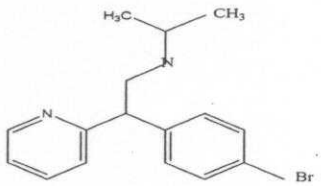
Phenylpropanolamine ($C_9H_{13}NO$)
น้ำหนักโมเลกุล 151.2
จุดหลอมเหลว 191 - 196 °C



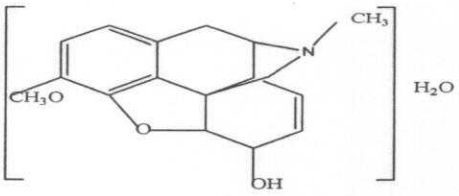
Phentermine ($C_{10}H_{15}N$)
น้ำหนักโมเลกุล 149.2
จุดหลอมเหลว 198 °C



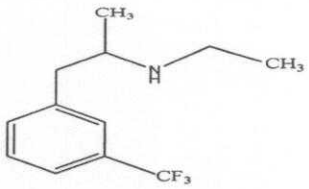
Benzylamine (C_7H_9N)
น้ำหนักโมเลกุล 107.15
จุดหลอมเหลว 185 °C



Brompheniramine ($C_{16}H_{19}BrN_2$)
น้ำหนักโมเลกุล 319.2
จุดเดือด 147 - 152 °C
จดหลอมเหลว 130 - 135 °C



Codeine ($C_{18}H_{21}NO_3.H_2O$)
น้ำหนักโมเลกุล 317.4
จุดหลอมเหลว 154 - 158 °C



Fenfluramine ($C_{12}H_{16}F_3N$)
น้ำหนักโมเลกุล 231.3
จุดหลอมเหลว 168 - 172 °C

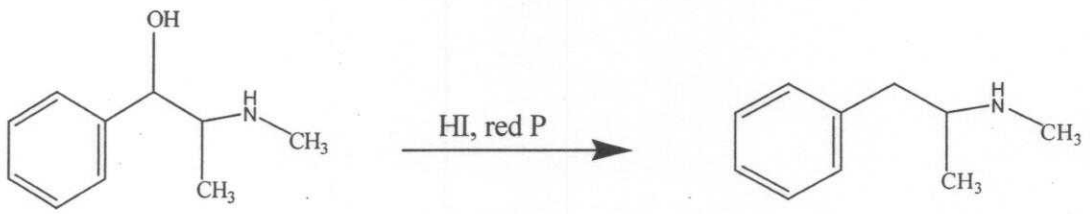
ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้าง สูตรโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล จุดเดือดหรือจุดหลอมเหลวของสารเสพติด (สุภาพรรณ ทีฆะสุข, 2548)

ตารางที่ 2.1 การละลายได้ของเมทแอมเฟตามีน (Forensic Science International, 2009)

การละลาย	Base	Hydrochloride
Water	ละลายได้น้อย	ละลาย
Ethanol	ละลาย	ละลาย
Diethyl ether	ละลาย	ไม่ละลาย
Chloroform	ละลาย	ละลาย

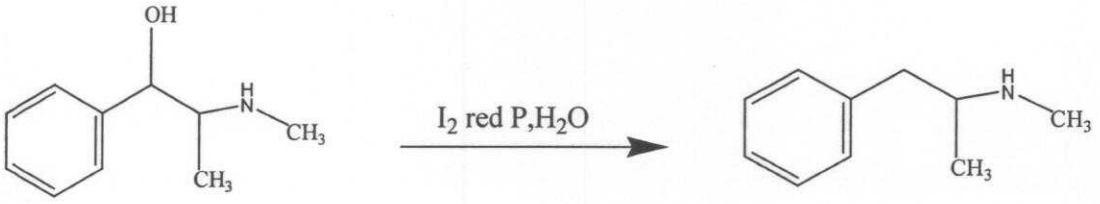
2.5 การสังเคราะห์เมทแอมเฟตามีน โดยการทำปฏิกิริยาทางเคมีหลายๆ วิธีเช่น Nagai method, Moscow method, Rosenmund method และEmde method

2.5.1 Nagai method ใช้สารตั้งต้น (precursor) ได้แก่ อีเฟดรีนหรือซูโดอีเฟดรีนและใช้เคมีภัณฑ์จำเป็น ซึ่งเป็นตัวทำละลายอัน ได้แก่ กรดไฮโดรไอโอดิกและตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี ได้แก่ ฟอสฟอรัสแดง



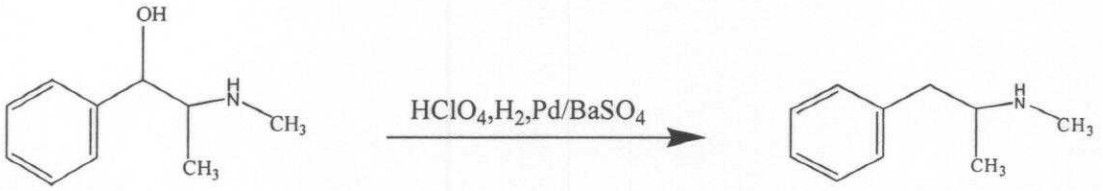
ephedrine methamphetamine

2.5.2 Moscow method ใช้สารตั้งต้น (precursor) ได้แก่ อีเฟดรีนหรือซูโดอีเฟดรีนและใช้เคมีภัณฑ์จำเป็น ซึ่งเป็นตัวทำละลายอันได้แก่ กรดไฮโดรไอโอดริก และตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี ได้แก่ น้ำ ไอโอดีนและฟอสฟอรัสแดง



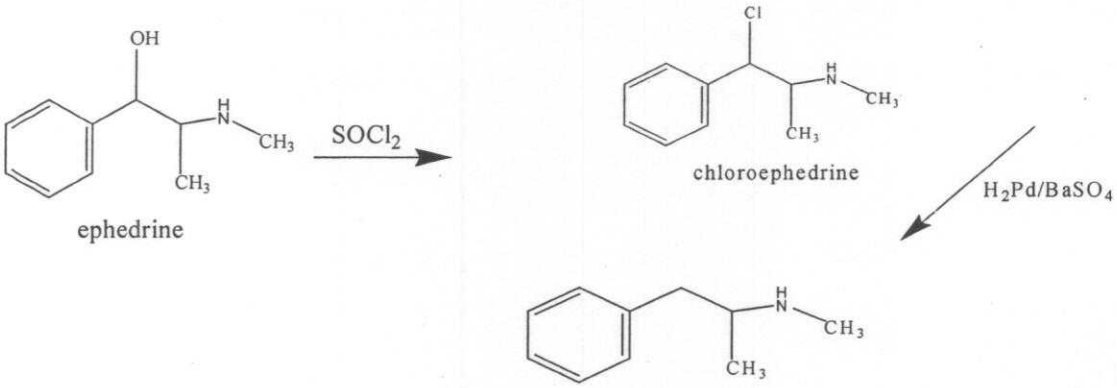
ephedrine methamphetamine

2.5.3 Rosenmund method ใช้สารตั้งต้น (precursor) ได้แก่ อีเฟดรีนหรือซูโดอีเฟดรีนและใช้เคมีภัณฑ์จำเป็น ซึ่งเป็นตัวทำละลายอันได้แก่ กรดเพอร์คลอริก และตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี ได้แก่ แพลเลเดียมและแบเรียมซัลเฟต



ephedrine methamphetamine

2.5.4 Emde method ใช้สารตั้งต้น (precursor) ได้แก่ อีเฟดรีนหรือซูโดอีเฟดรีนและใช้เคมีภัณฑ์จำเป็น ซึ่งเป็นตัวทำละลายอันได้แก่ ไทโอนิลคลอไรด์และตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี ได้แก่ แพลเลเดียมและแบเรียมซัลเฟต



ephedrine chloroephedrine methamphetamine

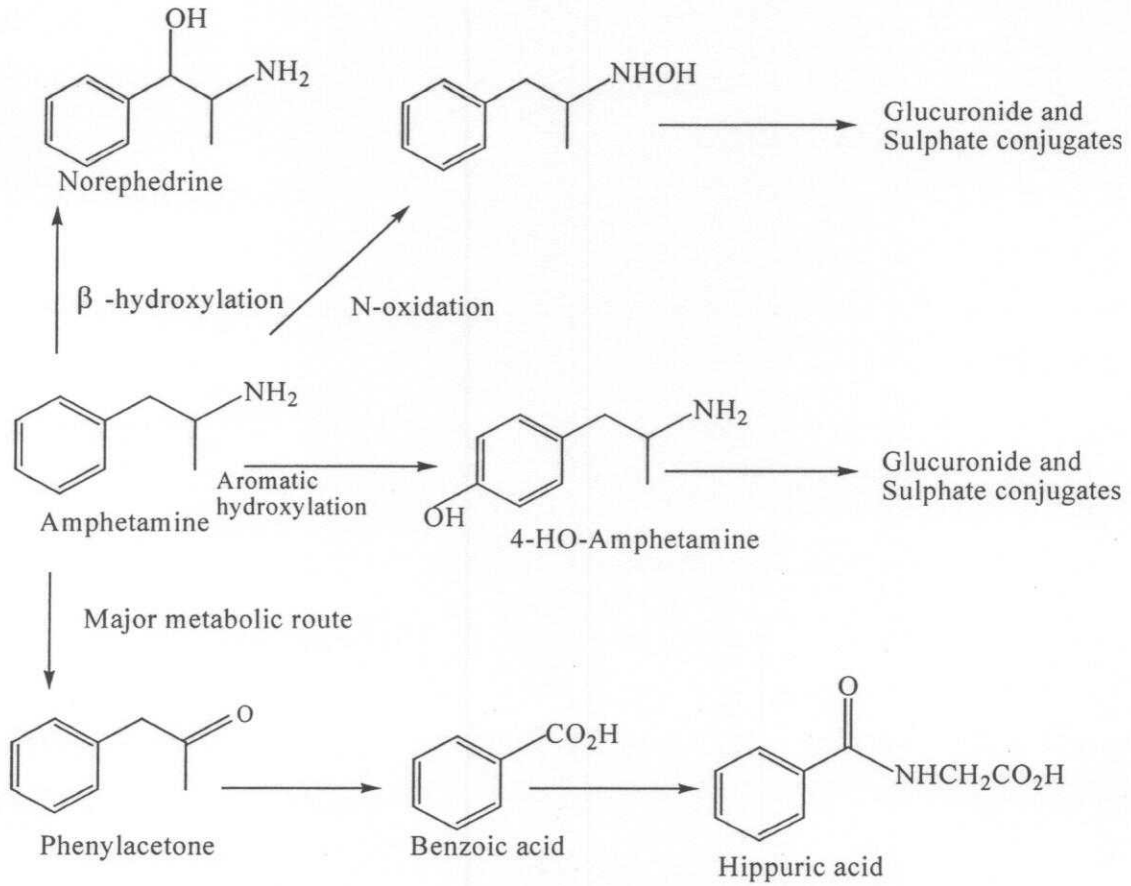
สารอีเฟดรีนและซูโดอีเฟดรีนเป็นสารที่มีสูตรโมเลกุลเหมือนกันแต่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีต่างกัน (diastereomer) ดังนั้นจึงนำมาใช้แทนที่กันในปฏิกิริยาทางเคมีที่ใช้ในการผลิตเมทแอมเฟตามีน (ธานี ทองโรจน์ วีระศักดิ์ สามี และนริศา คำแก่น, 2553)

2.6 เมตาบอลิซึมและการขับออกของสารเมทแอมเฟตามีน

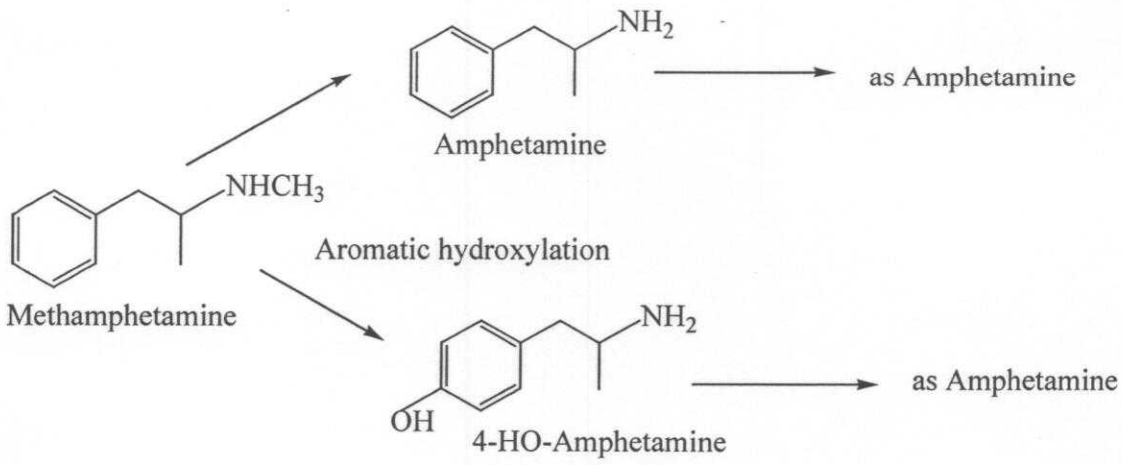
เมื่อรับประทานเมทแอมเฟตามีนในปริมาณ 2.5 - 15 มิลลิกรัม ภายใน 2 ชั่วโมง จะพบในพลาสมาปริมาณสูงถึง 30 - 170 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าครึ่งชีวิตในพลาสมาอยู่ในช่วง 8 ถึง 12 ชั่วโมง โดยทั่วไปความเข้มข้นในเลือดที่ทำให้เสียชีวิตมีค่าสูงกว่า 500 มิลลิกรัมต่อลิตร แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนจะเริ่มพบได้ในปัสสาวะภายในเวลา 20 นาที หลังจากเสพ โดยทั่วไปประมาณ 20 - 30% ของปริมาณยาที่รับเข้าไป แอมเฟตามีนจะถูกขับออกมาในรูปเดิมและถูกดึงหมู่เอมีนออกอยู่ในรูปของกรดฮิปปูริคและกรดเบนโซอิค และเปลี่ยนรูปอยู่ในโครงสร้างที่มีกลุ่ม Hydroxyl และ conjugates ประมาณ 25% วิถีเมตาบอไลต์ (Metabolic Pathway) ของแอมเฟตามีน (สำนักงานป้องกันและปราบปรามยาเสพติด, 2553) ดังภาพที่ 2.2 อัตราส่วนและขนาดของการขับ

ออกในรูปเดิมของแอมเฟตามีนขึ้นอยู่กับความเป็นกรด - ด่างของปัสสาวะ ถ้าปัสสาวะมีสภาพเป็นด่างแอมเฟตามีนจะถูกขับออก ประมาณ 45% ภายใน 24 ชั่วโมง และอยู่ในรูปเดิม 2% ถ้าปัสสาวะมีสภาพเป็นกรดแอมเฟตามีนจะถูกขับออกมาถึง 78% ภายใน 24 ชั่วโมง ซึ่ง 68% อยู่ในรูปเดิม เนื่องจากแอมเฟตามีนที่ถูกขับออกทางปัสสาวะในรูปเดิมมีปริมาณค่อนข้างสูง ดังนั้นการตรวจหาสารแอมเฟตามีนจึงนิยมตรวจทางปัสสาวะ

สารเมทแอมเฟตามีนจะเริ่มพบได้ในปัสสาวะภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากที่รับประทานยาบ้าหรือสารออกฤทธิ์เมทแอมเฟตามีนจะถูกขับออกทางปัสสาวะ ประมาณ 44% จะถูกขับออกในรูปเมทแอมเฟตามีนและบางส่วนถูกขับออกในรูปที่ถูกเปลี่ยนแปลงเป็นแอมเฟตามีนประมาณ 4 - 6% และ 4 - ไฮดรอกซีเมทแอมเฟตามีน ประมาณ 10% สำหรับอีเฟดรีนก็เช่นเดียวกันจะถูกขับออกในรูปของอีเฟดรีน ประมาณ 55 - 75% ส่วนตัวยาที่เหลือจะถูกเปลี่ยนแปลงและขับออกในรูปของนอร์อีเฟดรีน กรดเบนโซอิคและกรดฮิปปูริค ดังภาพที่ 2.3 เมื่อเสพยาเป็นประจำสามารถตรวจพบสารเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 25 - 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (พุทธรักษา วรานุศุภากุล, 2553)



ภาพที่ 2.2 วิธีเมตาบอไลต์ของแอมเฟตามีนในมนุษย์ (United nations, 1995: 60)



ภาพที่ 2.3 วิธีเมตาบอไลต์ของเมทแอมเฟตามีนในมนุษย์ (United nations, 1995: 61)

2.7 หลักการพื้นฐานการแยกด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของเหลว (Liquid - Liquid Extraction)

การตรวจวัดบางเทคนิคที่มีความจำเพาะกับสารชนิดหนึ่งอาจถูกรบกวนจากสารอื่นๆ เช่น สารรบกวน (Interference) หรือเมทริกซ์ (Matrix) ที่เป็นองค์ประกอบในสารตัวอย่างทำให้ได้สัญญาณมากไปหรือน้อยไป จึงต้องแยกสารรบกวนออกจากสารที่เราสนใจ (analyte) การแยก คือ กระบวนการที่ทำให้ของผสมแบ่งออกเป็นอย่างน้อยสองส่วน โดยมีองค์ประกอบที่ต่างกัน โดยในส่วนหนึ่งมีสัดส่วนโมล (เนื้อสาร) ขององค์ประกอบหนึ่งเพิ่มขึ้น (หรือมากกว่า) เมื่อเทียบกับองค์ประกอบอื่นๆ ในของผสมตั้งต้น (ศูนย์ข้อมูลสนเทศการวิจัย สภาวิจัยแห่งชาติ, 2553)

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างเทคนิคการแยกสาร

วิธีการแยก	หลักการพื้นฐาน
การตกตะกอน	ความแตกต่างของการละลายของสารประกอบ
การกลั่น	ความแตกต่างของการละลายเป็นไอของสารประกอบ
การสกัด	ความแตกต่างของการละลายในของเหลวชนิดที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน
การแลกเปลี่ยนไอออน	ความแตกต่างของแรงกระทำของไอออนบนไอออนเอกซ์เรซิน (Ion Exchange Resin)
โครมาโทกราฟี (Chromatography)	ความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารบนเฟสคงที่
อิเล็กโตรโฟเรซิส (Electrophoresis)	ความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของสารในสนามไฟฟ้า
ฟิล์วโฟลแฟรคชันเนชัน (Field Flow Fractionation)	ความแตกต่างของแรงกระทำในสนามแรงหรือการเปลี่ยนแปลงของแรงในแนวตั้งฉากกับทิศทางการเคลื่อนที่

การสกัด (Extraction) เป็นการดึงเอาสารที่ต้องการมาอยู่ในตัวสกัด โดยจะขึ้นกับสมดุลของการกระจายตัวของตัวถูกละลายระหว่างเฟส 2 เฟสที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน เทคนิคการสกัดในปัจจุบันอาจแบ่งตามเฟสของตัวสกัดได้เป็น

(1) การสกัดด้วยเฟสของเหลว (Liquid - Liquid Extraction: LLE)

(2) การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid - Phase Extraction: SPE)

2.7.1 การสกัดด้วยเฟสของเหลว (พุทธรักษา วรานุศุภากุล, 2553)

การสกัดด้วยเฟสของเหลว (Liquid - Liquid Extraction: LLE) เป็นการแยกสารที่ต้องการจากสารละลายด้วยเฟสของเหลว สมดุลของการกระจายตัวของตัวถูกละลายระหว่างเฟสของเหลว 2 ชนิดที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน ส่วนใหญ่ได้แก่น้ำ (aqueous: aq) และตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (organic: org)

$$A_{aq} \longleftrightarrow A_{org}$$

ค่าคงที่สมดุลของการกระจายตัว, K_d สารละลายที่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์จะมีการกระจายตัวอยู่ที่ชั้น organic มากกว่าชั้นน้ำ และในทางตรงกันข้ามสำหรับสารที่ละลายในน้ำได้ดี

$$K_d = \frac{(aA)_{org}}{(aA)_{aq}} \approx \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}} \qquad (2.1)$$

สำหรับการสกัดสารจากน้ำด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ค่า K_d ของสารที่ชอบละลายในตัวทำละลายอินทรีย์จะสูงกว่าสารที่ชอบละลายในน้ำ

ขั้นตอนในการสกัดด้วยเฟสของเหลวมี ดังนี้

1. เติมตัวทำละลายในสารละลายที่ต้องการสกัด
2. เขย่าเพื่อเพิ่มโอกาสในการแพร่กระจายของสารจากสารละลายสู่ตัวทำละลายอินทรีย์
3. ตั้งทิ้งไว้ให้เฟสของเหลวทั้ง 2 เฟสแยกออกจากกัน

2.7.2 ประสิทธิภาพของการสกัด (พุทธรักษา วรานุศุภากุล, 2553) ประสิทธิภาพ ของการสกัด (E) หรือ Recovery (R) สามารถคำนวณได้ดังสมการที่ 2 .2

$$E = \frac{n_{org}}{n_0} = \frac{C_{org}V_{org}}{(C_{org}Vorg + C_{aq}Vaq)} = \frac{K\beta}{(1+K\beta)} \qquad (2.2)$$

ß = phase ratio; V_{org} / Vaq

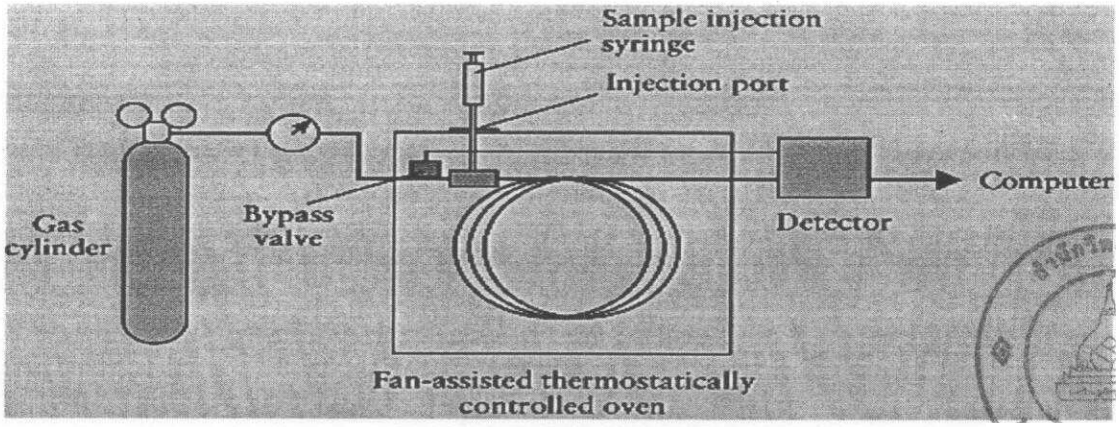
สัดส่วนของสารที่ถูกสกัด (E) หลังการสกัด n ครั้ง $$E = 1-\left[\frac{1}{(1+K\beta)}\right]$$ (2.3)

การสกัดด้วยเฟสของเหลว นิยมใช้สกัดสาร non - semi volatile organic compounds ในตัวอย่างน้ำ การเลือกตัวทำละลายที่จะมาสกัด ใช้หลักการ "like dissolves like" ปริมาณสารที่ถูกสกัดขึ้นกับ K_d และ ß

การสกัดโดยการแบ่งปริมาตรตัวทำละลายสกัดหลายๆ ครั้งจะสามารถสกัดสารได้ในปริมาณที่มากกว่าการสกัดเพียงครั้งเดียวด้วยตัวทำละลายที่มีปริมาตรรวมเท่ากัน ประสิทธิภาพการสกัด Recovery (R) ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นตั้งต้นของสารในสารละลายตัวอย่าง

2.8 หลักการพื้นฐานแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography: GC) (แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม, 2553)

แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography: GC) ประกอบด้วยส่วนสำคัญต่างๆ ดังแผนภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (ศูนย์บริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์, 2553)

แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography: GC) เป็นเทคนิคที่เหมาะกับการแยก และวิเคราะห์สารโมเลกุลเล็กที่ระเหยได้ เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีมีองค์ประกอบพื้นฐานที่สำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนแรกเป็นถังบรรจุแก๊สพา ส่วนที่สองเป็นห้องควบคุมอุณหภูมิหรือตู้อบที่มีส่วนฉีดสาร (Injection Port) คอลัมน์และตัวตรวจวัดติดตั้งอยู่ภายในพร้อมตัวควบคุมอุณหภูมิและส่วนสุด

ท้ายเป็นคอมพิวเตอร์ที่ใช้เก็บและประมวลผลข้อมูล (Data Processing Storage) ดังแสดงในภาพที่ 2.4

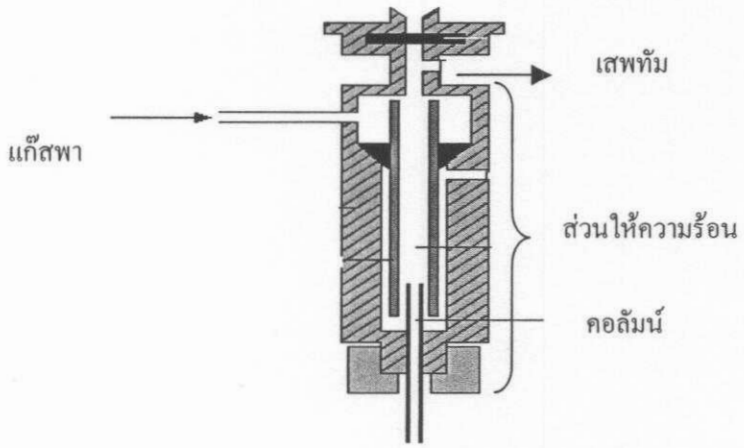
2.8.1 กระบวนการแยกสารโดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

แก๊สโครมาโทกราฟีเป็นรูปแบบหนึ่งของกระบวนการแยกสารทางโครมโทกราฟี โดยที่โครมาโทกราฟีทุกรูปแบบเกี่ยวข้องกับการแบ่งส่วน (Partition) หรือการแจกแจง (Distribution) ของสารประกอบใดๆ ในวัฏภาค (Phase) ที่แตกต่างกันสองวัฏภาคโดยวัฏภาคหนึ่งเป็นวัฏภาคที่คงที่ (Stationary Phase) และอีกวัฏภาคหนึ่งเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase) การแบ่งจำนวนและการแจกแจงของสารประกอบใดๆ ระหว่างวัฏภาคทั้งสองจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับการละลายสัมพัทธ์ (Relative Solubility) ของสารนั้นในแต่ละวัฏภาค เมื่อสารประกอบในของผสมเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคคงที่ โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่นำไป จะทำให้สารประกอบแต่ละตัวที่เป็นองค์ประกอบในของผสมถูกเหนี่ยวรั้งมากน้อยแตกต่างกันไป เนื่องจากความสามารถในการละลายที่แตกต่างกัน สารจึงสามารถถูกแยกออกจากกันได้ ซึ่งสารใดที่มีความสามารถในการละลายในวัฏภาคคงที่มากกว่าก็จะใช้เวลามากกว่าในการเคลื่อนที่ โดยเวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ในการเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นถึงจุดสุดท้ายบนวัฏภาคคงที่จะแตกต่างกันไป ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารแต่ละชนิดและเป็นค่าเฉพาะของสารแต่ละตัวเรียกเวลานี้ว่าเวลาที่คงอยู่หรือเวลารีเทนชัน (Retention Time หรือ t_R) (วีรวรรณ เล็กสกุลไชย, 2548)

กระบวนการแยกองค์ประกอบในสารผสมด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เริ่มจากแก๊สพาซึ่งทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ไหลออกจากถังบรรจุแก๊ส (Gas Cylinder) โดยมีความดันที่ควบคุมโดยตัวควบคุมความดัน (Pressure regulator) หลังจากนั้นแก๊สพาจะไหลผ่านตัวกรอง (Filter) เพื่อกำจัดความชื้นและสิ่งเจือปนอื่นๆ ก่อนที่จะเข้าสู่ส่วนของห้องควบคุมอุณหภูมิ เมื่อสารตัวอย่างถูกฉีดเข้าไปในส่วนฉีดสารโดยใช้เข็มฉีดสารตัวอย่าง (Syringe) ฉีดตัวอย่างผ่านเสพทัม ซึ่งการนำสารตัวอย่างฉีดเข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เพื่อทำการวิเคราะห์มีวิธีที่แตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของสารตัวอย่างและชนิดของคอลัมน์ โดยทั่วไปส่วนฉีดสารจะมีเครื่องให้ความร้อน (Heater) ประกอบอยู่ด้วย เพื่อทำให้สารตัวอย่างระเหยกลายเป็นไอ โดยมีเสพทัมทำหน้าที่ในการป้องกันการรั่วของแก๊สพาและสารตัวอย่างออกจากระบบ นอกจากนี้ส่วนฉีดสารในปัจจุบันจะมีท่อแก้วกลวง (Liner) อยู่ภายในทำหน้าที่เป็นที่ผสมของแก๊สและไอสารให้เป็นเนื้อเดียวและป้องกันสิ่งสกปรก เช่น ดักเศษเสพทัมที่อาจหลุดออกมา ดักสิ่งเจือปนในสารตัวอย่างที่ไม่ระเหยเป็นไอ ไม่ให้เข้าสู่คอลัมน์ โดยท่อแก้วดังกล่าวมีการออกแบบให้มีรูปทรงต่างๆ ที่เหมาะสมกับรูปแบบในการฉีดสาร รูปแบบที่สำคัญของการฉีดสาร ได้แก่ ส่วนฉีดสารสำหรับการฉีดสารแบบเข้าหมด (Splitless Injection) และส่วนฉีดสารแบบแยกส่วน (Split Injection) (วีรวรรณ เล็กสกุลไชย, 2548)

2.8.2 การฉีดสารแบบเข้าหมด (Splitless Injection)

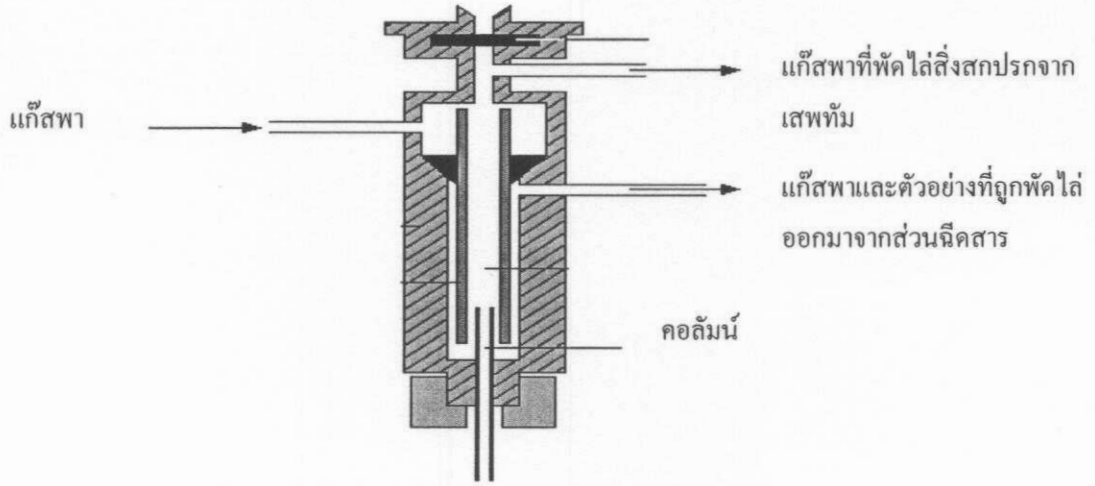
มีการปิดวาล์วในระหว่างการฉีดสาร ดังนั้นสารตัวอย่างจะกลายเป็นไอและถูกพาผ่านเข้าสู่คอลัมน์ทั้งหมดในเวลาที่กำหนดไว้ หลังจากเวลาที่กำหนดวาล์วจะเปิดออกแล้วแก๊สพาจะพาไอของสารที่เหลือออกไป การฉีดสารแบบนี้เหมาะกับสารที่มีความเข้มข้นต่ำมากๆ หรือสารที่ระเหยยากต้องใช้เวลาในการระเหยนาน แผนภาพของการฉีดสารแบบเข้าหมดแสดงดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 ส่วนฉีดสารที่มีรูปแบบการฉีดสารแบบเข้าหมด (Sheffield Hallam University, 2553)

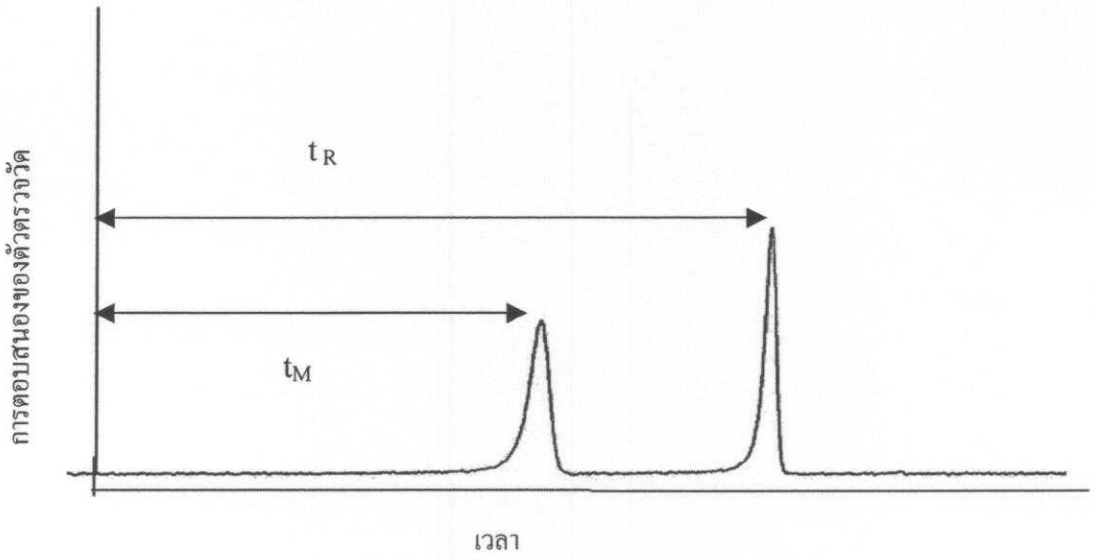
2.8.3 การฉีดสารแบบแยกส่วน (Split Injection)

สารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าสู่ส่วนฉีดสารที่มีอุณหภูมิสูงจะระเหยกลายเป็นไอได้อย่างรวดเร็ว โดยไอของสารส่วนใหญ่จะถูกพาทิ้งออกไป ในขณะที่ไอของสารอีกส่วนหนึ่งถูกพาผ่านเข้าสู่คอลัมน์ แผนภาพของการฉีดสารแบบเข้าหมดแสดง ดังภาพที่ 2.6 อัตราส่วนในการแยก (Split Ratio) สามารถปรับตั้งได้ เช่น 250 : 1 หมายความว่า ไอของสารจะถูกพาทิ้งออกไป 250 ส่วน เข้าสู่คอลัมน์เพียง 1 ส่วน การฉีดสารแบบนี้เหมาะกับสารที่มีความเข้มข้นสูง เพื่อป้องกันไม่ให้สารเข้าสู่คอลัมน์และหน่วยตรวจวัดมากเกินไป



ภาพที่ 2.6 ส่วนฉีดสารที่มีรูปแบบการฉีดแบบแยกส่วน (Sheffield Hallam University, 2553)

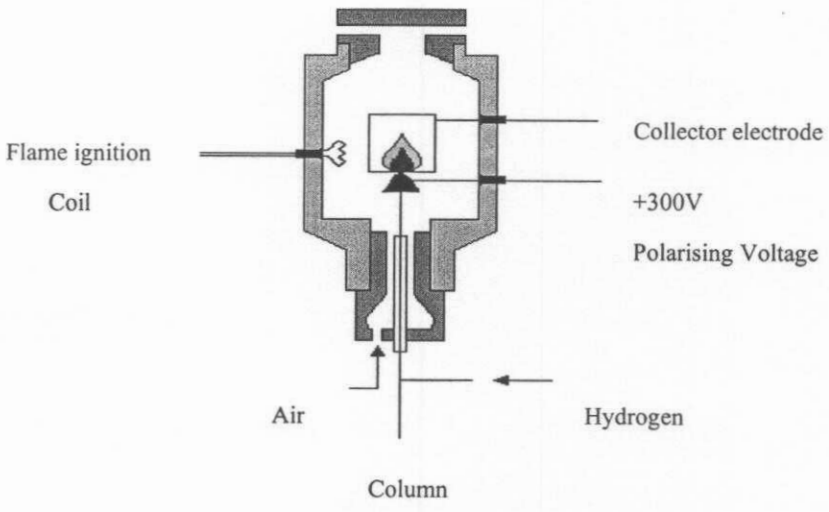
หลังจากนั้นสารตัวอย่างที่สามารถระเหยได้ในอุณหภูมิที่กำหนดของส่วนฉีดสาร จะถูกทำให้อยู่ในสภาวะที่เป็นแก๊สในช่องฉีดสารและถูกแก๊สพานำเข้าไปสู่คอลัมน์ โดยไอของสารที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์จะเกิดการแยกขึ้น เนื่องจากเวลาในการเคลื่อนที่บนคอลัมน์ของสารแต่ละตัวนั้นไม่เท่ากันดังที่กล่าวมา เมื่อสารออกจากคอลัมน์สารจะถูกพาเข้าสู่ตัวตรวจวัดและเกิดสัญญาณ เนื่องจากปฏิกิริยาของสารในตัวตรวจวัดและมีการบันทึกการตอบสนองของตัวตรวจวัดเทียบกับเวลา โดยกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการตอบสนองของตัวตรวจวัดที่เวลาต่างๆ เรียกว่า โครมาโทแกรม (Chromatogram) ดังภาพที่ 2.7 โดยสัญญาณดังกล่าวจะถูกส่งไปยังเครื่องประมวลผลและเก็บข้อมูล



ภาพที่ 2.7 โครมาโทแกรมทั่วไปที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี t_R คือ เวลารีเทนชัน t_M คือ เวลาที่แก๊สพาใช้ในการเคลื่อนที่ (มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร, 2553)

ผลที่ได้จากการแยกองค์ประกอบด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ที่เรียกว่าโครมาโท - แกรม มีลักษณะเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (t) ของการเคลื่อนที่ของสารบนแกน X และปริมาณของสัญญาณที่ได้จากตัวตรวจวัด ณ เวลาหนึ่งๆ บนแกน Y จากตัวอย่างโครมาโทแกรมที่แสดงในรูป 2.7 เวลารีเทนชัน (t_R) ของสาร A คือเวลาที่สาร A ใช้ในการเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นถึงจุดสุดท้ายบนวัฏภาคคงที่ของคอลัมน์ ส่วนเวลารีเทนชันของแก๊สพาหรือ t_M คือ เวลาที่แก๊สพาใช้ในการเคลื่อนที่ดังกล่าว ซึ่งปริมาณของสัญญาณที่ได้จากการตอบสนองของตัวตรวจวัด ณ เวลาหนึ่งๆ บนแกน Y จะมีค่ามากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับปริมาณหรือความเข้มข้นของสารที่ถูกตรวจวัด ณ เวลานั้นๆ จึงทำให้สามารถเทียบหาปริมาณหรือความเข้มข้นของสารใดๆ จากความสูงของสัญญาณบนแกน Y ของสารนั้นๆ ได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากการแพร่กระจายของกลุ่มโมเลกุลของสารชนิดหนึ่งๆ ในระหว่างการเดินทางผ่านไปตามวัฏภาคคงที่นั้นเกิดขึ้นเสมอ จึงทำให้เกิดช่วงระยะเวลาในขณะที่สารหนึ่งๆ เริ่มออกจากส่วนปลายของคอลัมน์เข้าสู่ตัวตรวจวัดจนโมเลกุลสุดท้ายของสารนั้นถูกตรวจวัด ดังนั้นเมื่อสารองค์ประกอบหนึ่งๆ ถูกบันทึกสัญญาณ ผลที่ได้บนโครมาโทแกรมจึงแสดงออกมาเป็นลักษณะพีค (Peak) การวิเคราะห์เชิงปริมาณของสาร จึงมักนิยมใช้ค่าพื้นที่ใต้พีค (Peak Area) ของสารนั้นแทนความสูงของสัญญาณบนแกน Y ในการระบุว่าแต่ละองค์ประกอบที่แยกได้จากเทคนิคโครมาโทกราฟีเป็นสารใดจะต้องมีสารมาตรฐานชนิดนั้นๆ มาเปรียบเทียบโดยอาศัยหลักการที่ว่าสารชนิดเดียวกันจะให้ค่าเวลารีเทนชันเท่ากันเสมอ ที่สภาวะการทดลองเดียวกัน

ดังนั้นการทราบค่าเวลารีเทนชันของสารประกอบแต่ละชนิด ก็สามารถนำมาบ่งชี้ชนิดของสารได้ แต่เนื่องจากบางครั้งพีคของสารบนโครมาโทแกรมนั้นมีขนาดกว้าง (Board) ซึ่งจะทำให้ความแม่นยำของค่าเวลารีเทนชันลดลง การทดลองนี้จึงได้ประยุกต์เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ในการวิเคราะห์ตัวอย่างเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ วิธีการวิเคราะห์หาเมทแอมเฟตามีน ได้เลือกใช้ตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน เนื่องจากเป็นตัวตรวจวัดที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์สารอินทรีย์ ตัวตรวจวัดแบบเฟลมไอออไนเซชันมีแก๊สไฮโดรเจนเป็นเชื้อเพลิงและอากาศที่ผ่านเข้ามาจะทำหน้าที่ช่วยการเผาไหม้ของแก๊สไฮโดรเจนและช่วยให้พาแก๊สที่เผาไหม้แล้วออกไปกับแก๊สพา โดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีสมัยใหม่ใช้การติดไฟด้วยไฟฟ้า เมื่อสารตัวอย่างที่ออกมาจากคอลัมน์เข้าสู่เปลวไฟจะทำให้สารเกิดไอออไนเซชันได้เป็นอิเล็กตรอนและไอออนบวก โดยไอออนบวกจะวิ่งไปยังอิเล็กโทรด (Collector - Electrode) ทำให้เกินสัญญาณขึ้น และจะถูกส่งไปยังอิเล็กโทรมิเตอร์และถูกบันทึกต่อไป ลักษณะของตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน แสดงดังรูป 2.8 ข้อปฏิบัติในการใช้ตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน นั้นควรตั้งอุณหภูมิของตัวตรวจวัดให้สูงกว่า 100 °C เพื่อป้องกันการกลั่นตัวของไอน้ำ โดยเฉพาะสารประกอบคลอรีนควรตั้งอุณหภูมิที่สูง เพราะผลการเผาไหม้จะทำให้เกิดการผุกร่อนได้ง่าย เป็นผลให้สภาพไวของตัวตรวจวัดเสียไป นอกจากนี้ถ้าใช้อุณหภูมิต่ำ สารบางตัวจะเกิดการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ทำให้เกิดเขม่าอุดตันเฟลมเจท (มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร, 2553)



ภาพที่ 2.8 ตัวตรวจวัดแบบเฟลมไอออไนเซชัน (Sheffield Hallam University, 2553)

2.9 ทฤษฎีพื้นฐานของเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

2.9.1 การคงอยู่หรือรีเทนชัน (Retention) การแยกจะประสบผลสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อ สารมีอัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์ ดังนั้นจากนิยามของสัมประสิทธิ์การกระจาย (Distribution Coefficient: K_d) คือ การวัดลำดับของสารใดๆ สมมติให้เป็นสาร X ที่ถูกยึดหรือทำให้เคลื่อนที่ให้ช้าลง ในทางปฏิบัติแล้วค่าปัจจัยความจุ (Capacity Factor: k') เป็นค่าที่เหมาะสมที่นำมาใช้มากกว่า และสามารถที่หาได้โดยตรงจากโครมาโทแกรม ซึ่งสมการของค่า k' เป็นดังนี้

$$k' = \frac{\text{จำนวนโมลทั้งหมดของสาร X ในวัฏภาคคงที่}}{\text{จำนวนโมลทั้งหมดของสาร X ในวัฏภาคเคลื่อนที่}}$$

$$k' = \frac{V_s [X]_s}{V_m [X]_m} = \frac{V_s}{V_m} K_d \qquad (2.4)$$

เมื่อ V_s = ปริมาตรของวัฏภาคคงที่ในคอลัมน์

V_m = ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ในคอลัมน

$[X]_s$ = ความเข้มข้นของสาร X ในวัฏภาคคงที่

$[X]_m$ = ความเข้มข้นของสาร X ในวัฏภาคเคลื่อนที่

K_d = ค่าคงที่ หรือ สัมประสิทธิ์การกระจายของสาร X

จากสมการพื้นฐานสำหรับกระบวนการโครมาโตกราฟีที่แสดงความสัมพันธ์ของค่าปริมาตรรีเทนชัน (Retention Volume: V_r) กับค่าอื่นๆ คือ

$$V_r = V_m (1 + k'_x) = V_m + V_s K_d \qquad (2.5)$$

ค่า V_r หาได้จากโครมาโทแกรมเนื่องจาก

$$V_r = Ft_R$$

โดย F = อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ (มิลลิลิตรต่อนาที)

V_m = ปริมาตรตาย (Dead Volume หรือ Void Volume) ซึ่งก็คือ ปริมาตรทั้งหมดของวัฏภาคเคลื่อนที่ในคอลัมน์ในช่วงเวลาที่กำหนดให้

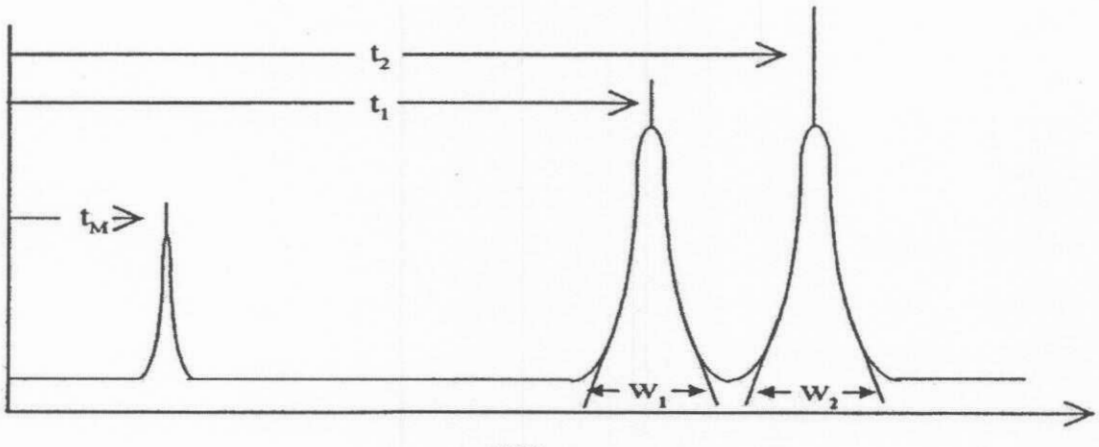
t_M = คือเวลาที่โมเลกุลของตัวทำละลายที่ถูกฉีดเข้าไปหรือสำหรับสารที่ไม่ถูกยึดเกาะขณะเดินทางผ่านไปในคอลัมน์

จากการแทนค่า V_m และ V_r ในสมการ 2.6 และเมื่อจัดสมการใหม่จะได้สมการที่สามารถหาค่า k' ได้

$$k' = (t_R - t_M) / t \qquad (2.6)$$

เนื่องจากประสิทธิภาพของคอลัมน์สามารถพิจารณาได้จากอัตราการขยายตัวของแถบ (Band) ให้กว้างขึ้น เมื่อแถบนี้หรือตัวถูกละลายนี้เคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์โมเลกุลทุกตัวจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกัน การกระจายตัวของโมเลกุลจะอยู่ในลักษณะเป็นรูปเกาส์เซียน จุดกึ่งกลางของแถบนั้นคือ ค่า k' ของสารแต่ละชนิด ซึ่งหมายถึงอัตราเร็วโดยเฉลี่ยของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลนั้น

2.9.2 การแยก (Resolution: R_s) นิยามของการแยกแถบ 2 แถบที่อยู่ใกล้กัน คือ ระยะห่างระหว่างแถบทั้งสองแถบหารด้วยความกว้างเฉลี่ยของแถบทั้งสอง ดังแสดงในรูป 2.9



ภาพที่ 2.9 การแยกในแก๊สโครมาโทกราฟี (พุทธรักษา วรานุศุภากุล, 2553)

นั่นคือ

$$R_s = \frac{(t_2 - t_1)}{1/2(W_1 + W_2)} \qquad (2.7)$$

เมื่อ t_1 และ t_2 คือ ค่าเวลารีเทนชันของแถบ 1 และแถบ 2

W_1 และ W_2 คือ ความกว้างของแถบ 1 และแถบ 2

ถ้า R_s เท่ากับ 1 หมายความว่า แถบทั้งสองแยกออกจากกันได้ประมาณร้อยละ 98 และอีกร้อยละ 2 นั้นเป็นส่วนที่แถบทั้งสองทับกัน โดยค่า R_s ยิ่งมีค่ามากเท่าใด แสดงว่าการแยกดีขึ้นเท่านั้น ในการแยกสารโดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี มีสาเหตุต่างๆ ที่ทำให้การแยกได้ผลไม่ดี เช่น ได้แถบการแยกที่กว้าง (Band Broadening) พีคไม่เป็นแบบเกาส์เซียน ทฤษฎีที่จะใช้อธิบายเกี่ยวกับระบบเหล่านี้ได้อย่างดีมีอยู่ 2 ทฤษฎี คือ ทฤษฎีเกี่ยวกับเพลต (Plate Theory) และทฤษฎีเกี่ยวกับอัตราความเร็ว (Rate Theory)

2.9.3 ทฤษฎีเกี่ยวกับเพลต (Plate Theory) (พุทธรักษา วรานุศุภากุล, 2553)

ทฤษฎีเกี่ยวกับเพลตได้เริ่มเสนอใช้เพื่ออธิบายการทำงานของการกลั่นแบบใช้คอลัมน์แต่ผู้ที่นำเอาทฤษฎีนี้มาใช้เกี่ยวกับโครมาโทกราฟีแบบพาร์ทิชัน (Partition Chromatography) คือ Martin และ Synge โดยแบบจำลองของเพลตทางทฤษฎี (Theoretical Plate Model) ได้มาจากทฤษฎีการกลั่น โดยตั้งสมมุติฐานว่า คอลัมน์ได้จากการนำเอาเพลต (Plates) มาประกอบกันเข้า แต่ละเพลตจะเกิดสมดุลของการกระจายตัว ถูกละลายระหว่างวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยค่าของ N ซึ่ง คือจำนวนของเพลตทางทฤษฎีนั้น ถ้ามีค่ามากประสิทธิภาพในการแยกก็จะดีตามไปด้วย ทฤษฎีนี้ได้สมมุติว่าคอลัมน์แบ่งแยกเป็นโซนๆ (zone) เรียกว่า เพลตทางทฤษฎี (Theoretical Plate) โดยความสูงของแต่ละโซน หรือที่เรียกว่าความสูงที่เทียบเท่ากับเพลตทางทฤษฎี (Height Equivalent to a Theoretical Plate: HETP: H) สามารถหาได้จากสมการ

$$H = HETP = L/N \qquad (2.8)$$

เมื่อ L = ความยาวของคอลัมน์

โดยคอลัมน์ที่มีค่า H ต่ำจะมีประสิทธิภาพดีกว่าคอลัมน์ที่มีค่า H สูง ทฤษฎีเกี่ยวกับเพลตถือว่าคอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพดีจะต้องมี N อยู่มาก ค่าของ N สามารถหาได้จากความสัมพันธ์

ระหว่างปริมาตรรีเทนชัน (Retention Volume: V_r) ของสารกับความกว้างของพีค (Peak Width: W) ดังนี้

$$N = 16 (V_r / W)^2 \quad (2.9)$$

เนื่องจากปริมาตรรีเทนชันได้จากผลคูณของเวลารีเทนชันกับอัตราการไหลของแก๊สพา ในทางปฏิบัติ เมื่อให้อัตราการไหลของแก๊สพาคงที่ สามารถคำนวณค่า N ได้จากสมการ

$$N = 16 (t_R / W)^2 \quad (2.10)$$

การใช้สมการ 2.10 สามารถใช้ค่าความกว้างของพีคที่ครึ่งหนึ่งของความสูงของพีค ($W_{1/2}$) ดังสมการต่อไปนี้

$$N = 5.54 (t_R / W_{1/2})^2 \quad (2.11)$$

เมื่อ t_R = เวลารีเทนชัน

W = ความกว้างของฐานพีค (หน่วยเดียวกันกับ t_R)

$W_{1/2}$ = ความกว้างของฐานพีคที่ครึ่งหนึ่งของความสูง

เมื่อคำนวณหาค่า N ได้และรู้ความยาวของคอลัมน์ก็สามารถคำนวณหาค่า H ได้โดยใช้สมการ 2.9 สำหรับทฤษฎีเกี่ยวกับเพลตแสดงให้เห็นว่า ถ้าอัตราการไหลของแก๊สพาเพิ่มขึ้น H จะมีค่าน้อยลงและถ้าหากทำการทดลอง โดยการปรับเปลี่ยนอัตราการไหลของแก๊สพา เพื่อแยกสารประกอบนั้นๆ ด้วยคอลัมน์เดียวกัน เมื่อนำผลมาเขียนกราฟระหว่างค่า H เทียบกับอัตราการไหลของแก๊สพา จะมีอัตราการไหลของแก๊สพาค่าหนึ่งที่จะทำให้ H มีค่าต่ำสุดเสมอ กล่าวคือคอลัมน์ใดๆ จะมีอัตราการไหลของแก๊สพาค่าหนึ่งที่ทำให้การแยกสารด้วยคอลัมน์นั้นๆ มีประสิทธิภาพสูงที่สุด

2.9.4 ทฤษฎีเกี่ยวกับอัตราความเร็ว (Rate Theory) (พุทธรักษา วรานุศุภากุล, 2553)

แม้ว่า HETP จะเป็นหลักการที่มีประโยชน์และให้ข้อมูลคร่าวๆ เกี่ยวกับกระบวนการแยกสารแต่ทฤษฎีเกี่ยวกับเพลตไม่สามารถอธิบายพฤติกรรมของโครมาโทกราฟีได้อย่างครบถ้วน จึงต้องใช้วิธีการที่แยบคายกว่า คือ ทฤษฎีเกี่ยวกับอัตราความเร็ว ซึ่งอธิบายพฤติกรรมของโครมาโทกราฟีได้ ทฤษฎีนี้ขึ้นอยู่กับตัวแปรต่างๆ เช่น อัตราการถ่ายเทของมวลระหว่างเฟสคงที่กับ

เฟสเคลื่อนที่ อัตราการแพร่กระจายของตัวถูกละลายในคอลัมน์ อัตราการไหลของแก๊สพาและไฮโดรไดนามิก (Hydrodynamics) ของเฟสเคลื่อนที่ GluecKauf ได้ศึกษาสาเหตุที่มีผลต่อกระบวนการโครมาโทกราฟี 4 ปัจจัยด้วยกัน คือ

2.9.4.1 การแพร่กระจาย (Diffusion) ในวัฏภาคเคลื่อนที่จากปกติไปในทิศทางการไหล

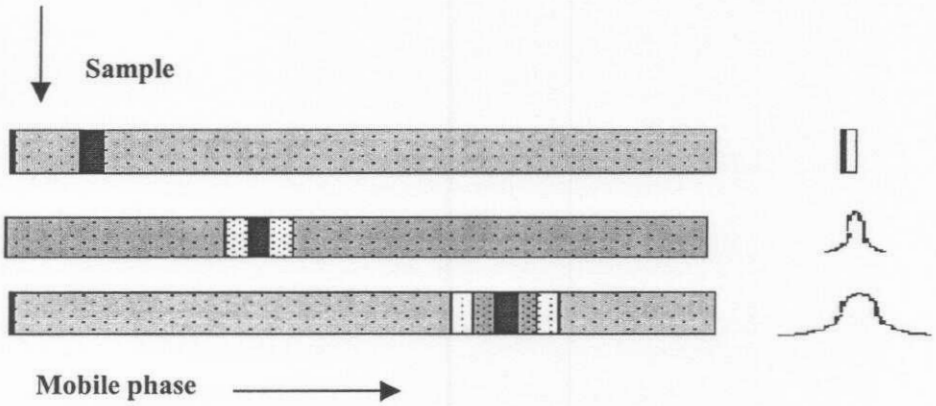
2.9.4.2 การแพร่กระจายในลักษณะตามยาว (Longitudinal Diffusion) ในเฟสเคลื่อนที่

2.9.4.3 การแพร่กระจายเข้าไปในอนุภาค

2.9.4.4 ขนาดของอนุภาคโครมาโทแกรมที่ได้จากการแยกสารผสม

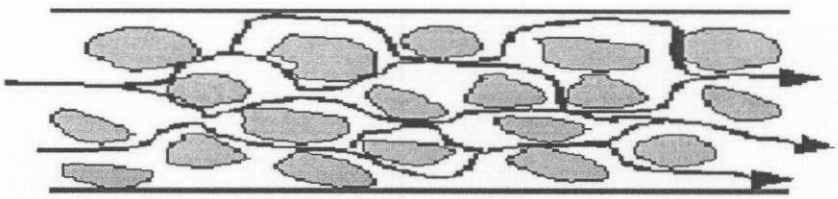
สามารถชี้ให้เห็นได้ว่าการแยกสารนั้นดีหรือไม่และอธิบายได้จากเหตุผล 2 ประการ คือ จุดศูนย์กลางของตัวถูกละลายแต่ละโซนแยกออกจากกันดีหรือไม่ และแต่ละโซนที่แยกได้อยู่ใกล้กันเพียงใด โดยการที่แต่ละโซนจะแยกออกจากกันได้มากน้อยเพียงใดนั้น ย่อมขึ้นอยู่กับตัวแปร 3 อย่างได้แก่

การแพร่กระจายแบบธรรมดา (Ordinary Diffusion) กระบวนการนี้เป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างระหว่างบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงกับบริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นจะเกิดการเคลื่อนที่ของสาร (diffusion) จากบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นต่ำในทิศทางตามคอลัมน์ การแพร่กระจายแบบนี้เกิดขึ้นในระดับโมเลกุลหลังจากที่โมเลกุลได้มีการชนกันแล้ว



ภาพที่ 2.10 การแพร่กระจายแบบธรรมดา (พุทธรักษา วรานุศุภากุล, 2553)

การแพร่กระจายแบบเอ็ดดี (Eddy Diffusion) ถ้าหากคอลัมน์มีการบรรจุด้วยอนุภาคที่มีขนาดเท่ากันตามคอลัมน์จะมีช่องว่าง (Void Space) ระหว่างอนุภาคตลอดคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ เมื่อขนาดของอนุภาคเล็กลงทำให้ยากต่อการควบคุมขนาดของอนุภาคให้เท่ากันตลอดและยากต่อการป้องกันไม่ให้อนุภาคแตกได้ ดังนั้นช่องว่างที่เกิดขึ้นในคอลัมน์จะไม่สม่ำเสมอ เมื่อสารตัวอย่างเคลื่อนที่เข้าไปในคอลัมน์ บางโมเลกุลของสารเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าและได้ระยะทางมากกว่า บางโมเลกุลอาจเคลื่อนที่ไปได้ช้าและได้ระยะทางน้อยกว่าเมื่อเทียบกับจุดศูนย์กลางของโซน เพราะฉะนั้นกระบวนการแพร่กระจายแบบเอ็ดดี เป็นผลมาจากการไหลของสารในคอลัมน์ที่มีช่องว่างไม่สม่ำเสมอและมีขนาดอนุภาคต่างกัน



ภาพที่ 2.11 การแพร่กระจายแบบเอ็ดดี (พุทธรักษา วรานุศุภากุล, 2553)

การสมดุลเฉพาะแห่ง (Local Equlibrium) เมื่อบริเวณของโมเลกุลของตัวถูกละลายเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์จะมีความเข้มข้นของส่วนที่เคลื่อนที่มาก่อน ส่วนกลางและส่วนที่เป็นเทลลิ่ง (tailing) แตกต่างกัน สาเหตุนี้เนื่องมาจากอัตราการเกิดสมดุลตลอดคอลัมน์นั้นแตกต่างกัน ฉะนั้นในแต่ละส่วนของคอลัมน์หรือเพลตทฤษฎีจะพยายามทำให้เกิดสมดุลด้วยการเปลี่ยนความเข้มข้นต่างๆ กันของโซนในวัฏภาคเคลื่อนที่ เช่น บางเวลาความเข้มข้นเพิ่มขึ้นและบางเวลาความเข้มข้นลดลง ดัง

นั้นกระบวนการทั้งหมดจะเกิดความไม่สมดุลขึ้นในแต่ละเพลตทางทฤษฎีและอาจสรุปได้ว่าถ้าให้อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น จะเป็นการเพิ่มให้ความไม่สมดุลเกิดมากขึ้นด้วย

จากกระบวนการทั้งสามที่กล่าวมานี้ล้วนเป็นการแพร่กระจายแบบสุ่ม (Random Diffu sion) ทั้งสิ้น ซึ่งกระบวนการทั้งหมดเหล่านี้ก็ยังไม่สามารถอธิบายพฤติกรรมบางอย่างของโครมาโทกราฟีได้ ดังนั้น Van Deemter จึงได้สร้างสมการ Van Deemter (Van Deemter equation) ขึ้นเพื่อใช้อธิบายกระบวนการของแก๊สโครมาโทกราฟี ซึ่งได้เพิ่มเติมขึ้นจากทฤษฎีของ Gluec Kauf สมการนี้ได้สร้างขึ้นจากการพิจารณาถึงอุปสรรคต่อการถ่ายเทมวล (Resistance to Mass Transfer Term) ระหว่างทั้งสองอันเนื่องมาจากการแพร่กระจาย

สมการ Van Deemter (Van Deemter Equation)

$$H = A + B/\bar{u} + C\bar{u} \qquad (2.12)$$

เมื่อ

H	=	HETP, เซนติเมตร
A	=	เทอมของการแพร่กระจายแบบเอ็ดดี (Eddy diffusion term), เซนติเมตร
B	=	เทอมของการแพร่กระจายแบบธรรมดา (molecular diffusion term), วินาทีต่อตารางเซนติเมตร
$\bar{u}$	=	อัตราเร็วเชิงเส้นของแก๊สพา, เซนติเมตรต่อวินาที
C	=	อุปสรรคของการถ่ายเทมวล (resistance to mass transfer term), วินาทีต่อตารางเซนติเมตร

จากสมการ Van Deemter สามารถหาค่า H ได้ (ทราบขนาดความยาวคอลัมน์และค่า N แล้ว) โดยค่า H จะเป็นฟังก์ชันของค่า $\bar{u}$ ดังนั้นเมื่อทำการทดลองหาค่า $\bar{u}$ ที่เหมาะสมทำให้ค่า H มีค่าน้อยที่สุดซึ่งทำให้ N สูงที่สุด

ในปัจจุบันการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีส่วนใหญ่จะใช้คอลัมน์แบบปลายเปิด (Open Tubular Column) แทนคอลัมน์แพค (Packed Column) เนื่องจากมีการใช้วัสดุที่เรียกว่าฟิวส์ซิลิกา ซึ่งเป็นท่อแก้วกลวงที่เคลือบด้วยลิควิดเฟส (Wall Coated Open Tubular: WCOT) ซึ่งมีความยืดหยุ่น เสถียรและง่ายต่อการใช้งาน เมื่อเทียบกับคอลัมน์แบบแก้วหรือสแตนเลส Golay

ได้เสนอทฤษฎีที่อธิบายประสิทธิภาพของคอลัมน์แบบ WCOT โดยประยุกต์ทฤษฎี HETP เข้ากับสมการ Van Deemter โดยสมการ Van Deemter ประยุกต์ใช้กับคอลัมน์แบบแพค ในขณะที่สมการ Golay ซึ่งปรับปรุงขึ้นจากสมการ Van Deemter ประยุกต์ใช้กับคอลัมน์แบบ WCOT หรือแบบแคพิลารีได้ดีกว่าเทอม A ในสมการ Van Deemter อธิบายการแพร่กระจายแบบเอ็ดดีของแก๊สผ่านอนุภาคที่ใช้บรรจุ (Packing Material) ซึ่งจะไม่เกิดขึ้นในคอลัมน์แบบ WCOT ดังนั้นสมการของ Golay จึงไม่มีเทอม A อยู่ โดยมีการปรับปรุงเทอมของการถ่ายเทมวลเพื่อให้มีความเหมาะสมกับคอลัมน์แบบ WCOT

สมการ Golay (Golay Equation)

$$H = B/\bar{u} + C_m\bar{u} + C_L\bar{u} \qquad (2.13)$$

เมื่อ

C_m = อุปสรรคของการถ่ายเทมวลในเฟสเคลื่อนที่ (resistance to mass transfer in the mobile phase, วินาทีต่อตารางเซนติเมตร

C_L = อุปสรรคของการถ่ายเทมวลในเฟสคงที่ (resistance to mass transfer in the stationary phase, วินาทีต่อตารางเซนติเมตร

สมการ Golay สามารถแจกแจงได้ดังนี้

$$H = \frac{2D_M}{\bar{u}} + \frac{\left(1+6k'^2\right)r_c^{\,2}\bar{u}}{24\left(1+k'\right)^2} + \frac{2k'd_f\bar{u}}{3\left(1+k'\right)^2 D_s} \qquad (2.14)$$

เมื่อ

D_M = ค่าการแพร่กระจายของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่, ตารางเซนติเมตรต่อวินาที

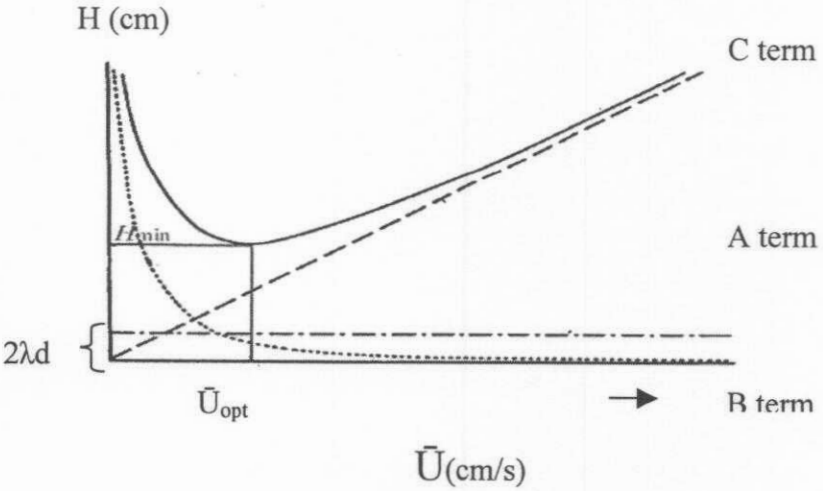
D_S = ค่าการแพร่กระจายของตัวถูกละลายในเฟสคงที่, ตารางเซนติเมตรต่อวินาที

k' = ปัจจัยความจุ (Capacity Factor)

r_C = รัศมีของคอลัมน์, เซนติเมตร

d_f = ความหนาของลิควิดเฟส, เซนติเมตร

สมการ Golay แสดงให้เห็นว่าค่าของ H ขึ้นอยู่กับตัวแปรต่างๆ รวมทั้งรัศมีของคอลัมน์และความหนาของลิคควิดเฟสที่เคลือบอยู่ภายในคอลัมน์ โดยถ้าหากตัวแปรทั้งสองมีค่าลดลงจะทำให้ H มีค่าลดลงด้วย ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพการแยกเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ค่าความเร็วเชิงเส้นของแก๊สพาก็เป็นตัวแปรสำคัญที่สามารถทำให้ค่า H ลดลงได้ เมื่อสร้างกราฟที่แสดงความพันธ์ระหว่างค่า H และ $\bar{u}$ จะมีค่า $\bar{u}$ ค่าหนึ่งที่ให้ค่า H มีค่าต่ำสุดเสมอ ค่าความเร็วเชิงเส้นของแก๊สพา ดังกล่าวเรียกว่า $\bar{u}$ opt ดังกราฟรูป 2.14 โดยสมการ Van Deemter และสมการ Golay จะได้ความสัมพันธ์เป็นแบบไฮเพอร์โบลาโดยค่าของ H จะมีค่าต่ำที่สุด $(B/C)_{1/2}$ นอกจากนี้ค่าของเทอม B และเทอม C สามารถหาได้จากกราฟเช่นเดียวกัน โดยในสภาวะที่แก๊สพามีอัตราเร็วเชิงเส้นต่ำ เทอม B จะมีอิทธิพลต่อค่า H มากกว่าเทอม C และในทางตรงกันข้าม ถ้าหากแก๊สพามีอัตราเร็วเชิงเส้นสูงเทอม C จะมีอิทธิพลต่อค่า H โดยในทางปฏิบัติจะใช้อัตราเร็วเชิงเส้นของแก๊สพาที่สูงกว่า ค่า $\bar{u}_{opt}$ เล็กน้อย เนื่องจากประสิทธิภาพการแยกของคอลัมน์ที่ได้รับยังอยู่ในเกณฑ์ที่ดีอยู่ในขณะที่เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์จะสั้นลง



ภาพที่ 2.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า H กับ $\bar{u}$ (พุทธรักษา วรานุศุภากุล, 2553)

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นพาภรณ์ ปัญจะ (2539) ได้พัฒนาการตรวจยืนยันยาบ้าในปัสสาวะด้วยวิธี TLC โดยนำน้ำยาสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของยาบ้ากับสาร Tetrabromo Phenolpthalein ethyl ester (TBPE) จากปฏิกิริยาการตรวจขั้นต้น ด้วยชุดน้ำยาตรวจยาบ้าในปัสสาวะ ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มาแยกหาชนิดว่าเป็นสารประกอบเชิงซ้อนจากเมทแอมเฟตามีนหรืออีเฟดรีน พบว่าให้ผลชัดเจนสามารถปฏิบัติได้รวดเร็วและเชื่อถือได้

ปกรณ์ น้อยประเสริฐ และชานิดา จุ้ยเจริญ (2543) ได้ทำการศึกษาตัวอย่างปัสสาวะของนักเรียน ผู้ต้องหา ผู้ป่วยและผู้ถูกควบคุมประพฤติ จำนวน 373 ตัวอย่าง โดยตรวจเปรียบเทียบ 4 วิธี ได้แก่ แก๊สโครมาโทกราฟี, TLC, Immunoassay (ใช้ชุดทดสอบ Surestrep) และ Color test พบว่าการตรวจยาบ้าในปัสสาวะเบื้องต้น ต้องใช้อย่างน้อย 2 วิธี คือ Immunoassay และ Color test และตรวจยืนยันผลด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีและ TLC

ชญานิศ ศรชัยธวัชวงศ์ (2001) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์แอมเฟตามีน เมทแอมเฟตามีนและอีเฟดรีนในปัสสาวะ ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายโดยการเตรียมตัวอย่าง ด้วยการสกัดแบบไอออนแพร์และวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรเมตรี แบบอิเล็คตรอนอิมแพคท์ไอออไนเซชันและซีเล็กเต็ด ไอออน มอนิเตอริ่ง 3', 3", 5', 5" - เตตระโบรโมฟีนอล์ฟทาลีนเอทิลเอสเทอร์ เป็นสารมีสีที่มีโปรตอนเดี่ยว เมื่อทำปฏิกิริยากับยากลุ่มแอมเฟตามีนในตัวกลางของเหลวที่มี ค่าพีเอช 9.2 - 9.5 จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีม่วงแดง ซึ่งละลายในไดคลอโรมีเทน นำสารสกัดได คลอโรมีเทนที่ได้ไปสกัดกลับแล้ว จึงนำไประเหยแห้งและเตรียมเป็นอนุพันธ์ โดยใช้เพนตะฟลูออโรโพรพิโอนิกแอนไฮไดรด์ นำตัวอย่างที่เตรียมเป็นอนุพันธ์ไประเหยแห้งแล้ว ละลายในเอทิลอะซิเตทและฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วง 50 - 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (แอมเฟตามีน และเมทแอมเฟตามีน) และ 100 - 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (อีเฟดรีน) ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of Detection : LOD) คือ 16.45 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (แอมเฟตามีน) 15.46 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (เมทแอมเฟตามีน) และ 22.21 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (อีเฟดรีน) และความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ไม่มากกว่า 10 % สำหรับแต่ละตัวยาได้นำวิธีวิเคราะห์นี้มาวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่าปัสสาวะ 4 ตัวอย่าง ให้ผลบวกจากการตรวจยืนยันผล คือ มีปริมาณเมทแอมเฟตามีนมากกว่า 500 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและแอมเฟตามีนมากกว่า 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

Manami, N. and et al., (2004) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาแอมเฟตามีนในปัสสาวะโดยใช้ on column และแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทเมทรี (GC - MS) ทำการสกัดตัวอย่างปัสสาวะด้วย pre - packed จาก Extrelut และโซเดียมคาร์บอเนต โดยแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนจะดูด

ซับอยู่บริเวณผิวของ Extrelut ใช้ propylchloroformate ในคอลัมน์ทำให้แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน อยู่ในรูปของ free baseใช้ d_5 - MA เป็นinternal standard พบว่าได้ % Recovery สำหรับแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนเท่ากับ 100 และ102 ตาม

ศิริพร ทองประกายแสง (2548) ได้ศึกษาและพัฒนาวิธีแก๊สโครมาโทกราฟฟีโดยอาศัยตัวตรวจวัดชนิดไนโตรเจนและฟอสฟอรัส (GC - NPD) และเตรียมตัวอย่างโดยสกัดด้วยตัวทำละลายในสภาวะด่างและหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารแอมเฟตามีน เมทแอมเฟตามีน เอ็มดีเอ็มเอ เอ็มดีเอ และ เอ็มดีอี ผลการศึกษาได้สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ดังนี้ คอลัมน์สำหรับแยกสารใช้ชนิด HP - 5 (5% - Phenyl - methylpolysiloxane) 0.25 mm.id. x 30 m x 0.25 μm film thickness ใช้แก๊สฮีเลียมด้วยอัตราเร็วเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โปรแกรมอุณหภูมิสำหรับแยกสาร คือ อุณหภูมิเริ่มต้น 120 องศาเซลเซียส รอจนกระทั่ง 4 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 200 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเพิ่ม 20 องศาเซลเซียสต่อนาที คงไว้ 6 นาที และอุณหภูมิของหัวฉีดและตัวตรวจวัดชนิดไนโตรเจนฟอสฟอรัสเป็น 220 องศาเซลเซียส และ 280 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ปริมาตรที่ฉีดเท่ากับ 1 ไมโครลิตร วิธีที่พัฒนาขึ้นมามีขั้นตอนที่ง่าย รวดเร็วและสามารถตรวจวัดสารแอมเฟตามีน เมทแอมเฟตามีน เอ็มดีเอ็มเอ เอ็มดีเอและเอ็มดีอี ได้ในคราวเดียวกันที่ระดับความเข้มข้นในปัสสาวะได้ต่ำถึง 90, 140, 120, 120 และ 150 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีในการตรวจพิสูจน์เพื่อยืนยันยาบ้าและยาอีในปัสสาวะ ในห้องปฏิบัติการตรวจสารเสพติดต่อไป

วีรวรรณ เล็กสกุลไชย (2548) ได้ทำการทดลอง โดยเปลี่ยนด่างที่ใช้ในการสกัดแยกเมทแอมเฟตามีนออกจากปัสสาวะ จากโซเดียมบอเรตเป็นด่างแก่โซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าสามารถสกัดเมทแอมเฟตามีนและยาอีชนิดเอ็มดีเอได้เพิ่มมากขึ้น

Ming,R.F., Ti,Y.W. (2006) ได้ทำการวิเคราะห์หาเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยเทคนิคการสกัดแบบ SPE และตรวจวิเคราะห์ด้วยไอออนแพร์ลิควิดโครมาโทกราฟี แมสสเปคโทรเมทรี electrospray tandem mass spectrometry (LC - ES - MS/MS) คอลัมน์เป็นชนิด reversed phase C_{18} ใช้กรดไตรฟูออโรอะซีติก เป็นเฟสเคลื่อนที่ d_8 - MA และ d_8 - AP เป็น internal standard พบว่าได้ค่า % Recovery เป็น 97 - 102.1 ตามลำดับ

Yi, H. and Youn - Jung, K. (2009) ได้ทำการวิเคราะห์หาเมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีนในปัสสาวะ ด้วยเทคนิค LLME ร่วมกับ ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) - UV detection ทำการสกัดตัวอย่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วสกัดกลับด้วยกรด พบว่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด เท่ากับ 0.5 μg/L และร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative Standard Deviation; RSD) น้อยกว่า 5

Takeshi, S. and et al., (2007) ได้วิเคราะห์หา อีเฟดรีน, แอมเฟตามีนและโคดีอีน ในปัสสาวะด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปคโทเมทรี ทำการสกัดตัวอย่างด้วยเทคนิค LLE ทำให้เป็นอนุพันธ์ด้วย pentafluoropropionic anhydride และ pentafluoropropanol พบว่าได้ค่า % Recovery เฉลี่ยที่ 65.8

Hiroyuki, I. and et al., (2008) ได้ทำการวิเคราะห์หาเมทแอมเฟตามีน และ dimethyl sulfone (DMS) ตัวอย่างอยู่ในรูปของ crytal ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน เตรียมตัวอย่างละลายในน้ำกลั่น 2 mg/L แล้วเติมสารละลาย 80 % โพแทสเซียมคาร์บอเนตแล้วทำการสกัดตัวอย่าง ด้วยไดคลอโรมีเทน : 2 - โพพานอล (3 : 1 v/v) ใช้ diphenylmethane เป็น internal standard คอลัมน์ชนิด narrow bore capillary พบว่าการแยกสารสมบูรณ์และมีความรวดเร็วใช้เวลาเพียง 1.3 นาที

นพรัตน์ รัตนวราภรณ์ (2552) ได้ทำการตรวจหาปริมาณเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างของกลางนั้น โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ซึ่งวิธีของสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างที่ต้องใช้คลอโรฟอร์มในการสกัดสารตัวอย่าง พัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้ diphenhydramine HCl เป็น internal standard ไม่ต้องสกัดสารตัวอย่างด้วยคลอโรฟอร์ม ซึ่งเป็นตัวทำลายที่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้ใช้ โดยได้ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธี ทดสอบความแม่นของวิธี ทดสอบการทำซ้ำได้ของวิธี ทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการตรวจพบเชิงปริมาณและคำนวณหาค่าความไม่แน่นอนของวิธี ในการทดสอบความถูกต้องของวิธี (Method validation) ทดสอบความเป็นเส้นตรงสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ peak area ratio ของสารมาตรฐาน พบว่ามีลักษณะเป็นเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9998 วิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจง โดยไม่มีการรบกวนจากสารอื่น ทดสอบความแม่นของวิธีค่า % Recovery อยู่ในช่วง 102.48 - 104.01 และทดสอบการทำซ้ำได้ของวิธีมีค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (%RSD) น้อยกว่า 2 % และคำนวณค่า Horrat Horwit's ratio มีค่าน้อยกว่าเท่ากับ 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of Detection: LOD) มีค่าเท่ากับ 0.015 mg/mL และขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation: LOQ) มีค่าเท่ากับ 0.05 mg/mL นอกจากนี้ยังได้คำนวณความไม่แน่นอนของวิธี

Adriaan, A.s., Marais, J. and Laurens, B. (2009) ได้ทำการตรวจยืนยันผลแอมเฟตามีนในปัสสาวะ โดยทำการตรวจเบื้องต้นด้วยวิธี immunoassay และทำการตรวจยืนยันผลด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปคโทเมทรี พบว่าทำให้เป็นอนุพันธ์ด้วย extractive acylation จาก pentafluropropionic anhydride ชนิดคอลัมน์เป็น microbore capillary การแยกใช้เวลาน้อยกว่า 3 นาที และเวลาทั้งหมดที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ 6 นาทีต่อ 1 ตัวอย่าง

ประคอง นางาม และนภสพง ช่างสนิท (2544) ได้พัฒนาวิธีการตรวจยืนยันผลเมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีนในปัสสาวะ โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี 2 สภาวะ สภาวะที่ 1 ใช้ คอลัมน์ Ultra 1 (Crosslinked Methy Silicone Gum 25.0 m. x 0.32 mn x 0.52 μm) (HP Part No. 19091 A - 112) ตัวตรวจวัดชนิดไนโตรเจนฟอสฟอรัส สภาวะที่ 2 ใช้คอลัมน์ HP - 5 (Crosslinked 5% PHME Siloxane 30.0 m x 0.32 mm x 0.25 μm Film Thickness) (HP Part No. 19091 J - 413) ตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน โดยการสกัดเมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีนที่อยู่ในปัสสาวะด้วยบิวทิลอะซีเตทในสภาวะ pH มากกว่า 9 แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี จากการทำทดสอบความถูกต้องของวิธีพบว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสารทั้งสองชนิดในทั้ง 2 สภาวะมีค่าใกล้ 1.000 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในสภาวะที่ 1 ของเมทแอมเฟตามีนให้ค่าประสิทธิภาพของวิธีและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานอยู่ในช่วง 92.26 ± 1.57 - 92.32 ± 0.47 และแอมเฟตามีน 94.15 ± 2.16 - 102.40 ± 2.29 และผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในสภาวะที่ 2 ของเมทแอมเฟตามีนให้ค่าประสิทธิภาพของวิธีและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานอยู่ในช่วง 95.6 ± 0 3.5 - 100.98 ± 1.24 และแอมเฟตามีน 103.32 ± 3.71 - 115.81 ± 3.44 โดยทดสอบความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนในช่วง 1.60 - 2.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอมเฟตามีนในช่วง 1.96 - 2.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบความแม่นยำของสารทั้งสองในสภาวะที่ 1 ให้ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนร้อยละ 0.5 และ 2.24 ในสภาวะที่ 2 1.22 และ 2.97 ตามลำดับ ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ของสารทั้งสองในปัสสาวะในสภาวะที่ 1 มีค่าเท่ากับ 0.07 และ 0.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาวะที่ 2 มีค่าเท่ากับ 0.06 และ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการตรวจยืนยันผลเมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีนในปัสสาวะโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีระบบอัตโนมัติ สามารถทำงานได้ตลอด 24 ชั่วโมงและให้ผลที่ถูกต้อง แม่นยำ เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีตัวอย่างปริมาณมาก แต่มีบุคลากรจำนวนจำกัด

เกษศิรินทร์พร กูลเกื้อ และวีระชัย สมัย (2009) ได้ตรวจวัดเมทแอมเฟตามีนในพลาสมาโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี เฟลมไอออไนเซชัน และทำการสกัดเมทแอมเฟตามีนด้วยเมทานอลเป็นวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว และประหยัด ระบบการตรวจวัดใช้คอลัมน์ชนิด HP - 5 (5 % diphenyl silicone) ขนาด 30 m X 0.25 mm X 0.25 μm การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ โดยการเติมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนลงในพลาสมา ผลการทดลองพบว่า เมทแอมเฟตามีนมีค่าเวลารีเทนชันเท่ากับ 3.360 นาที กราฟมาตรฐานในช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 0.10 - 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9999 ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด มีค่า 0.0123 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และขีดจำกัดต่ำสุดของการหาปริมาณมีค่า 0.0409 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละการได้คืนกลับ (%Recovery) ของเมทแอมเฟตามีนในพลาสมาที่

ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 2.5, 10, 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าอยู่ในช่วง 80.65 - 108.95 % ค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intraday) และระหว่างวัน (interday) แสดงในรูปร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ มีค่าในช่วง 1.66 - 8.95 % และ 3.91 - 8.68 % ตามลำดับ

พัฒนศักดิ์ เพิ่มพูน วรศักดิ์ อินทร์ชัย และศศิธร สุกรีฑา (2550) การทดสอบความถูกต้องของเทคนิค SPME - GC ในการตรวจเอกลักษณ์สารเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะโดยใช้ SPME Fiber Assembly 100 mm polydimethylsiloxane coating ในการดูดซับสารจากบริเวณที่ว่างเหนือตัวอย่างและปล่อยสารเข้าสู่กระบวนการของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีใช้คอลัมน์ Ultra 2 (Crosslinked 5 % PHME Siloxane) ตรวจวัดด้วยไนโตรเจนฟอสฟอรัสการทดสอบความจำเพาะของวิธีสามารถแยกสารเมทแอมเฟตามีน, แอมเฟตามีน, 3,4 - เมทิลลีนไดออกซีเมทแอมเฟตามีนเฟนฟลูรามีน, เฟนเทอร์มีน, ซูโดอีเฟดรีนและคีตามีน มีขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดหาเมทแอมเฟตามีนเท่ากับ 50 นาโนกรัม การนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์สารเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะของห้องปฏิบัติการ โดยการตรวจสอบเบื้องต้นโดยชุดทดสอบสีและชุดทดสอบหลักการภูมิคุ้มกันวิทยา ในการคัดกรองตัวอย่างที่ให้ผลบวก ตรวจยืนยันเปรียบเทียบวิธีเดิม TLC สอดคล้องกับผลของการตรวจด้วยเทคนิค SPME - GC วิธีนี้จึงเหมาะสมกับการตรวจวัดหาสารเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ

พงษ์รักษ์ ศรีบัณฑิตมงคล (2543) ได้ศึกษาผลการปรับความเป็นกรดด่างของปัสสาวะหรือการเติมสารต่างๆ ที่หาได้ทั่วไปต่อการตรวจหาเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วย วิธี color test, Enzyme Multiplied Immunoassay Technique (EMIT) และ TLC ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้อยู่ในประเทศไทย โดยใช้ปัสสาวะของผู้ที่เสพยาบ้าเป็นตัวอย่างควบคุม จากการศึกษาพบว่า การปรับความเป็นกรดด่างของปัสสาวะในช่วง pH 3 - 11 นั้นไม่มีผลต่อการตรวจหาเมทแอมเฟตามีน ด้วยวิธี color test, EMIT และ TLC การเติมสารแปลกปลอมต่างๆ ที่ศึกษาในการทดลองนี้ส่วนใหญ่ไม่มีผลต่อการตรวจหาเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ สารแปลกปลอมบางตัวเมื่อเติมลงในปัสสาวะ แล้ว ลักษณะทั่วไปของปัสสาวะจะเปลี่ยนไปอย่างเห็นได้ชัด สารซึ่งเติมลงไปในปัสสาวะแล้วมีผลต่อการตรวจหาเมทแอมเฟตามีน คือ น้ำมันเบรก น้ำยาล้างจาน น้ำยาซักผ้าขาว ผงฟอกขาวและสารส้มโดยมีผลต่อการตรวจหาเมทแอมเฟตามีน ด้วยวิธี color test, และ EMIT แต่ยังคงให้ผลบวกต่อการตรวจยืนยันหาเมทแอมเฟตามีนด้วยวิธี TLC ยกเว้นปัสสาวะที่เติมผงซักฟอกที่ให้ผลลบต่อการตรวจด้วยวิธี TLC เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงปัญหาที่อาจเกิดจากสารแปลกปลอม การเก็บปัสสาวะเพื่อนำมาตรวจจึงควรเก็บภายใต้การดูแลของผู้เก็บตัวอย่างอย่างใกล้ชิด

Lillsunde, P. and Korte, T. (1997) ได้พัฒนาวิธีการสกัดยาในปัสสาวะ โดยการสร้างหลอดสกัดซึ่งเรียกว่า “Chem elut” นำมาใช้แยกยาแต่ละประเภทแต่ละชนิดออกจากปัสสาวะ โดยใช้เทคนิค SPE ตัวอย่างที่ได้จะถูกนำไปทดสอบเบื้องต้นด้วยทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีและนำไปตรวจ

ยืนยันผลด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปคโตเมทรี ระบบนี้มีประโยชน์ในการตรวจหาเอกลักษณ์ของยาแต่ละชนิดได้ง่ายและมีสภาพไว (sensitivity) ดี ซึ่งสามารถตรวจยาต่างๆ ได้หลากหลายและครอบคลุมสารได้เกือบ 300 ชนิด โดยนำมาประยุกต์ใช้ในงานประจำ

องค์การสหประชาชาติ (1995) ได้จัดทำการวิเคราะห์แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนด้วยเทคนิคต่างๆ เช่นสกัดด้วยเฟสของเหลว โดยนำตัวอย่างปัสสาวะมา 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 2 - Methyl phenlyl ethylamine เข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.25 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 2 มิลลิลิตร น้ำกลั่น จำนวน 5 มิลลิลิตร และเติมไดคลอโรมีเทน จำนวน 20 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเบาๆ นาน 5 นาที ไขส่วนบนทิ้งไป นำไปสกัดต่อด้วยกรดซัลฟูริก เข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 2 มิลลิลิตร นำไปเขย่าและปั่นให้แยกชั้น นำส่วนบนมาจำนวน 15 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 1 มิลลิลิตร และเติมไดคลอโรมีเทน จำนวน 2.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าและปั่นให้แยกชั้นนำชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์เติมด้วยสารละลายผสมเมทานอล : กรดไฮโดรคลอริก (9 : 1 v/v) จำนวน 50 ไมโครลิตร นำไประเหยแห้งแล้ววิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี เฟลมไอออไนเซชันและแก๊สโครมาโทกราฟี ไนโตรเจนฟอสฟอรัส คาปิลลารีคอลัมน์ที่ใช้เป็นชนิดเฟสอยู่นิ่งไม่มีขั้ว อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม ที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของส่วนฉีดสารที่ 250 - 280 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของตัวตรวจวัด 250 - 280 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของตู้อบที่ช่วง 90 - 280 องศาเซลเซียส ซึ่งจะใช้เป็นโปรแกรมอุณหภูมิและขึ้นอยู่กับชนิดของคอลัมน์

Myung, S. and et al., (1998) ศึกษาปัจจัยของเกลือโซเดียม pH ของสารละลาย เวลาที่ใช้ในการสกัด สมดุล เวลาดูดกลืน ชนิดของไฟเบอร์ที่เคลือบและการวัดสารกระตุ้นในปัสสาวะ โดยทำการตรวจวัดแอมเฟตามีน เมทแอมเฟตามีนและไดเมทแอมเฟตามีน ในปัสสาวะ เตรียมตัวอย่างโดยนำปัสสาวะมา 3 มิลลิลิตร ใส่ในขวด เติม 5 ไมโครลิตร ของ 5 โมลาร์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ และ 0.9 กรัม ของโซเดียมคลอไรด์คนให้เข้ากัน ทำการสกัดด้วยเทคนิค SPE โดย Fiber เคลือบด้วย PDMS หนา 100 ไมโครเมตร จุ่มลงในตัวอย่างปัสสาวะ คนด้วย Stirrer นาน 30 นาที สารที่ต้องการวิเคราะห์จับอยู่บน fiber นำไปวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี เฟลมไอออไนเซชัน พบว่าการสกัดด้วยเทคนิค SPE เป็นวิธีที่ง่ายและวิเคราะห์ได้รวดเร็ว โดยไม่จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เกิดสัญญาณพื้นที่รบกวนต่ำ ให้ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดแอมเฟตามีน เมทแอมเฟตามีนและไดเมทแอมเฟตามีน ที่ระดับ 10,10 และ1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่าความแม่นยำอยู่ในช่วง 1.4 - 6.6 % ภายใต้สภาวะพีเอชที่ 12.4 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ที่ 30 % และเวลาสมดุลของสารที่ 30 นาที

Talwar, D. Watson, D. and Stewart, M.J.(1999) ได้ศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารแอมเฟตามีน เมทแอมเฟตามีน MDMA MDA และ MDEA (3,4-Methyllenedioxy ethylampheta mine) โดยนำตัวอย่างมาทำอนุพันธ์ด้วย NQS (Sodium ß - napthquinone - 4 -sulphonate) นำตัวอย่างปัสสาวะมา 3 มิลลิลิตร เติม 10 ไมโครลิตร ของ dimethylamine เป็น internal standard ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร สกัดด้วยสารละลายผสมเอทานอล : กรดไฮโดรคลอริก (6 : 1) จำนวน 20 ไมโครลิตร นำไปเซนติฟิวส์นาน 2 นาที แยกตัวทำละลายอินทรีย์ไประเหยแห้งด้วยแก๊ส N_2 ที่ 50 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้มาเติมด้วย 8 % ของโซเดียมคาร์บอเนต จำนวน 0.5 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร ของ 0.5 % NQS ทำการผสมสารที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทิ้งให้เย็น เติมด้วย 1 มิลลิลิตร ของคลอโรฟอร์ม นำไปวิเคราะห์ด้วยไฮเฟอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี โดยวัดที่ 2 ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 60 - 75 ไมโครกรัมต่อลิตร และความยาวคลื่นที่ 450 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 90 - 135 ไมโครกรัมต่อลิตร และให้ค่าขีดจำกัดของการหาปริมาณวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 115 - 155 ไมโครกรัมต่อลิตร และที่ความยาวคลื่นที่ 450 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 210 - 330 ไมโครกรัมต่อลิตร ให้ค่าร้อยละของการกลับคืนที่ 78 % และเป็นวิธีที่เหมาะสมให้สภาพไว (sensitivity) มีความจำเพาะเจาะจงดี (selectivity) โดยไม่มีพีคอื่นรบกวน ให้ค่าความแม่นยำที่ค่า cutoff 500 ไมโครกรัมต่อลิตร

Kataoka, H., Lord, H.L. and Pawliszyn, J. (2000) ได้พัฒนาการใช้ SPME ทำงานร่วมกับ LC - ESI - MS (Liquid chromatography - electrospay ionization mass spectrometry) ในการตรวจวัดหาแอมเฟตามีน เมทแอมเฟตามีนและสารอนุพันธ์ของเมททิลลีนไดออกซีในปัสสาวะ ด้วยเทคนิคการสกัดในหลอด SPME เป็นการสกัดสารอินทรีย์ในตัวอย่างที่เป็นน้ำ แล้วนำสารที่สกัดได้เข้าสู่หลอดคาปิลลารีทำการวัดสเปกตร้า สภาวะที่เหมาะสมของหลอดคาปิลลารี SPME คือการดูดการปล่อยสาร 15 ครั้งของรอบสารตัวอย่าง 35 ไมโครลิตร ใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris HCl ที่พีเอช 8.5 อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 100 ไมโครลิตรต่อนาที โดยใช้คาปิลลารีคอลัมน์ชนิด Omegawax 250 ซึ่งหลอด SPME 1 หลอดสามารถวิเคราะห์สารได้ 500 ครั้ง พบว่า ขีดจำกัดของการตรวจวัดอยู่ในช่วง 0.38 - 0.82 มิลลิกรัมต่อลิตร ร้อยละการกลับคืนได้ถึง 81% และเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว เหมาะกับการวิเคราะห์สารกระตุ้นในปัสสาวะและจะไม่มีพีคของสารอื่นรบกวน

Sterk, U. and Kulpmann, W.R. (2000) ได้พัฒนากระบวนการสกัดสารในการตรวจวิเคราะห์ยาด้วยเทคนิค SPME โดยใช้อุณหภูมิสูงๆ นำมาใช้ในการเตรียมตัวอย่างของการตรวจวิเคราะห์ยาเสพติดในปัสสาวะและในซีรั่ม เตรียมตัวอย่างโดยนำปัสสาวะสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เฮกเซนและเอทิลอะซีเตทที่พีเอช 9.0 แยกชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ ใส่ลงในขวดระเหยให้แห้งด้วยการผ่านแก๊ส N_2 ให้ความร้อนในเฮดสเปสที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส สกัดด้วยเทคนิค

SPME โดย fiber เคลือบด้วย polyacrylate และทำให้เกิดสารอนุพันธ์ด้วย acetic anhydride pyridine นาน 10 นาที ทำการฉีดเข้าแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปคโตเมทรี ที่อุณหภูมิ 320 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที สามารถตรวจพบสารกลุ่มแอมเฟตามีน 200 ไมโครกรัมต่อลิตร สารกลุ่มบาร์บิทูเรต 500 ไมโครกรัมต่อลิตร สารกลุ่มเบนโซไดอะซีปีน 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เบนซอลเลคโกไน 150 ไมโครกรัมต่อลิตร เมททาโด 100 ไมโครกรัมต่อลิตร และมอร์ฟีน 200 ไมโครกรัมต่อลิตร

Mauri - Aucejo, A.R. and et al., (2001) ทำการตรวจวัดหาแอมเฟตามีนในปัสสาวะ โดยใช้ batch และ flow injection อาศัยเทคนิคการสกัด LLE วิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี นำตัวอย่างปัสสาวะมาปรับด้วยโซเดียมคาร์บอเนตอิ่มตัวให้ได้ พีเอช 13 สกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์ เขย่านาน 60 วินาที กรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง นำตัวอย่างเข้าระบบโดยใช้ปั๊มในอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที ผ่านไปยัง six port valve ทำการผสมตัวอย่างกับอีเทอร์แล้วผ่านไปยัง extraction coil ที่มีความยาว 11 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 มิลลิเมตร ทำการวัดสารด้วย fluorescence ที่ความยาวคลื่นของ emission 277 นาโนเมตร และใช้ความยาวคลื่น excitation ที่ 260 นาโนเมตร พบว่าให้ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของแอมเฟตามีนที่ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าขีดจำกัดของการหาปริมาณวิเคราะห์ของเมทแอมเฟตามีนที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าความเที่ยง (precision) ที่ 7 % และให้ค่าร้อยละการกลับคืนทั้งก่อนและหลังการสกัดที่ 107 ± 8 % ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % วิธีนี้มีข้อดีคือไม่มีการรบกวนของสารอื่นๆ ที่อยู่ในตัวอย่าง

Kiel, J.S., Morgan, S.L. and Abramson, R.K. (1985) ทำการประเมินระบบที่จะมีผลต่อสารเอมีน 15 ชนิด โดยการเปลี่ยนแปลงของเวลาที่สารเคลื่อนที่ออกมา และความสมมาตรของพีคของ primary , secondary และ tertiary amine โดยทำการปรับเปลี่ยนพีเอชของเฟสที่เคลื่อนที่ (mobile phase) ในช่วง 2.5 - 8 และการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของ sodium ion ในเฟสเคลื่อนที่ เพื่อดูกลไกของแรงกระทำของสารที่ไม่ชอบน้ำกับเฟสอยู่กับที่การแลกเปลี่ยนไอออนและพันธะไฮโดรเจน ด้วยไฮเฟอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี โดยเฟสเคลื่อนที่ของ A เป็น 0.1 โมลาร์ phosphoric acid ในอะซิโตไนไทล์กับน้ำ (50 : 50) เฟสเคลื่อนที่ของ B เป็น 0.1 โมลาร์ โซเดียม – ไฮดรอกไซด์ ในอะซิโตไนไทล์กับน้ำ (50 : 50) และเฟสเคลื่อนที่ ของ C เป็น 0.1 โมลาร์ Amine modifier ใน อะซีโตไนไทล์กับน้ำ (50 : 50) อัตราการไหลทั้งหมด 2 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ C จะปรับเพิ่มขึ้น 25% จากอัตราการไหลทั้งหมดโดยความเข้มข้น amine modifier อยู่ที่ 25 มิลลิโมลาร์ ทุกการทดสอบและการปรับเปลี่ยนพีเอชจะทำการปรับเปลี่ยนจากอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ของ A และ B พบว่ากลไกของแรงกระทำของสารที่ไม่ชอบน้ำกับเฟสอยู่กับที่จะทำให้เวลาที่สารคงอยู่ในคอลัมน์นานขึ้นเคลื่อนที่ออกมาลดลง ส่วนความสมมาตรของพีคจะถูกควบคุมการแลกเปลี่ยนไอออนและพันธะไฮโดรเจนในเฟสเคลื่อนที่

Tsuchihashi, H. and et al., (1989) ศึกษาการตรวจวิเคราะห์สารกระตุ้นในปัสสาวะ โดยการทำอนุพันธ์ด้วย TFA ภายในคอลัมน์ทำการวัดด้วยเครื่อง เฮดสเปส แก๊สโครมาโทกราฟี นำตัวอย่างปัสสาวะมา จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดขนาด 20 มิลลิลิตร เติม โพแทสเซียมคาร์บอเนต 3.5 กรัม ให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำส่วนที่เป็นไอเข้าสู่เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ในปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร พร้อมทั้งทำอนุพันธ์ด้วย TFA โดยการนำสารละลาย MBTFA (N - methylbis [trifluoro acetamide) จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดขนาด 10 มิลลิลิตร ผ่านแก๊ส N_2 ลงในขวด อัตราการไหล 20 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วนำส่วนที่เป็นแก๊สของ MBTFA ฉีดเข้าสู่ sample loop ที่เชื่อมต่อตรง six - way valve โดยใช้ switched ให้สารกระตุ้นโดยทำอนุพันธ์ภายในแคปิลลารีคอลัมน์ คาปิลลารีชนิด DB - 1 ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร ให้ค่าความเป็นเส้นตรงเของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์และแอมเฟตามีนซัลเฟตอยู่ในช่วง 0.04 - 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์และแอมเฟตามีนซัลเฟตอยู่ที่ระดับ 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สุภาพร สุรินทราช (2549) ได้ตรวจหาปริมาณสารเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะโดยเปรียบเทียบกันระหว่างในน้ำปัสสาวะและในคราบปัสสาวะบนผ้าก๊อสและกระดาษกรองจากตัวอย่างปัสสาวะส่งตรวจ พบสารเมทแอมเฟตามีน จำนวน 10 ราย สกัดด้วยการละลายคราบปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร และแช่ไว้นาน 1 ชั่วโมง ในการวิเคราะห์ใช้วิธี immunoassay ด้วยเครื่อง TDx จากการทดลองพบว่า การได้คืนมาของเมทแอมเฟตามีนบนคราบของกระดาษกรองมีมากกว่าในผ้าก๊อส ($p<0.05$) และไม่แตกต่างจากปัสสาวะ ซึ่งจากผลที่ได้นี้อาจนำไปประยุกต์ใช้เก็บปัสสาวะในรูปของคราบปัสสาวะแทนการเก็บน้ำปัสสาวะได้ นอกจากนี้ได้ทำการตรวจหาสารเมทแอมเฟตามีนในคราบปัสสาวะบนผ้าก๊อสและกระดาษกรองจากปัสสาวะที่ส่งตรวจพบสารเมทแอมเฟตามีน จำนวน 10 ราย เปรียบเทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้น เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 3 วัน,1, 2, 4, 12 และ 14 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 0 $^{\circ}$C , 4 $^{\circ}$C, อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิกลางแจ้ง ผลการทดลองพบว่า เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 0 $^{\circ}$C และ 4 $^{\circ}$C จนถึง 24 สัปดาห์ ให้ผลไม่แตกต่างจากเวลาเริ่มต้น การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเก็บคราบของปัสสาวะในรูปแห้งยังคงตรวจพบสารเมทแอมเฟตามีนในคราบปัสสาวะได้ นานถึง 24 สัปดาห์ ส่วนการเก็บที่อุณหภูมิห้องและกลางแจ้งพบว่า สารเมทแอมเฟตามีนลดลงตามลำดับในระยะเวลา 24 สัปดาห์เมื่อเทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้น ($p< 0.05$

สุภาพรรณ ทีฆะสุข (2548) ได้ศึกษาและพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารเสพติดเมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีนในปัสสาวะ โดยใช้เทคนิคเฮดสเปส แก๊สโครมาโทกราฟี ด้วยตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชันและไนโตรเจนฟอสฟอรัส โดยใช้คาปิลลารีคอลัมน์ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร เคลือบด้วย 5% phenyl polysiloxane หนา 0.25 ไมโครเมตร (BP -

5) สำหรับตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชันและคาปิลลารีคอลัมน์ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร เคลือบด้วย dimethyl polysiloxane หนา 0.25 ไมโครเมตร (BP - 1) สำหรับตัวตรวจวัดชนิดไนโตรเจนฟอสฟอรัสและทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องเฮดเปสในการสกัดตัวอย่างและปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อวิธีการสกัด โดยนำตัวอย่างปัสสาวะมา 3 มิลลิลิตร บรรจุลงในขวดขนาด 10 มิลลิลิตร เติมโพแทสเซียมคาร์บอเนต จำนวน 2 กรัม เป็น salting out และเติมเบนซิลเอมีน 100 ไมโครลิตร เป็น internal standard นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องเฮดสเปสตั้งสภาวะของเครื่อง ที่ความดันประมาณ 25 psi เวลาที่สารเข้าสู่สมดุลใน 30 นาที อุณหภูมิที่ 90 °C เวลาที่ให้ความดันของแก๊สเข้าในขวด 0.2 นาที เวลาที่สารเข้า sample loop 0.01 นาที เวลาของสารเข้าสู่สมดุลใน sample loop 0.05 นาที และเวลาที่สารจาก sample loop ฉีดเข้าสู่เครื่อง 2 นาที ซึ่งจากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีพบว่า วิธีนี้ไม่มีการรบกวนจากสารอื่นที่มีอยู่ในตัวอย่างช่วงความเป็นเส้นตรงของตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชันของเมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีนในปัสสาวะอยู่ในช่วงความเข้มข้น 1 - 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ คือ 0.9990 - 0.9993 และช่วงความเป็นเส้นตรงของตัวตรวจวัดชนิดไนโตรเจนฟอสฟอรัสของเมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีนในปัสสาวะ อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.025 - 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ คือ 0.9988 - 0.9995 ความถูกต้องของวิธีแสดงในรูปร้อยละของการกลับคืนของสาร โดยเติมของสารมาตรฐานลงในตัวอย่าง พบว่าให้ค่า 99.49 - 101.78 % ของตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน และ 99.39 - 101.82 % ของตัวตรวจวัดไนโตรเจนฟอสฟอรัส ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและค่าขีดจำกัดของการตรวจปริมาณวิเคราะห์ของเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชันและไนโตรเจนฟอสฟอรัส อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.004, 0.002 และ 0.025 - 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับและแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชันและไนโตรเจนฟอสฟอรัส อยู่ที่ช่วงความเข้มข้น 0.03, 0.006 และ 0.1 - 0.025 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาและพัฒนาความถูกต้องของวิธีพบว่า วิธีนี้สามารถที่นำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาสารเสพติด เมทแอมเฟตามีนและแอมเฟตามีนในปัสสาวะ

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่อง Gas Chromatography - FID รุ่น GC - 2010 พร้อมด้วย Auto sampler รุ่น AOC - 20i (SHIMUDZA)

3.1.2 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) ของ Hettich

3.1.3 เครื่องเขย่า (Vortex) รุ่น GENIE 2

3.1.4 เครื่องเขย่า (Shaker) ของ Crest

3.1.5 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น LA 230s ของ Sartorius

3.1.6 ตู้ดูดควันพิษ (Hood) ของ FLEXLAB FUME HOOD

3.1.7 ตู้อบเครื่องแก้ว รุ่น Gravity Convention Oven ของ Precision

3.1.8 ตู้เย็น รุ่น Climatro

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 5, 25, 50 และ 150 มิลลิลิตร

3.2.2 กระบอกตวง ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร

3.2.3 ไมโครปิเปต (Micropiptte) ขนาด 0 - 20, 20 - 200 และ 200 - 1000 ไมโครลิตร

3.2.4 หลอดทดลอง

3.2.5 ขวดบรรจุสารขนาดเล็ก (Vial)

3.2.6 ช้อนตักสาร (Spatula)

3.2.7 แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

3.2.8 หลอดดูดสาร (Dropper)

3.2.9 ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flack) ขนาด 5, 10, 25 และ 100 มิลลิลิตร

3.2.10 ขวดแก้วสีชา

3.2.11 กระติกน้ำแข็ง

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารมาตรฐาน เมทแอมเฟตามีน ไฮโดรคลอไรด์ (Methamphetamine Hydrochloride) ความบริสุทธิ์ 99.0 % ของ Alltech

3.3.2 ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) ความบริสุทธิ์ 99.5 % ของ CARLO ERBA

3.3.3 เฮกเซน (Hexane) AR grade ของ Mallinchrodt

3.3.4 บิวทิลอะซิเตท (Buthyl acetate) ความบริสุทธิ์ 99.5 % ของ CARLO ERBA

3.3.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ของ CARLO ERBA

3.3.6 น้ำกลั่น

3.3.7 แก๊สแอซิโร (Air zero)

3.3.8 แก๊สไนโตรเจน (Nitrogen) ความบริสุทธิ์ 99.999 %

3.3.9 แก๊สไฮโดรเจน (Hydrogen) ความบริสุทธิ์ 99.999 %

3.3.10 แก๊สฮีเลียม (Helium) ความบริสุทธิ์ 99.999 %

3.4 วิธีการดำเนินการ

3.4.1 ศึกษาของมูลพื้นฐานของเมทแอมเฟตามีน

3.4.2 ศึกษาและรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเมทแอมเฟตามีน

3.4.3 เตรียมความพร้อมของห้องปฏิบัติการและเครื่องมือ

3.4.3.1 ตรวจสอบเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองให้อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน

3.4.3.2 การเตรียมเครื่องแก้วล้างเครื่องแก้วด้วยน้ำยาล้างเครื่องแก้วให้สะอาด จากนั้นนำเครื่องแก้วไปแช่ในน้ำกลั่นแล้วนำไปอบในตู้อบเครื่องแก้วที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้แห้งก่อนนำมาใช้งาน

3.4.3.3 จัดเตรียมสารเคมี ตัวทำละลายและสารละลายมาตรฐานของเมทแอมเฟตามีน

3.4.4 ศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะจากรายงานต่างๆ โดยศึกษาและรวบรวมข้อมูลของการสกัดตัวอย่างเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะและการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีเฟลมไอออไนเซชัน

3.4.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

3.4.5.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีเฟลมไอออไนเซชัน

เตรียมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ 0.0031 กรัม ละลายในไดคลอโรมีเทน แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยไดคลอโรมีเทน (stock solution)

เตรียมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ละลายในไดคลอโรมีเทน แล้วเทใส่ใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยไดคลอโรมีเทน

3.4.5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับการสกัด

เตรียมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์สำหรับ spiked urine sample เข้มข้น100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ 0.0031 กรัมละลายในน้ำกลั่น แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยน้ำกลั่น (stock solution)

เตรียมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์สำหรับ spiked urine sample เข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรจนถึงขีดด้วยน้ำกลั่น

3.4.5.3 เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3.4.4.4 เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3.4.5.5 เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3.4.5.6 เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5.0 โมลาร์ ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3.4.6 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี เฟลมไอออไนเซชัน

นำสารละลายข้อ 3.4.5.1 ฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเฟลมไอออไนเซชัน โดยการปรับเปลี่ยนสภาวะการทดลองของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เฟลมไอออไนเซชัน ดังนี้

เปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของอินเจคเตอร์ (injector: t_i) ระหว่าง 230 - 280 °C

เปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของคอลัมน์ (column: t_c) ด้วย temperature program โดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้น100 - 200 °C โดยให้อุณหภูมิสุดท้ายเป็น 260 °C

เปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของดีเทคเตอร์ (detector: t_d) ระหว่าง 280 - 310 °C

เปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของแก๊สพา (flow rate) จาก 0.6 - 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที นำผลวิเคราะห์ที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับอุณหภูมิต่างๆ

3.4.7 สร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curves)

เตรียมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ 4 ระดับความเข้มข้นจาก 0.5 - 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาวิเคราะห์โดยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเฟลมไอออไนเซชัน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.6

3.4.8 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ ด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของเหลวและตัวแปรที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการสกัด

3.4.8.1 ศึกษาหาวิธีการผสมสารที่เหมาะสม โดยเปลี่ยนแปลงวิธีการผสมสาร ได้แก่ วิธีเขย่าด้วยเครื่อง shaker และเครื่อง vortex โดยนำตัวอย่างปัสสาวะ 3 มิลลิลิตร มาเตรียมเป็น spiked urine sample โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน จากข้อ 3.4.5.2 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติม 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร vortex 10 วินาที เติมไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้วิธีการผสมสารด้วยเครื่องที่ศึกษา ได้แก่ เครื่อง Shaker และ Vortex เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอน ที่อัตราเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนที่ใสนำไปฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เฟลมไอออไนเซชัน ตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.6

3.4.8.2 ศึกษาหาสารสกัดที่เหมาะสมโดยเปลี่ยนแปลงชนิดของสารสกัด ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน, บิวทิลอะซิเตท และ เฮกเซน โดยนำตัวอย่างปัสสาวะ 3 มิลลิลิตร มาเตรียมเป็น spiked urine sample โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน จากข้อ 3.4.5.2 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติม 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร vortex เป็นเวลา 10 วินาที เติมสารสกัดที่ศึกษา ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน, บิวทิลอะซิเตท และเฮกเซน โดยใช้วิธีการผสมสารที่เหมาะสม จากข้อ 3.4.8.1 เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอน ที่อัตราเร็ว 3,500 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนที่ใสนำไปฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเฟลมไอออไนเซชัน ตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.6

3.4.8.3 ศึกษาหาความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสม โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้แก่ 0.1, 1.0, 2.5 และ 5.0 โมลาร์ โดยนำตัวอย่างปัสสาวะ 3 มิลลิลิตร มาเตรียมเป็น spiked urine sample โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน จากข้อ 3.4.5.2 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติมความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ศึกษา ได้แก่ 0.1, 1.0, 2.5 และ 5.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร vortex เป็นเวลา 10 วินาที เติมสารสกัดที่เหมาะสม จากข้อ 3.4.8.2 โดยใช้วิธีการผสมสารที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.8.1 เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอนที่อัตราเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนที่ใสนำไปฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเฟลมไอออไนเซชัน ตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.6

3.4.8.4 ศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมในการสกัด โดยเปลี่ยนแปลงเวลาได้แก่ 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 นาที โดยนำตัวอย่างปัสสาวะ 3 มิลลิลิตร มาเตรียมเป็น spiked urine sample โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน จากข้อ 3.4.5.2 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เติมความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสม จากข้อ 3.84.8.3 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร vortex เป็นเวลา 10 วินาที เติมสารสกัดที่เหมาะสม จากข้อ 3.4.8.2 โดยใช้วิธีการผสมสารที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.8.1 เป็นเวลาที่ศึกษา ได้แก่ 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอน ที่อัตราเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนที่ใสนำไปฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเฟลมไอออไนเซชัน ตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.6

3.4.9 ทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Validation method)

3.4.9.1 ค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงความเป็นเส้นตรง (Linear range) ความเป็นเส้นตรงเตรียมโดยการเติมสารมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ในตัวอย่างปัสสาวะในช่วงความเข้มข้น 0.5 - 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 5 ระดับความเข้มข้น แล้วทำการสกัดโดยการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ 3 มิลลิลิตร แล้ว spiked urine sample โดยปิเปตสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ จากข้อ 3.4.5.2 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงไป เติมความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสม จากข้อ 3.4.8.3 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร vortex เป็นเวลา 10 วินาที เติมสารสกัดที่เหมาะสม จากข้อ 3.4.8.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วทำการผสมสารด้วยเครื่องที่เหมาะสม จากข้อ 3.4.8.1 เป็นเวลาที่เหมาะสม จากข้อ 3.4.8.4 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนที่ใสไปฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเฟลมไอออไนเซชัน ที่สภาวะเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเฟลม

ไอออไนเซชัน รุ่น GC - 2010 พร้อมด้วย Autosampler รุ่น AOC - 20i (SHIMUDZA) และ Column Rtx - 5(30 m x 0.25 mm. x 0.25 μm) ที่สภาวะที่เหมาะสม จากข้อ 3.4.6 ทำการวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ วิเคราะห์ผลการทดลอง นำค่าที่ได้สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของเมทแอมเฟตามีนในแต่ละความเข้มข้นให้แกน y เป็นพื้นที่ใต้กราฟและแกน x เป็นความเข้มข้น

3.4.9.2 ช่วงความเป็นเส้นตรงทำโดยการเติมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ลงในตัวอย่างปัสสาวะความเข้มข้นสูงขึ้น ดำเนินการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.4.9.1

3.4.9.3 หาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of detection: LOD) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of quantitation: LOQ) วิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารละลายมาตรฐานของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ ต่างๆ ดำเนินการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.4.9.1 นำผลวิเคราะห์มาเทียบกับสัญญาณของสารที่ได้ (S) กับสัญญาณรบกวน (N) ขีดจำกัดต่ำสุดของการวัดจะได้ความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวน (LOD = 3N) และขีดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณเป็นความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณการวิเคราะห์เป็น 10 เท่าของสัญญาณรบกวน (LOQ = 10N) (ทำการวิเคราะห์ 7 ซ้ำ)

3.4.9.4 ค่าร้อยละการกลับคืนได้ (% Recovery) (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2549) เติมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ 4 ระดับความเข้มข้นลงในตัวอย่างปัสสาวะ ดำเนินการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.4.9.1 ทำการวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ วิเคราะห์ผลการทดลองและคำนวณเปอร์เซ็นต์การได้กลับคืน

คำนวณร้อยละการกลับคืนได้ (% Recovery)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(C1 - C2)\,x\,100}{C3} \qquad (3.1)$$

C1 คือ ความเข้มข้นของสารใน spiked matrix blank

C2 คือ ความเข้มข้นของ matrix blank

C3 คือ ความเข้มข้นของ analyte ที่เติม

เกณฑ์การยอมรับ Recovery (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2549)

The AOAC Manual for the Peer Verified Methods Program (1993) ได้กำหนดแนวทางสำหรับการพิจารณาการยอมรับ % Recovery โดยทั่วไป ตามตารางที่ 3.1 สำหรับตารางที่ 3.2

เป็นเกณฑ์ที่ Codex ได้กำหนดไว้สำหรับงานด้านสารตกค้างจากยาฆ่าแมลงและยาสัตว์ตกค้างในอาหาร

ตารางที่ 3.1 Analyte %Recovery สำหรับการพิจารณายอมรับที่ความเข้มข้นต่างๆ (ตาม AOAC) (แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว, 2549)

ความเข้มข้นของ Anayte	% Recovery
100 %	98 – 102
> 10 %	98 – 102
> 1 %	97 – 103
> 0.1 %	95 – 105
100 ppm	90 – 107
10 ppm	80 – 110
1 ppm	80 – 110
100 ppb	80 – 110
10 ppb	60 – 115
1 ppb	40 – 120

ตารางที่ 3.2 Analyte %Recovery สำหรับการพิจารณายอมรับที่ความเข้มข้นค่าต่างๆ ของสารตกค้างจากยาฆ่าแมลงและยาสัตว์ตกค้างในอาหาร (ตาม Codex) (แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว, 2549)

ความเข้มข้นของ Analyte	% Recovery
< 1 µg/kg	50 – 120
> 1 µg/kg ≤ 0.01 mg/kg	60 – 120
> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	70 – 120
> 0.1 mg/kg < 1 mg/kg	70 – 110
>1 mg/kg	70 – 110

3.4.9.5 ความเที่ยง (Repeatability) (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2549)

ดำเนินการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.4.9.1 โดยทำการทดลองภายในวันเดียวกันและระหว่างวัน วิเคราะห์ผลการทดลองและคำนวณค่าเบี่ยงเบน (Standard Deviation: SD) ของแต่ละความเข้มข้น และการคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ % RSD การคำนวณ % RSD จะได้ความเที่ยง (repeatability) ที่ความเข้มข้นนั้นๆ

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD\,x100}{\bar{X}} \tag{3.2}$$

เกณฑ์การยอมรับ ความเที่ยง (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2549)

การประเมินการยอมรับสามารถทำได้หลายวิธี เช่น กรณีที่ไม่มีการกำหนดค่าที่ยอมรับได้ไว้อย่างชัดเจนจะประเมินได้ โดยการเปรียบเทียบกับค่าที่คำนวณได้จาก Horwitz' s equation และ HORRAT (Horwitz ratio) ตามที่ระบุในThe AOAC manual for the Peer Verified Methods program (1993) หรือในกรณีที่มีการเปรียบเทียบความเที่ยงของสองวิธีก็ใช้ F - test ในการประเมินได้

การประเมินด้วย Horwitz's equation และ HORRAT Horwitz's equation เป็นสมการที่พัฒนาขึ้นโดย Dr.Willium Horwitz โดยสร้างขึ้นจากความสัมพันธ์ระหว่าง % RSD กับความเข้มข้น

Horwitz's equation

สำหรับ Reproducibility: $\% \text{ RSD} = 2^{(1-0.5 \log C)} = 2C^{-0.1505}$ (3.3)

สำหรับ Repeatebility: $\% \text{ RSD} = 0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} = 0.66 \times 2C^{-0.1505}$ (3.4)

โดย C เป็น concentration ratio (ไม่มีหน่วย)

HORRAT หรือ Horwitz's ratio คือ อัตราส่วนระหว่างค่า RSD ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง (RSD_{obs}) กับค่า RSD ที่คำนวณจาก Horwitz's equation ($RSD_{expectd}$)

สำหรับ Repeatebility: $\text{HORRAT} = \frac{RSD_{obs}}{RSD_{expected}}$ (3.5)

ตารางที่ 3.3 ค่า expected % RSD ที่คำนวณจาก Horwitz' s equation ที่ความเข้มข้นต่างๆ (แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว, 2549)

ความเข้มข้นของ analyte	C	Expected	% RSD
100% (100 g/100g)	1	$0.66 \times 2 \times (1)^{-0.1505}$	= 1.3
10% (10 g/100 g)	0.1	$0.66 \times 2 \times (0.1)^{-0.1505}$	= 1.8
1%(1 g/ 100 g)	0.01	$0.66 \times 2 \times (0.01)^{-0.1505}$	= 2.6
0.1%(0.1 g/100 g)	0.001	$0.66 \times 2 \times (0.001)^{-0.1505}$	= 3.7
100 ppm (100mg/kg)	$1 \times 10^{-4} = 0.0001$	$0.66 \times 2 \times (1^{-4})^{-0.1505}$	= 5.2
10 ppm(10 mg/kg)	$1 \times 10^{-5} = 0.00001$	$0.66 \times 2 \times (1^{-5})^{-0.1505}$	= 7.4
1 ppm(1 mg/kg)	$1 \times 10^{-6} = 0.000001$	$0.66 \times 2 \times (1^{-6})^{-0.1505}$	= 10.5
0.1 ppm หรือ 100 ppb	$1 \times 10^{-7} = 0.0000001$	$0.66 \times 2 \times (1^{-7})^{-0.1505}$	= 14.9
0.01 ppm หรือ 10 ppb	$1 \times 10^{-8} = 0.00000001$	$0.66 \times 2 \times (1^{-8})^{-0.1505}$	= 21.1
0.001 ppm หรือ 1 ppb	$1 \times 10^{-9} = 0.000000001$	$0.66 \times 2 \times (1^{-9})^{-0.1505}$	= 29.8

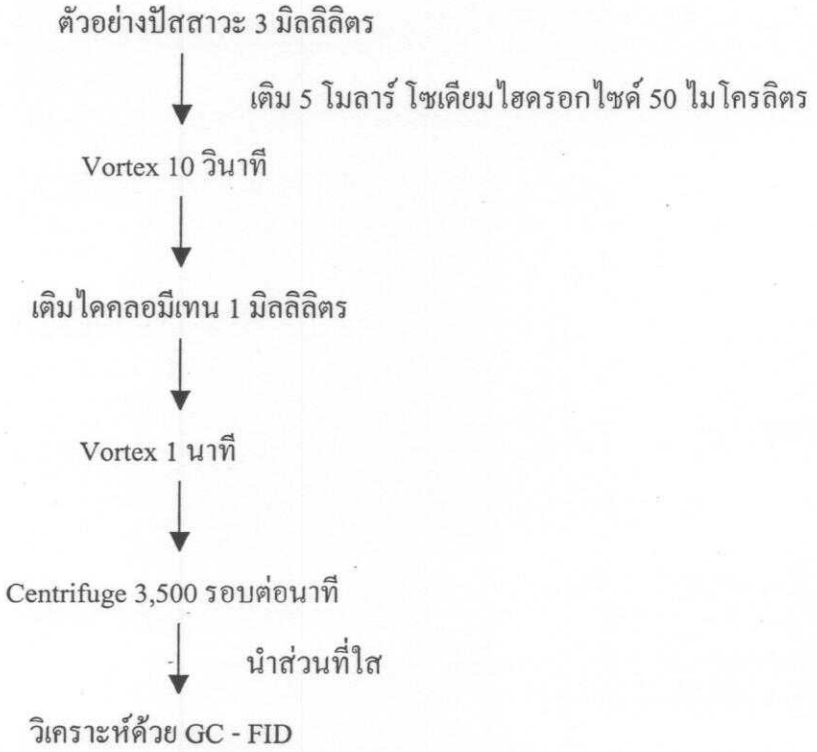
ตารางที่ 3.4 เกณฑ์ของค่า HORRAT ที่ยอมรับที่ AOAC และ Codex กับ EU กำหนดไว้ทั่วๆ ไปดังนี้ (แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว, 2549)

Reference	ค่า HORRAT ที่ยอมรับ
AOAC	< 2
Codex, EU	≤ 2

3.4.10 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ตัวอย่างปัสสาวะปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติม 5 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไป vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นเติมไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไป vortex 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอน ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนที่ใสฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เฟลมไอออไนเซชัน แผนภาพการสกัดแสดงดังภาพที่ 3.1 สภาวะในการทดลองดังนี้ คอลัมน์ชนิด Rtx - 5 ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร ตัวตรวจวัดชนิดเฟลม

ไอออไนเซชัน อุณหภูมิของส่วนฉีดสาร (t_i) 250 °C อุณหภูมิของคอลัมน์ (t_c) แบบโปรแกรมอุณหภูมิ (temperature program) ใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 150 °C คงที่ ณ อุณหภูมินี้ 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจนถึง 260 °C ด้วยอัตราการเพิ่ม 20 °C /นาที จนถึง 260 °C คงที่ ณ อุณหภูมินี้ 3.5 นาที อุณหภูมิของตัวตรวจวัด (t_d) 300 °C อัตราการไหลของแก๊ส 0.8 มิลิลิลิตรต่อนาที การฉีดสารแบบ splitless ปริมาตรในการฉีดสาร 1 ไมโครลิตร รวมเวลา 10 นาที



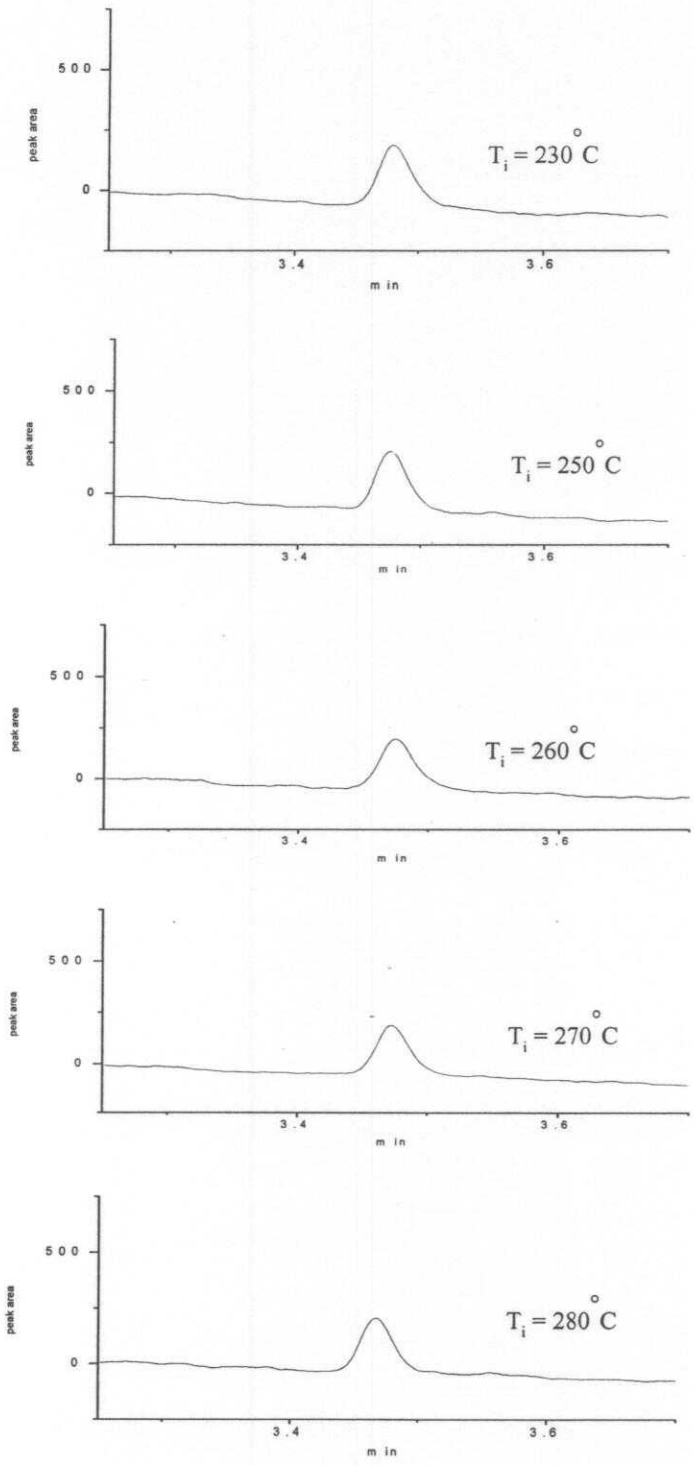
ภาพที่ 3.1 การวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

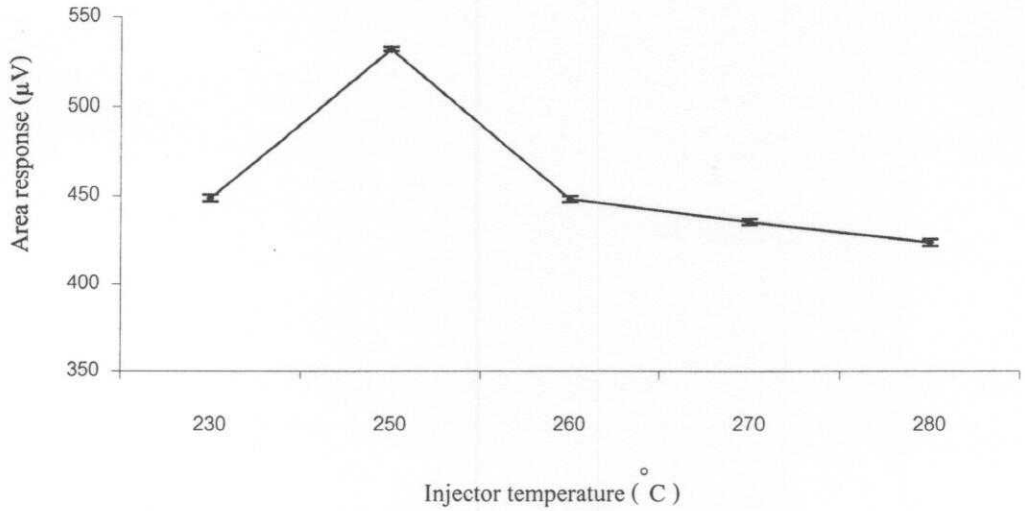
4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เฟลมไอออไนเซชัน และปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการวิเคราะห์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี เฟลมไอออไนเซชัน ในการวิเคราะห์สารมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ การตรวจวัดโดยแก๊สโครมาโทกราฟี เฟลมไอออไนเซชัน ใช้คอลัมน์ชนิด Rtx – 5 ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตรและความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร ใช้แก๊สฮีเลียม (He) เป็นแก๊สพา แก๊สไนโตรเจน (N_2) เป็น make up gas

4.1.1 ผลการศึกษาอุณหภูมิของส่วนฉีดสาร (t_i) จากผลการศึกษา อุณหภูมิของส่วนฉีดสารโดยตั้งอุณหภูมิของส่วนฉีดสารให้มีค่า 230, 250, 260, 270 และ 280 $^{\circ}$C ผลการการศึกษาอุณหภูมิของส่วนฉีดสาร แสดงดังภาพที่ 4.1 เมื่อนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดลองมาพล็อตกราฟกับอุณหภูมิของส่วนฉีดสาร กราฟที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.2 จากกราฟพบว่า สภาวะที่เหมาะสม คืออุณหภูมิของส่วนฉีดสารที่อุณหภูมิ 250 $^{\circ}$C เนื่องจากอุณหภูมินี้ให้พื้นที่ใต้กราฟที่มากที่สุด

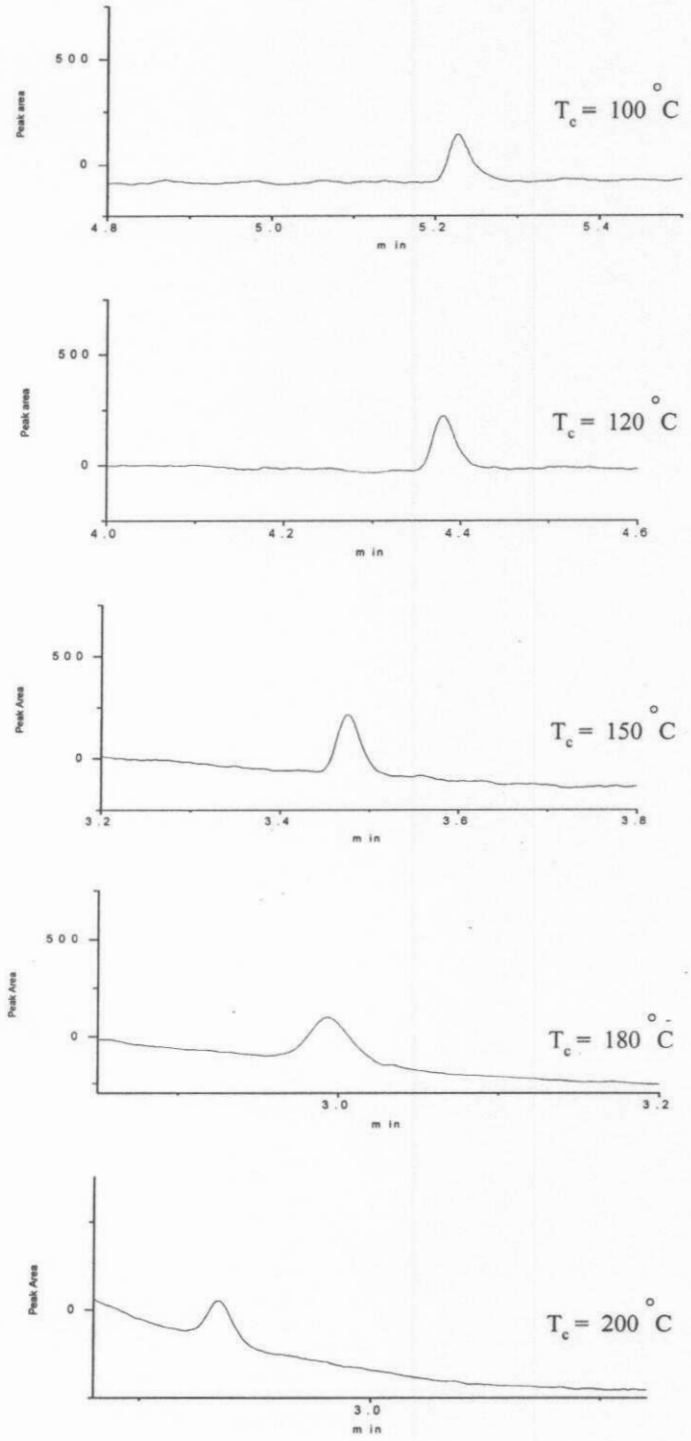


ภาพที่ 4.1 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิส่วนฉีดสาร 230, 250,260, 270 และ 280 $^{\circ}$C

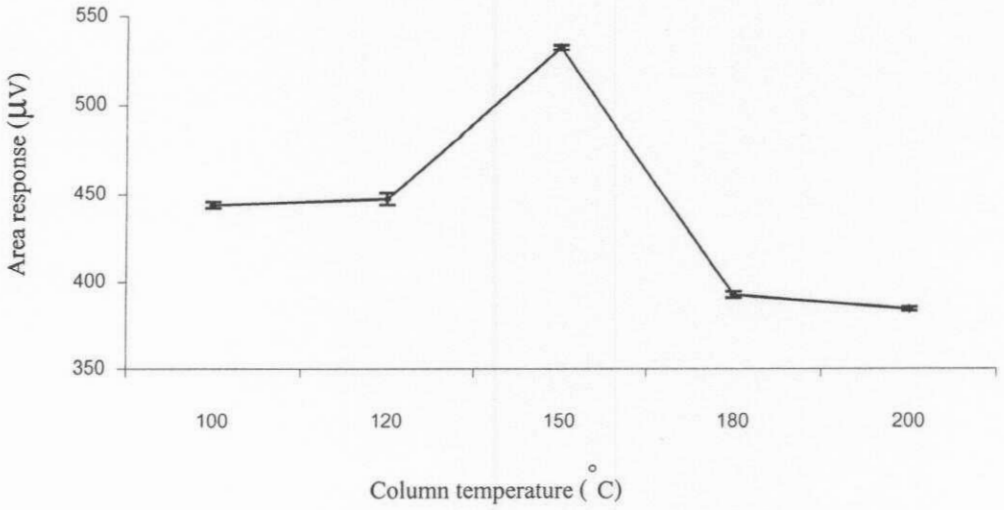


ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของส่วนฉีดสาร (injection temperature) และพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สภาวะการทดลอง คือ อุณหภูมิของคอลัมน์ 150 °C (1 นาที) อัตราเพิ่ม (heating rate) 20 °C /min ถึง 260 °C (3.50 นาที) อุณหภูมิตัวตรวจวัด 300 °C อัตราการไหลของแก๊สพา 0.8 mL/min

4.1.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิของคอลัมน์ (t_c) จากผลการศึกษาอุณหภูมิของคอลัมน์ โดยตั้งอุณหภูมิโปรแกรมของคอลัมน์ เริ่มต้นให้มีค่า 100, 120, 150, 180 และ 200 °C ณ อุณหภูมิเป็นเวลา 1 นาที แล้วเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิที่ 260 °C ด้วยอัตราเพิ่ม 20 °C /นาที และคงที่ที่อุณหภูมิ 260 °C เป็นเวลา 3.5 นาที ผลการศึกษาอุณหภูมิของคอลัมน์แสดงดังภาพที่ 4.3 เมื่อนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดลองมาพล็อตกราฟกับอุณหภูมิของคอลัมน์กราฟที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.4 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้น พบว่าเมทแอมเฟตามีนจะออกมาจากคอลัมน์เร็วขึ้น แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิของคอลัมน์มากเกินไป เช่น 150 °C เป็น 180 °C และ 200 °C พีคที่ได้จะมีฐานพีคที่กว้างขึ้น (broad) และมีการเลื่อนของเส้นฐาน (base line shift) ทำให้การวิเคราะห์เชิงปริมาณอาจผิดพลาด ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์ที่อุณหภูมิ 150 °C

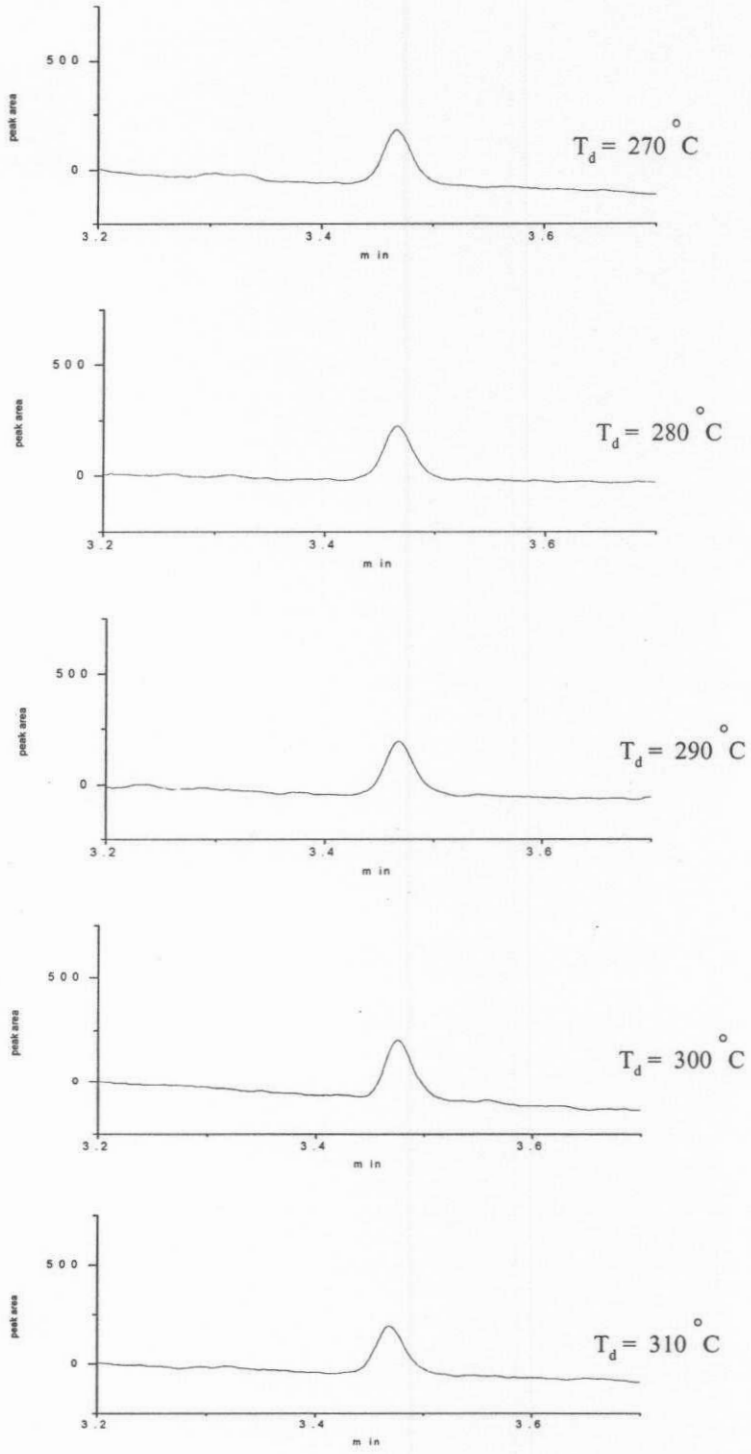


ภาพที่ 4.3 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิคอลัมน์เริ่มต้นเป็น 100, 120,150, 180 และ 200 °C

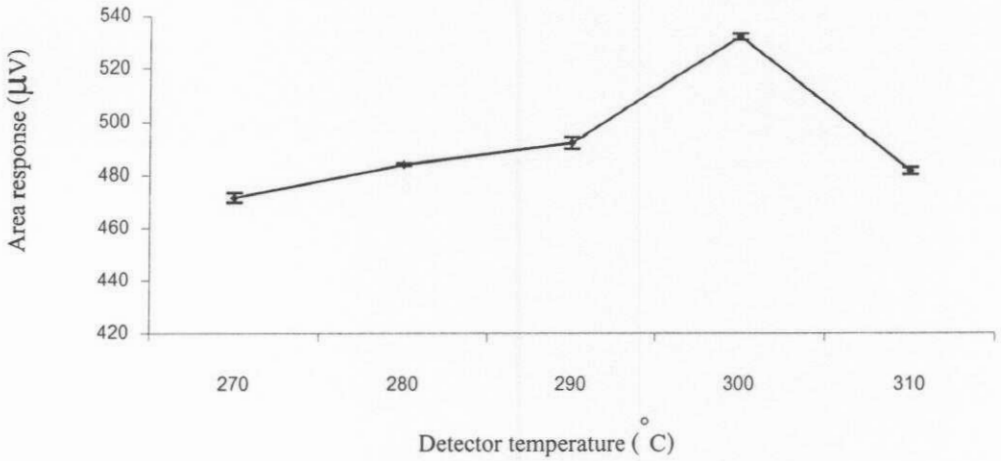


ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของคอลัมน์ และพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สภาวะการทดลองคือ อุณหภูมิของส่วนฉีดสาร 250 °C อุณหภูมิตัวตรวจวัด 300 °C อัตราการไหลของแก๊สพา 0.8 mL/min

4.1.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิของตัวตรวจวัด (t_d) จากผลการศึกษาหาอุณหภูมิของตัวตรวจวัด โดยตั้งอุณหภูมิของตัวตรวจวัดให้มีค่า 270, 280, 290, 300 และ 310 °C ผลการศึกษาอุณหภูมิของตัวตรวจวัดแสดงดังภาพที่ 4.5 เมื่อนำพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดลองมาพล็อตกราฟกับอุณหภูมิของตัวตรวจวัดกราฟที่ได้แสดงดังภาพที่ 4.6 จากกราฟพบว่า สภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิของตัวตรวจวัดที่ 300 °C เนื่องจากอุณหภูมินี้ให้พื้นที่ใต้กราฟมากที่สุดและโครมาโทแกรมที่ได้มีความสมมาตร เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของตัวตรวจวัดมากเกินไป เช่น จาก 300 °C เป็น 310 °C พื้นที่ใต้กราฟลดลง

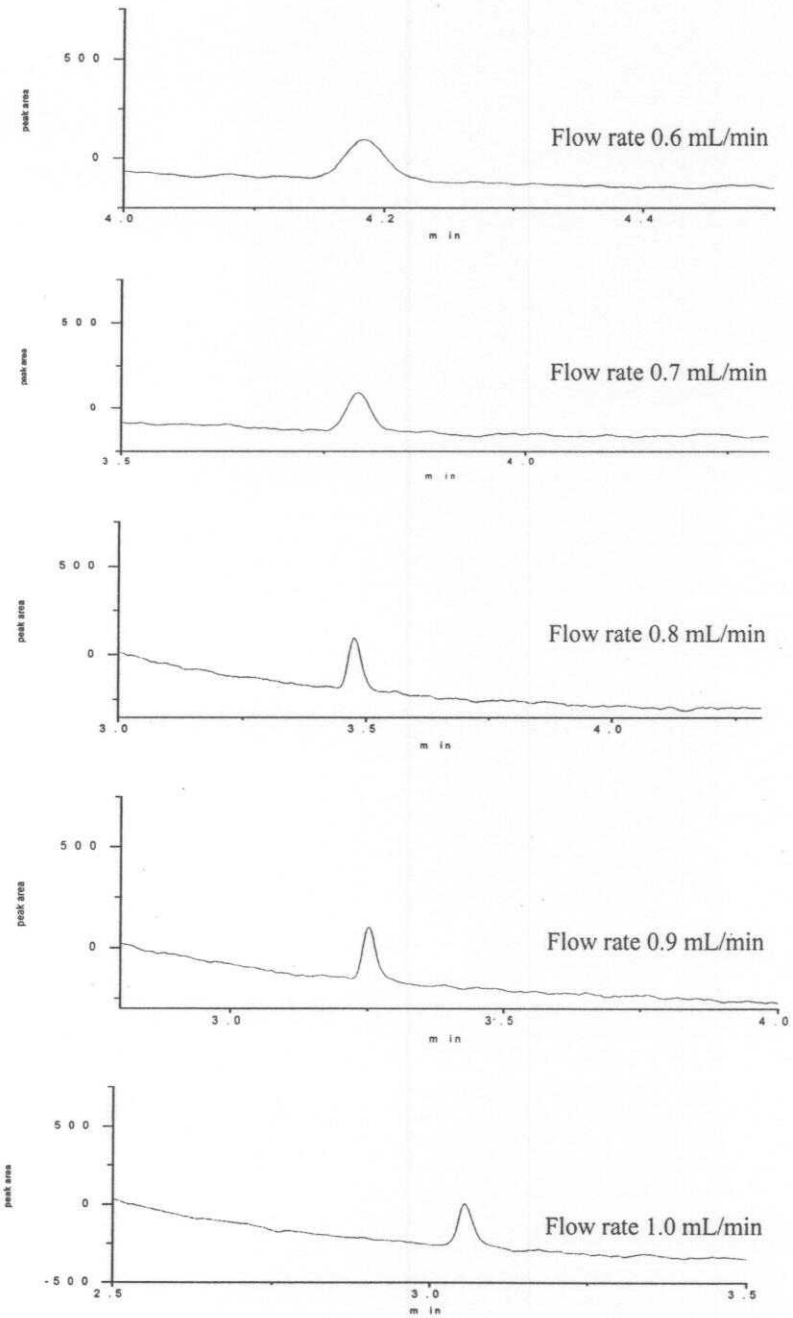


ภาพที่ 4.5 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิตัวตรวจวัด 270, 280,290, 300 และ 310 °C

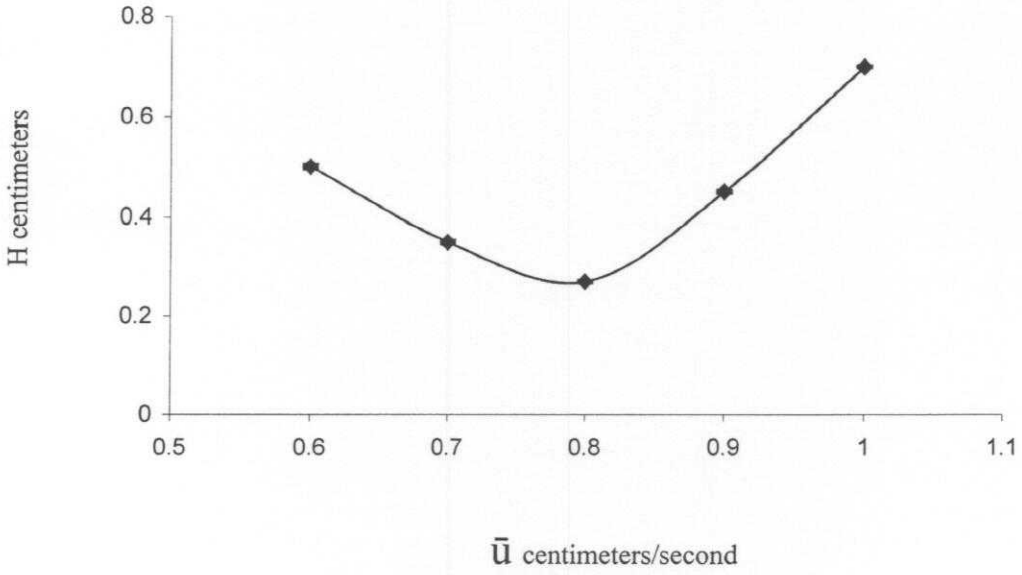


ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของตัวตรวจวัดและพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สภาวะการทดลองคือ อุณหภูมิของส่วนฉีดสาร 250 °C อุณหภูมิของคอลัมน์ 150 °C (1 นาที) อัตราการเพิ่ม (heating rate) 20 °C /min ถึง 260 °C (3.50 นาที) อัตราการไหลของแก๊สพา 0.8 mL/min

4.1.4 ผลการศึกษาอัตราการไหลของแก๊ส (Flow Rate) จากผลศึกษาอัตราการไหลของแก๊สพา โดยตั้งอัตราการไหลให้มีค่า 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการศึกษาอัตราไหลของแก๊สพาแสดงดังภาพที่ 4.7 เมื่อพล็อตกราฟตามสมการ Van Deemter Plot ระหว่างอัตราการไหลของแก๊สพาและค่าความสูงที่เทียบเท่ากับเพลตทางทฤษฎีแสดงดังภาพที่ 4.8 พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ อัตราการไหลของแก๊สพาที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ค่า H ต่ำสุด



ภาพที่ 4.7 โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อัตราการไหลของแก๊สพา (flow rate) 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที



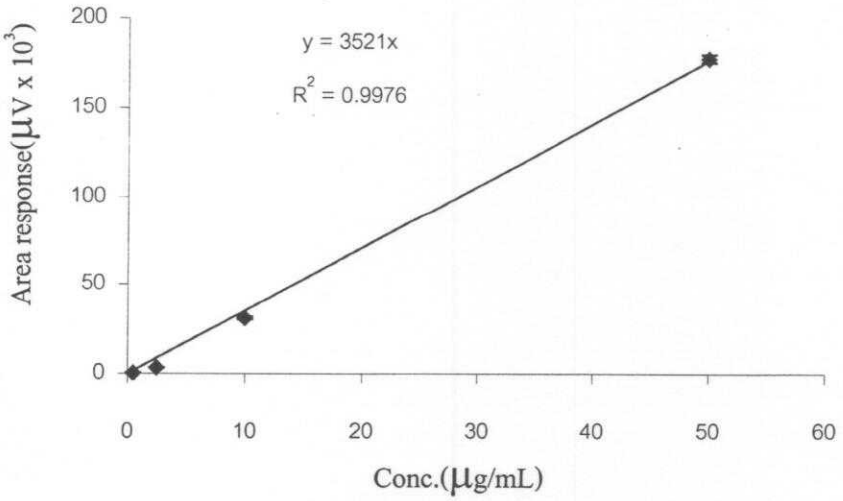
ภาพที่ 4.8 กราฟ Van Deemter Plot ระหว่างอัตราการไหลของแก๊สพา (flow rate) และค่าความสูงที่เทียบเท่ากับเพลตทางทฤษฎี สภาวะการทดลองคือ อุณหภูมิของส่วนฉีดสาร 250 °C อุณหภูมิของคอลัมน์ 150 °C (1 นาที) 20 °C/min ถึง 260 °C (3.50 นาที)

4.2 กราฟมาตรฐาน (Calibration Curves) และขีดจำกัดของการตรวจวัด (Detection Limit)

โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 0.50, 2.50, 10.00 และ 50.00 μg/mL นำมาวิเคราะห์โดยเครื่อง GC - FID โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.9

ตารางที่ 4.1 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) และขีดจำกัดของการตรวจวัด

ความเข้มข้น μg/mL	พื้นที่ใต้กราฟ Mean ± SD	ขีดจำกัดของการตรวจวัด (μg/mL)	สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน
0.50	436.67 ± 29.15	0.50	Y = 3521x
2.50	3281.33 ± 36.47		r^2 = 0.9976
10.00	30978.00 ± 755.93		
50.00	177184.00 ± 2212.14		



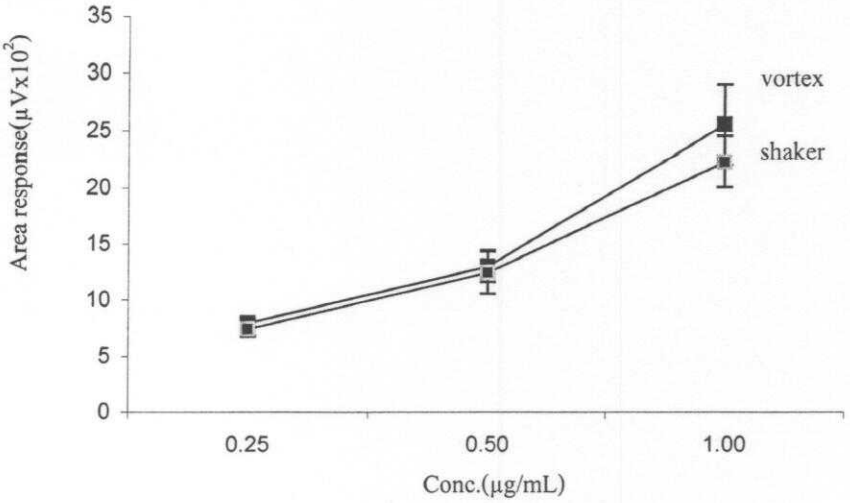
ภาพที่ 4.9 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์

4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการสกัด

4.3.1 ผลการศึกษาหาวิธีในการผสมสารที่เหมาะสมสำหรับการสกัด ได้แก่ การผสมสารด้วยเครื่อง vortex และเครื่อง shaker โดยวัดพื้นที่ใต้กราฟของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ที่เติมลงในปัสสาวะ 3 ความเข้มข้น โดยสกัดความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ คือ 0.25, 0.50 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อตรวจวัดให้กราฟแยกออกมาที่เวลา 3.460 นาที ผลการศึกษาการผสมสารที่เหมาะสมสำหรับการสกัดแสดงดังตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.10 จากการทดลองการผสมสารด้วยเครื่อง vortex ให้พื้นที่ใต้กราฟสูงในทุกความเข้มข้นสามารถสกัดเมทแอมเฟตามีนและให้ผลการตรวจวัดในระดับความเข้มข้นต่ำได้ ดังนั้นการผสมสารด้วยเครื่อง vortex จึงเป็นเครื่องผสมสารที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ

ตารางที่ 4.2 ผลของชนิดของเครื่องผสมสารที่ใช้ในการสกัดสารละลายเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ใน Spike Urine Sample

ความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ (µg/mL)	พื้นที่ใต้กราฟ	
	Vortex	Shaker
	Mean ± SD	Mean ± SD
0.25	771.00 ± 22.54	728.50 ± 25.86
0.50	1204.27 ± 44.29	1110.63 ± 51.43
1.00	2222.47 ± 30.87	2033.50 ± 47.45



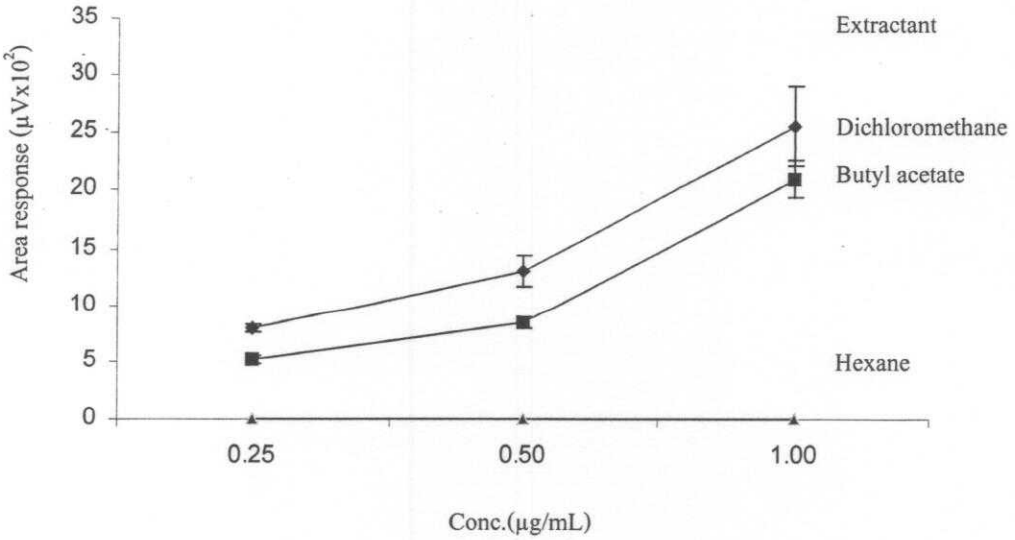
ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, และ 1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผสมสารด้วยเครื่อง shaker และ vortex

4.3.1 ผลการศึกษาหาสารสกัดที่เหมาะสมสำหรับการสกัด ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน บิวทิลอะซิเตทและเฮกเซน โดยวัดพื้นที่ใต้กราฟของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่เติมลงในปัสสาวะ 3 ความเข้มข้น โดยสกัดความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ คือ 0.25, 0.50 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อตรวจวัดให้กราฟแยกออกมาที่เวลา 3.460 นาที ผลการศึกษาหาสารสกัดที่เหมาะสมแสดงดังตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.11 จากผลการทดลองไดคลอโรมีเทนที่ใช้เป็นสารสกัดให้พื้นที่ใต้กราฟสูงกว่าสารสกัดชนิดอื่นในทุกความเข้มข้น สามารถสกัดเมทแอมเฟตามีนและให้ผลการตรวจวัดในระดับความเข้มข้นต่ำได้ ดังนั้นไดคลอโรมีเทนจึงเป็นสารที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ

ตารางที่ 4.3 ผลของการใช้ไดคลอโรมีเทน บิวทิลอะซิเตทและเฮกเซน เป็นสารสกัดในการสกัดสารละลายเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ใน Spike Urine Sample

ความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ (µg/mL)	พื้นที่ใต้กราฟ		
	Dichloromethane	**Butyl acetate**	**Hexane**
	Mean ± SD	**Mean ± SD**	**Mean ± SD**
0.25	771.00 ± 22.54	535.10 ± 12.85	ND
0.50	1204.27± 44.29	834.80 ± 11.88	ND
1.00	2222.47± 30.87	2055.10 ± 17.69	ND

ND = ไม่สามารถตรวจวัดได้ (Not Detecable)

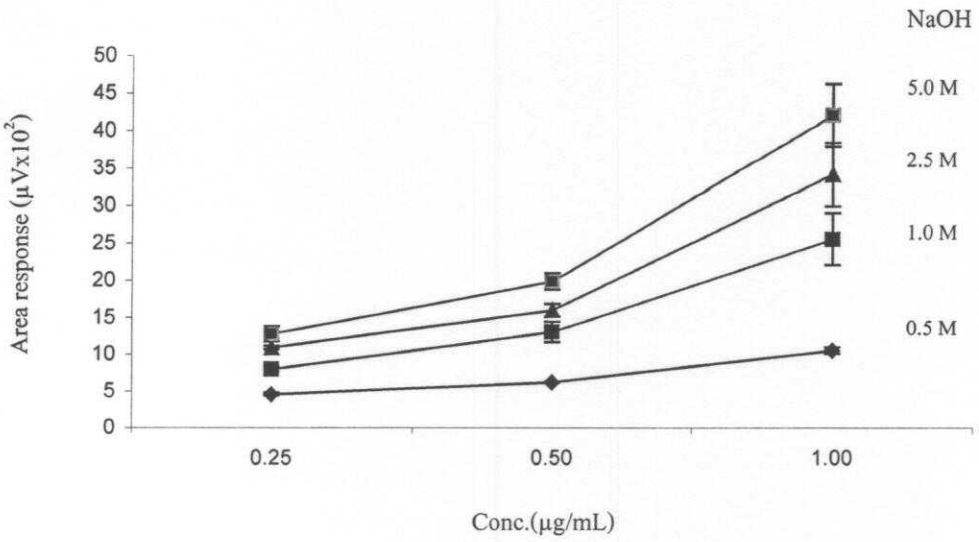


ภาพที่ 4.11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, และ 1.00 ไมโครกรัมเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, และ 1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารสกัดได้แก่ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน และ บิวทิลอะซิเตท

4.3.3 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นของด่างแก่โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสม สำหรับการสกัดได้แก่ 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 โมลาร์ โดยวัดพื้นที่ใต้กราฟของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่เติมลงในปัสสาวะ 3 ความเข้มข้นโดยสกัดความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ คือ 0.25, 0.50 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อตรวจวัดให้กราฟแยกออกมาที่เวลา 3.460 นาที ผลการศึกษาหาความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมแสดง ดังตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.12 จากผลการทดลองความเข้มข้นที่ 5.0 โมลาร์ ให้พื้นที่ใต้กราฟสูงในทุกความเข้มข้น ดังนั้นความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ 5.0 โมลาร์ จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ

ตารางที่ 4.4 ผลของการเติมสารละลายความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์ค่าต่างๆ ลงในสารสกัดสารละลายเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ใน Spike Urine Sample

ความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์(µg/mL)	ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ (โมลาร์) พื้นที่ใต้กราฟ (ค่าเฉลี่ย ± SD)			
	0.50	1.00	2.50	5.00
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
0.25	455.57 ± 19.08	771.00 ± 22.54	1088.47 ± 22.64	1215.60 ± 8.49
0.50	616.10 ± 7.70	1204.27 ± 44.29	1617.87 ± 57.37	1921.50 ± 23.33
1.00	1051.60 ± 35.87	2222.47 ± 30.87	2999.60 ± 50.00	4443.70 ± 58.69

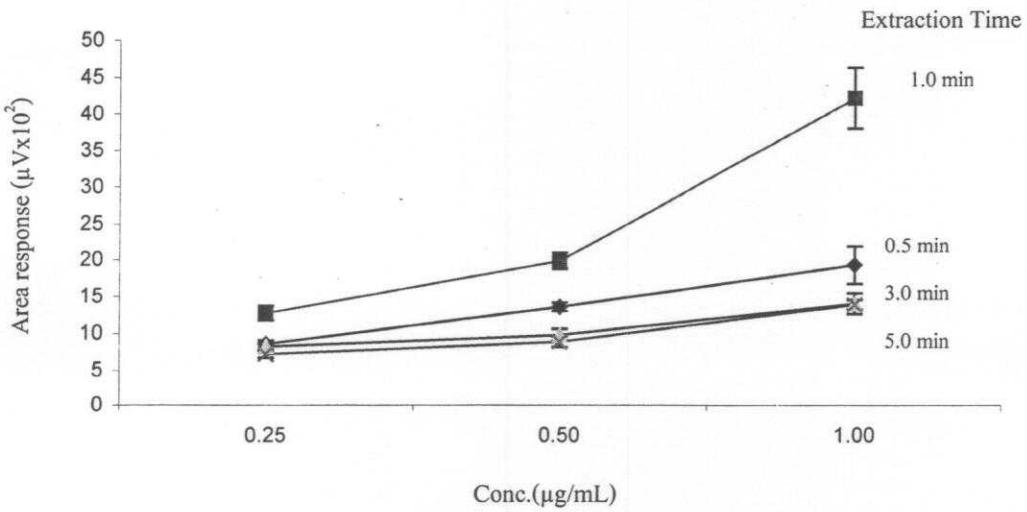


ภาพที่ 4.12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, และ 1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ได้แก่ 0.5, 1.0, 2.5 และ 5.0 โมลาร์

4.3.4 ผลการศึกษาหาเวลาการสกัดที่เหมาะสมสำหรับการสกัด ได้แก่ 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 นาที โดยวัดพื้นที่ใต้กราฟของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ที่เติมลงในปัสสาวะ 3 ความเข้มข้นโดยสกัดความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ คือ 0.25, 0.50 และ1.0ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อตรวจวัดให้กราฟแยกออกมาที่เวลา 3.460 นาที ผลการศึกษาหาเวลาการสกัดที่เหมาะสมแสดงดังตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.13 จากผลการทดลองที่เวลา 1.0 นาที ให้พื้นที่ใต้กราฟสูงในทุกความเข้มข้น สามารถสกัดเมทแอมเฟตามีนและให้ผลการตรวจวัดในระดับความเข้มข้นต่ำได้ ดังนั้นเวลา 1.0 นาที จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ

ตารางที่ 4.5 ผลของเวลาที่ใช้ในการสกัดสารละลายเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ใน Spike Urine Sample

ความเข้มข้นของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์(µg/mL)	เวลาที่ใช้ในการสกัด (นาที) พื้นที่ใต้กราฟ(ค่าเฉลี่ย ± SD)			
	0.50	**1.00**	**3.00**	**5.00**
	Mean ± SD	**Mean ± SD**	**Mean ± SD**	**Mean ± SD**
0.25	832.95 ± 1.34	1215.60 ± 8.49	691.50± 3.53	819.85 ± 8.84
0.50	1145.80± 61.66	1921.50± 23.33	934.80± 8.91	847.35 ± 32.74
1.00	1937.05± 45.33	4443.70 ± 58.69	1433.50± 47.38	1355.60 ± 39.31



ภาพที่ 4.13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, และ 1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้เวลาในการสกัดได้แก่ 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 นาที

4.4 สภาวะที่เหมาะสมของการทดลอง

4.4.1 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี หาสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีแสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

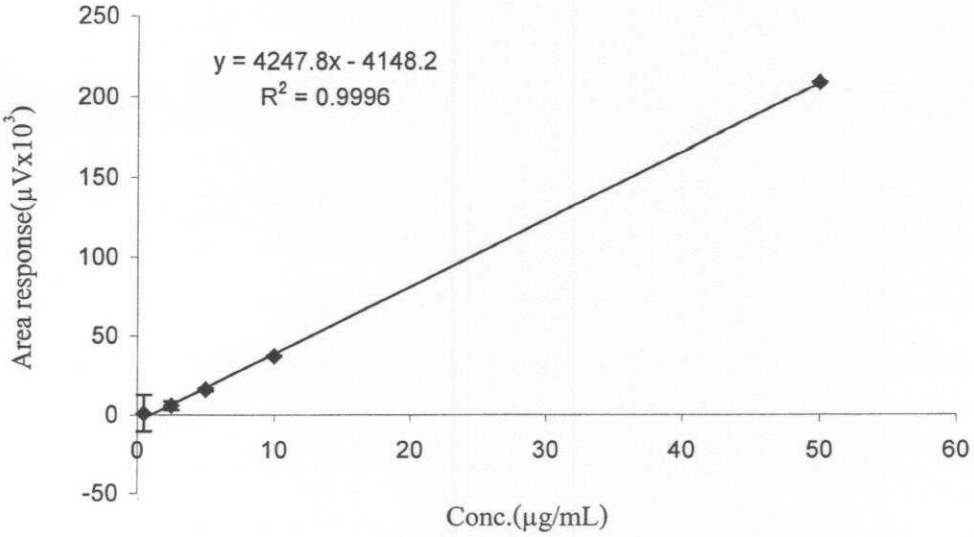
Parameters	Optimum condition
Column	Rtx - 5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm
t_i	250 °C
t_c	150 °C (initial temp.)
t_d	300 °C
Flow rate	0.8 mL/min

4.3.2 สภาวะที่เหมาะสมของการสกัด

นำตัวอย่างปัสสาวะปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร vortex เป็นเวลา 10 วินาที เติมสารไดคลอโรมีเทนปริมาตร 1 มิลลิลิตร vortex เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ดูดสารละลายส่วนใสฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเฟลมไอออไนเซชัน

4.5 ผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

4.5.1 Linear range และ Calibration curve โดยการเติมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟ - ตามีนไฮโดรคลอไรด์ลงในปัสสาวะ 5 ความเข้มข้น คือ 0.25, 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสกัดความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ จากความเป็นเส้นตรงได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9996 ดังแสดงในภาพที่ 4.14



ภาพที่ 4.14 ช่วงความเป็นตรงของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ในปัสสาวะ

4.5.2 จากการหาขีดจำกัดของการตรวจวัดสารเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ พบว่าความเข้มข้นของสารที่ทำการวิเคราะห์ให้ให้สัญญาณเป็น 3 เท่าของสัญญาณรบกวนและขีดจำกัดของการตรวจปริมาณวิเคราะห์ พบว่าความเข้มข้นของสารที่ทำการวิเคราะห์ให้สัญญาณเป็น 10 เท่าของสัญญาณรบกวน ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4.7 ซึ่งได้เคยมีการศึกษาการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเฮดสเปส ให้ค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดเมทแอมเฟตามีนได้ศึกษาไว้อยู่ในระดับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(ศิริพร, 2548) และได้มีการศึกษาค่าขีดจำกัดการตรวจวัดเมทแอมเฟตามีนได้ศึกษาไว้อยู่ในระดับ 0.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยการทำอนุพันธ์ TFA (United Nations, 1995) และได้มีการสกัดสารด้วยเทคนิคเฟสของเหลว วิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของเมทแอมเฟตามีน ได้ศึกษาไว้อยู่ในระดับ 0.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Moore, K.A, 2003) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลพบว่าวิธีที่ทำการวิเคราะห์ให้ sensitivity ที่ดี โดยไม่ต้องทำอนุพันธ์ของสารที่ต้องการวิเคราะห์และขีดจำกัดของการตรวจปริมาณวิเคราะห์ ซึ่งได้เคยมีการศึกษาการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเฮดสเปสให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดปริมาณวิเคราะห์ของการตรวจวัดเมทแอมเฟตามีนได้ศึกษาไว้อยู่ในระดับ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้มีการสกัดสารด้วยเฟสของเหลว วิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าขีดจำกัดการตรวจปริมาณวิเคราะห์ของการตรวจวัดของเมทแอมเฟตามีนได้ศึกษาไว้อยู่ในระดับ 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Moore, K.A, 2003) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลพบว่าวิธีที่ทำการวิเคราะห์ให้สภาพไว (sensitivity) ที่ดี โดยไม่ต้องทำอนุพันธ์ของสารที่ต้องการวิเคราะห์

ตารางที่ 4.7 ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการตรวจปริมาณวิเคราะห์

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (ppm)	
	LOD	LOQ
เมทแอมเฟตามีนเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์	0.0315	0.0625

4.5.3 ร้อยละการกลับคืนได้ (% Recovery)

ทำการวิเคราะห์ความถูกต้องของการวิเคราะห์ โดยเติมสารละลายมาตรฐานลงในสารตัวอย่าง 4 ระดับความเข้มข้น ทำการวิเคราะห์ซ้ำแต่ละระดับความเข้มข้นละ 7 ครั้ง ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4.8 ซึ่งได้เคยมีการศึกษาการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีได้ศึกษาไว้อยู่ในระดับ 80.65 – 108.95 % (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2549) ได้มีการสกัดด้วย SPME ทำงานร่วมกับ LC – ESI –MS ได้ศึกษาไว้อยู่ในระดับ 81 % ร้อยละการกลับคืนได้ ได้ศึกษาไว้อยู่ในระดับ 78 % ด้วยการทำอนุพันธ์ด้วย NQS (Yi, H. and Youn – Jung, K, 2009) ร้อยละการกลับคืนได้ ได้ศึกษาทั้งก่อนและหลังการสกัดไว้อยู่ในระดับ 107 ± 8 % โดยเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของเหลว วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Moore, K.A, 2003) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลพบว่า วิธีที่ทำการวิเคราะห์ให้สภาพไว (sensitivity) ที่ดีโดยไม่ต้องทำอนุพันธ์ของสารที่ต้องการวิเคราะห์

ตารางที่ 4.8 ค่าร้อยละการกลับคืนได้ของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์

สาร	ระดับความเข้มข้นที่เติมลงไป (ppm)	Mean ± SD	% RSD	% Recovery
เมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์	2.50	2.34 ± 0.08	3.42	93.60
	5.00	4.67 ± 0.20	4.28	93.40
	10.00	9.65 ± 0.65	6.74	96.50
	50.00	50.09 ± 2.71	5.41	100.18

4.5.4 การหาค่าความเที่ยง

ทำการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ที่ 4 ระดับความเข้มข้นแต่ละความเข้มข้นฉีดซ้ำ 7 ครั้ง โดยทำการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intra day) และระหว่างวัน (inter day) ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 4.9 และ4.10 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.9 ความเที่ยงของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (intraday)

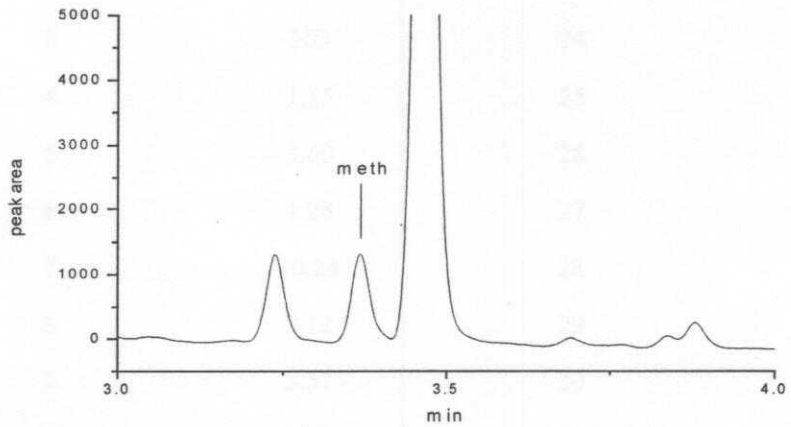
สาร	ระดับความเข้มข้นที่เติมลงไป (ppm)	Mean ± SD	% RSD	Horwitz's	HORRAT
เมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์	2.50	2.34 ± 0.08	3.42	9.29	0.37
	5.00	4.67 ± 0.20	4.28	8.37	0.51
	10.00	9.65 ± 0.65	6.74	7.50	0.90
	50.00	50.09 ± 2.71	5.41	5.86	0.92

ตารางที่ 4.10 ความเที่ยงของการวิเคราะห์ระหว่างวัน (interday)

สาร	ระดับความเข้มข้นที่เติมลงไป (ppm)	Mean ± SD	% RSD	Horwitz's	HORRAT
เมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์	2.50	2.76 ± 0.11	3.99	9.06	0.44
	5.00	4.98 ± 0.14	2.81	8.29	0.34
	10.00	9.69 ± 0.72	7.43	7.50	0.99
	50.00	54.33 ± 2.73	5.02	5.79	0.87

4.6 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะ

ทำการศึกษาหาปริมาณสารเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 42 ตัวอย่าง ตัวอย่างโครมาโทแกรมของผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.15 และสรุปดังตารางที่ 4.11



ภาพที่ 4.15 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์ปริมาณเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะ

ตาราง 4.11 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะ

ลำดับที่ตัวอย่าง	GC - FID	ลำดับที่ตัวอย่าง	GC - FID
	เมทแอมเฟตามีน (ppm)		เมทแอมเฟตามีน (ppm)
1	1.65	22	2.54
2	2.67	23	1.02
3	ND	24	4.66
4	1.15	25	10.35
5	3.60	26	1.55
6	1.28	27	11.26
7	10.24	28	4.04
8	5.12	29	5.87
9	5.57	30	12.59
10	1.10	31	4.19
11	ND	32	1.16
12	ND	33	3.47
13	ND	34	1.28
14	1.59	35	4.59
15	4.82	36	ND
16	4.41	37	5.09
17	2.12	38	4.62
18	2.43	39	1.45
19	3.74	40	1.08
20	7.63	41	1.05
21	11.05	42	1.75

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography) ตัวตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน (flame ionization) คอลัมน์ชนิด Rtx - 5 ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร โดยส่วนใหญ่สารเมทแอมเฟตามีนจะถูกขับออกมาในรูปเดิมทางปัสสาวะ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกของโครมาโทแกรม เมื่อพิจารณาพีคที่ได้ค่ากำลังในการแยก (resolution) และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโครมาโทแกรมของเมทแอมเฟตามีน คือ อุณหภูมิของส่วนฉีดสาร (t_i) 250 $^{\circ}$C อุณหภูมิของคอลัมน์ (t_c) แบบโปรมแกรมอุณหภูมิ (temperature program) อุณหภูมิเริ่มต้น 150 $^{\circ}$C คงที่ ณ อุณหภูมินี้ 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจนถึง 260 $^{\circ}$C ด้วยอัตราการเพิ่ม 20 $^{\circ}$C จนถึง 260 $^{\circ}$C คงที่ ณ อุณหภูมินี้ 3.5 นาที อุณหภูมิของตัวตรวจวัด (t_d) 300 $^{\circ}$C อัตราการไหลของแก๊ส 0.8 มิลิลิลิตรต่อนาที การฉีดสารแบบ splitless ปริมาตรในการฉีดสาร 1 ไมโครลิตร รวมเวลา 10 นาที

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดด้วยเฟสของเหลว สารเมทแอมเฟตามีนเป็นสารที่ออกฤทธิ์ที่สำคัญในยาบ้า เนื่องจากเมทแอมเฟตามีนเป็นสารที่มีขั้วละลายน้ำได้ดีจึงถูกขับออกมากับปัสสาวะได้ จึงต้องทำให้อยู่ในรูปของด่างอิสระ (free base) คือการเติมโซเดียไฮดรอกไซด์ เพื่อลดความสามารถในการละลายน้ำ ทำให้เมทแอมเฟตามีนละลายในชั้นไดคลอโร มีเทน ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะได้ดี เนื่องจากเป็นสารที่ไม่มีขั้ว จึงสามารถแยกออกจากปัสสาวะและตรวจวัดได้และให้ผลการกลับคืนดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบสารละลายอื่นๆ ที่ใช้ในการสกัด คือ บิวทิลอะซิเตทและเฮกเซนและทำการผสมสารด้วยเครื่อง vortex ให้ผลการทดลองดีที่สุด จากการศึกษาหากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เติมลงไปมีความแรงไม่เพียงพอ จะทำให้ยาบ้าส่วนหนึ่งยังละลายอยู่ในชั้นน้ำปัสสาวะ ดังนั้นการปรับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากมีผลต่อการแตกตัวเป็นไอออนของเมทแอมเฟตามีน ซึ่งสามารถแตกตัวได้ดีในสารละลายที่ pH ต่ำหรือสภาวะเป็นกรดสูง ทำให้เกิดการสูญเสียไปกับการสกัดและเมทแอมเฟตามีนจะแตกตัวได้ลดลงในสารละลายที่ pH สูงหรือสภาวะที่เป็นเบสเพิ่มขึ้น จากการศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5.0 โมลาร์ ให้ผล

การสกัดดีที่สุดและเวลาที่ใช้ในการสกัด พบว่าที่ 1.0 นาที ให้ผลการทดลองดีที่สุดและเมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นพบว่า สารเกิดอิมัลซันไม่สามารถแยกชั้นได้

งานวิจัยนี้จะศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยทำการทดลองหาช่วงความเป็นเส้นตรง ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด ขีดจำกัดของการตรวจปริมาณวิเคราะห์ ร้อยละการกลับคืนได้ และความเที่ยงของการวิเคราะห์

ในการศึกษาหาความเป็นเส้นตรงช่วงความเป็นเส้นตรงของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.25 - 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์ คือ 0.9996 ค่าขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัดของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0.0312 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดจำกัดของการตรวจปริมาณวิเคราะห์ ค่าขีดจำกัดของการตรวจปริมาณวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนที่ความเข้มข้น 0.0632 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร้อยละการกลับคืนได้ ความถูกต้องของการวิเคราะห์พิจารณาจากร้อยละการกลับคืนได้พบว่าสารเมทแอมเฟตามีนมีค่าร้อยละการกลับคืนได้อยู่ในช่วง 93.4 - 100 % ความเที่ยงของการวิเคราะห์ จากการศึกษาทำการทดลองภายในวันเดียวกันและระหว่างวันให้ค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์ในช่วง 3.41 - 6.73 และ 2.81 - 7.43 ตามลำดับ และคำนวณจาก Horwitz's equation และ HORRAT (Horwitz's ratio) ตามที่ระบุใน The AOAC manual for the Peer Verified Methods program (1993) ให้ค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์ในช่วง 5.85 - 9.25 และ 3.13 - 9.00 ตามลำดับและ HORRAT อยู่ในช่วง 0.37 - 0.92 และ 0.34 - 0.99 ตามลำดับซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับได้

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

กรมการแพทย์. คู่มือแนวทางการดำเนินงานแก้ไขปัญหาการแพร่ระบาดของยาบ้าด้านการแพทย์และสาธารณสุข. นนทบุรี : กองประสานงานปฏิบัติการบำบัดรักษาผู้ติดยาและเสพติด กรมการแพทย์, 2542.

_____. รายงานการประชุมสัมมนาการป้องกันและแก้ไขปัญหายาเสพติดในสถานศึกษา. นนทบุรี : กองวิเคราะห์ยาเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2542.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ : กระทรวงสาธารณสุข, 2549.

เกษศิรินทร์พร กูลเกื้อ และวีระชัย สมัย. การตรวจวัดเมทแอมเฟตามีนในพลาสมาคนโดยใช้ GC - FID. สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2009.

ชญานิศ ศรชัยธวัชวงศ์. การวิเคราะห์แอมเฟตามีน เมทแอมเฟตามีนและอีเฟดรีนในปัสสาวะด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรเมตรีที่ใช้การสกัดแบบไอออนแพร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหบัณฑิต : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2001.

ธานี ทองโรจน์, วีระศักดิ์ สามี และนริศา คำแก่น. การจัดทำสารละลายมาตรฐานแห่งชาติของตัวยาเมทแอมเฟตามีน. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี : มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต, 2553.

นพรัตน์ รัตนวราภรณ์. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเมทแอมเฟตามีนในของกลาง. ชลบุรี : ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ชลบุรี, 2552.

นพาภรณ์ ปัญจะ. "การตรวจยืนยันยาบ้าในปัสสาวะ", วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 38(2): 69 - 80, 2539.

ปกรณ์ น้อยประเสริฐ และชานิดา จุ้ยเจริญ. "การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจยาบ้าในปัสสาวะโดยวิธีต่างๆ", วารสารการแพทย์เขต 4. 19(1): 15-20, 2543.

ประคอง นางาม และนภสพง ช่างสนิท. การตรวจพิสูจน์ Methamphetamine และ Amphetamine ในปัสสาวะโดยวิธี Gas Chromatograph. ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุบลราชธานี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2544.

พงษ์รักษ์ ศรีบัณฑิตมงคล. "ผลการเติมสารแปลกปลอมหรือการปรับความเป็นกรดด่างในปัสสาวะต่อการตรวจหาเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะของผู้เสพยาบ้า", วารสารการแพทย์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2543.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

พัฒนศักดิ์ เพิ่มพูน, วรศักดิ์ อินทร์ชัย และศศิธร สุกรีฑา. ทดสอบความถูกต้องของวิธีการตรวจเอกลักษณ์สารเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยเทคนิค SPME - GC. นครราชสีมา : ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์นครราชสีมา, 2550.

แม้น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม. Principles and Thechniques of Instrumental Analysis. ภาควิชาเคมีคณะวิทยาศาสตร์ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2535.

วิโรจน์ สุ่มใหญ่. ยาบ้ามหันตภัยข้ามสหัสวรรษ. กรุงเทพมหานคร : ธีระการพิมพ์, 2543.

วีรวรรณ เล็กสกุลไชย. "ปัจจัยต่อผลการตรวจยาบ้าด้วยชุดน้ำยาตรวจยาบ้าในปัสสาวะ", วารสารวิชาการสาธารณสุข. 14(1): 67 - 75, 2548.

วรางค์ บุญช่วย และดวงพร อภิกันตพันธ์. คู่มือการตรวจหายาบ้า ยาอีในปัสสาวะ. กองวัตถุยาเสพติด : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2541.

ศิริพร ทองประกายแสง. การพัฒนาวิธีตรวจเอกลักษณ์แอมเฟตามีนและอนุพันธ์ของแอมเฟตามีนในปัสสาวะพร้อมกันโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี หน่วยตรวจวัดชนิดไนโตรฟอสฟอรัส. นครสวรรค์ : ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์นครสวรรค์, 2548.

สุภาพรรณ ทีฆะสุข. การหาปริมาณสารเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะโดยใช้เทคนิคเฮดสเปสแก๊สโครมาโทกราฟีตัวตรวจวัดเฟลมไอออนเซซันและไนโตรเจนฟอสฟอรัส. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยบูรพา, 2548.

สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการและสำนักยาและวัตถุยาเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการตรวจพิสูจน์สารเสพติดทางห้องปฏิบัติการ. นนทบุรี : โรงพิมพ์องค์การรับสั่งพิมพ์และพัสดุ, 2547.

Ac, Moffat and et al. Clarke's isolation and identification of drug in pharmaceutical, body fluids, And post - mortem material. London: Pharmaceutical Press, 1986.

Adriaan, A.s., Marais, J. and Laurens, B. "rapid GC - MS confirmation of amphetamines In urine by extractive acylation", Forensic Science International. 183: 76 - 78, 2009.

Hiroyuki, I. and et al. "Simple and Simultaneous detection of methamphetamine and Dimethyl sulfone in crystalline methamphetamine seizures by fast Gas Chromatography", Forensic Toxicol. 26: 19-22, 2008.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

พุทธรักษา วรานุศุภากุล. "เทคนิคการแยก", การแยกสาร. http://www.mis.sc.chula.ac.th/Chem ii10.ppt. มีนาคม, 2553.

กระทรวงสาธารณสุข. "วัตถุยาเสพติด", ยาเสพติดให้โทษ. http://www.fda.moph.go.th/fda-net/html/product/addict/narcotics2/meth.html. มีนาคม, 2553.

สุภาพร สุรินทราช. "การตรวจหาเมทแอมเฟตามีนในคราบปัสสาวะ", เมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ. http://www.riclib.nrct.go.th/abs/abe20416.pdf. มีนาคม, 2553.

Kataoka, H., Lord, H.L. and Pawliszyn, J. "Simple and rapid determination of amphetamine Methamphetamine and their methylenedioxy derivatives in urine by automated In-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography electrospray Ionization mass spectrometry", Journal of Analytical Toxicology. 24: 257 - 265, 2000.

Kiel, J.S., Morgan, S.L. and Abramson, R.K. "Effects of amine modifiers on retention and Peak shape in reversed - phase high performance liquid chromatography", Journal of Chromatography. 320: 313 - 323, 1985.

Lillsunde, P. and Korte, T. "Comprehensive drug screening in urine using solid - phase extraction And combined TLC and GC-MS identification", Journal of Analytical Toxicology. 15: 71 - 81, 1997.

Manami, N. and et al. "Miniaturized sample preparation method for determination of amphetamines In urine", Forensic Science International. 143: 163 - 167, 2004.

Mauri-Aucejo, A.R. and et al. "Fluorimetric determination of amphetamine in urine by flow Injection with on-line liquid - liquid extraction", Microchemical Journal. 69: 199 - 204, 2001.

Ming,R.F., Ti,Y.W. and Tzuen,Y.L. "Determination of amphetamine and methamphetamine in urine by solid phase extraction and ion - pair liquid chromatography - electrospay Tandem mass spectrometry", Talanta. 68: 987 - 991, 2006.

Moore, K.A. Amphetamine/sympathomimetic Amine In Principles of Forensic Toxicology 2nd Ed. Washington D.C.: AACC, 2003.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Myung, S. and et al. "Determination of amphetamine, methamphetamine and dimethamphetamine In human urine by solid - phase microextraction (SPME) gas chromatography/mass Spectrometry", Journal of Chromatography B. 716: 359 - 365, 1998.

Sterk, U. and Kulpmann, W.R. "High - temperatrure solid-phase microextraction procedure for the Detection of drug by gas chromatography-mass spectrometry", Journal of Chromatography B. 745: 399 - 411, 2000.

Takeshi, S. and et al. "Rapid simultaneous determination of ephedrines, amphetamines, cocaine, Cocaine metabolites, and opiates in human urine by GC - MS", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 43: 358 - 363, 2007.

Tsuchihashi, H. and et al. "Headspace gas chromatography of stimulants in urine by in - column Trifluoroacetyl derivatization method", Journal of Chromatography. 467: 227 - 235, 1989.

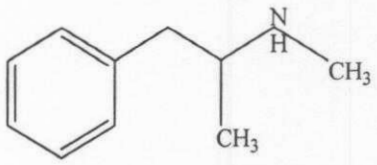
Talwar, D. Watson, D. and Stewart, M.J. "Routine analysis of amphetamine class drug as their Naphthaquinone derivatives in human urine by high performance liquid Chromatography", Journal of Chromatography B. 735: 229 - 241, 1999.

United Nations. Recommended method for the detection and assay of cocaine, amphetamine Methamphetamine and ring - substituted amphetamine derivatives in biological Specimens. New York: United Nations, 1995.

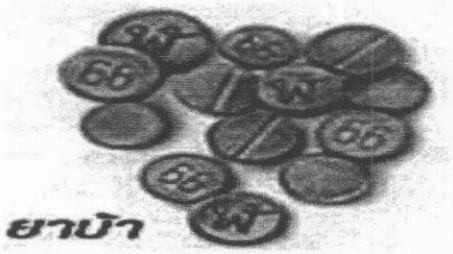
Yi, H. and Youn - Jung, K. "Single drop liquid - liquid - liquid microextraction Of methamphetamine And amphetamine in urine", Journal of Chromatography A. 183: 78 - 86, 2009.

ภาคผนวก

ภาคผนวก



Methamphetamine ($C_{10}H_{14}N$)
น้ำหนักโมเลกุล 149.2



ลักษณะของเม็ดยาบ้า

การคำนวณ

1. ตัวอย่างการคำนวณน้ำหนักสารเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ เพื่อใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ สูตรโมเลกุล $C_{10}H_{15}NHCl$ น้ำหนักโมเลกุล 185.7
เมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ หนัก 185.7 กรัม ประกอบด้วยเมทแอมเฟตามีน = 149.2

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

$= 0.8034$ กรัม

เนื่องจากความบริสุทธิ์ของเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ = 99.0 %

ดังนั้นเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ หนัก 1 กรัม จะมีเนื้อสารเมทแอมเฟตามีน

$$= \frac{0.8034 \; x \; 99.0}{100}$$

$$= 0.7953 \text{ กรัม}$$

เมทแอมเฟตามีน 0.8025 กรัม มีสารเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ 1 กรัม

ถ้าต้องการเมทแอมเฟตามีน 0.0025 กรัม จะต้องมีสารเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์

$$= \frac{0.0025 \; x \; 1}{0.7953}$$

$$= 0.0031 \text{ กรัม}$$

ดังนั้น ชั่งเมทแอมเฟตามีไฮโดรคลอไรด์ 0.0031 กรัม ละลายด้วยไดคลอโรมีเทน ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

สารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ สำหรับ spiked urine sample

ชั่งเมทแอมเฟตามีไฮโดรคลอไรด์ 0.0031 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

2. การเตรียมเจือจางสารละลาย

ในการเจือจางสารละลายใช้สมการ

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \qquad \text{(ก.1)}$$

C_1 = ความเข้มข้นสารละลายก่อนเจือจาง

V_1 = ปริมาตรสารละลายก่อนเจือจาง

C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายหลังเจือจาง

V_2 = ปริมาตรสารละลายหลังเจือจาง

การเตรียมสารละลายเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 25 มิลลิลิตร จากสารละลายเมทแอมเฟตามีนไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 100.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรคำนวณจาก

C_1 = 100.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร V_1 = ?

C_2 = 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร V_2 = 25 มิลลิลิตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(100.0 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร})\, V_1 = (1.0 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร})(25 \text{ มิลลิลิตร})$$

$$V_1 = \frac{(1.0 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร})(25 \text{ มิลลิลิตร})}{(100.0 \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร})}$$

$$V_1 = 0.25 \text{ มิลลิลิตร}$$

3. การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

โมลาร์/ molar = จำนวนโมลของตัวถูกละลายในสารละลายปริมาตร 1 ลิตร

$$\text{จำนวนโมล} = \frac{\text{น้ำหนักของสาร(กรัม)}}{\text{น้ำหนักโมเลกุล}}$$

โซเดียมไฮดรอกไซด์ สูตรโมเลกุล NaOH น้ำหนักโมเลกุล 40 กรัม

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. การคำนวณ % Recovery

$$\%\text{ Recovery} = \frac{(C1-C2)\,x\,100}{C3}$$

C1 = ความเข้มข้นของสารใน spiked metric blank

C2 = ความเข้มข้นที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐาน (blank)

C3 = ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานที่เติม

การหา % recovery ของวิธีวิเคราะห์โดยเติมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีไฮโดรคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ 7 ซ้ำ มีผลการทดลอง ดังนี้ 2.50, 2.42, 2.36, 2.25, 2.44, 2.39, 2.23 และ 2.31

ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ 7 ซ้ำ = 2.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

$$\% \text{ recovery} = \frac{(C1-C2)x\ 100}{C3}$$

C1 = ความเข้มข้นของสารใน spiked metric blank = 2.34 มิลลิกรัมต่อลิตร

C2 = ความเข้มข้นที่ไม่เติมสารละลายมาตรฐาน (blank) = 0 มิลลิกรัมต่อลิตร

C3 = ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานที่เติม = 2.50 มิลลิกรัมต่อลิตร

$$\% \text{ recovery} = \frac{(2.34 - 0)\ x\ 100}{2.50}$$

$$= 93.6\ \%$$

5. การคำนวณค่าความเที่ยง มี 3 วิธี

ในการทดลองได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้ ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยที่วิเคราะห์ 7 ซ้ำ คือ 2.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน คือ 0.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีคำนวณ

5.1 $\% \text{ RSD} = \frac{SD\ x\ 100}{\overline{X}}$

$$\% \text{ RSD} = \frac{0.08\ x\ 100}{2.34}$$

$$= 3.41$$

5.2 คำนวณจาก Horwitz's equation และ HORRAT (Horwitz's ratio) ตาม AOAC manual for the Peer Verified Methods program (1993) Horwitz equation

Horwitz' s equation

สำหรับ reproducibility: % RSD = $2^{(1-0.5 \log C)} = 2C^{-0.1505}$

สำหรับ repeatability: % RSD = $0.66 \times 2^{(1-0.5 \log C)} = 0.66 \times 2C^{-0.150}$

โดย C เป็น concentration ratio (ไม่มีหน่วย)

Horwitz's eqation

% RSD = $0.66 \times 2 \times C^{-0.1505}$ $(C = 2.34 \times 10^{-6})$

= $0.66 \times 2 \times (2.34 \times 10^{-6})^{-0.1505}$

= 9.25

5.3 HORRAT หรือ Horwitz' s ratio คือ อัตราส่วนระหว่างค่า RSD ที่คำนวณได้จากผลการทดลอง(RSD_{obs})กับค่า RSD ที่คำนวณจาก Horwitz' s equation ($RSD_{expectd}$)

สำหรับ repeatability: HORRAT = $\frac{RSD_{obs}}{RSD_{expected}}$

= $\frac{3.41}{9.25}$

= 0.36

6. การคำนวณหาปริมาณเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ

จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง ได้ค่าพื้นใต้พีค = 39356.1 แทนค่าในสมการเส้นตรง

จากสมการ y = 4247.8x - 4148.2

39356 = 4247.8x - 4148.2

x = 10.24

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	ร้อยตำรวจเอกหญิงราตรี ศิริชัย
ประวัติการศึกษา	มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี พ.ศ. 2542-2546 วิทยาศาสตรบัณฑิต(เคมี)
ประวัติการทำงาน	2547 รองสารวัตร วิทยาการ จังหวัดภูเก็ต 2548 รองสารวัตร งานอำนวยการ วิยาการเขต 44 2549 นักวิทยาศาสตร์(สบ1)กลุ่มงานตรวจสถานที่เกิดเหตุและถ่ายภาพ วิทยาการเขต22 2552 - ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์(สบ1) พิสูจน์หลักฐาน จังหวัดอุบลราชธานี
ตำแหน่งและสถานที่ทำงานปัจจุบัน	นักวิทยาศาสตร์(สบ1) พิสูจน์หลักฐาน จังหวัดอุบลราชธานี โทรศัพท์ (045)244495