หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการ

3.1 เครื่องมือ

3.1.1 เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนส์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี่ (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ของ Water Associates ประกอบด้วย

Universal Liquid Chromatography Injector : Model U 6 K,

Solvent Delivery System Isocratic Chromatographic Pump : Model 6000 A,

Ultraviolet Detector Fixed Wavelength 250, 284 nm : Series 440,

Recorder : Omni Scribe B-5000 Strip Chart Recorder

Column : μ Bondapak C_{18} ความยาว 30 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3.9 มิลลิเมตร

วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ เมทธานอล : น้ำ เท่ากับ 30 : 70 มี 1-เฮปเทนซัลโฟนิคแอซิด (1-heptane Sulfonic Acid หรือ Pic B-7) 0.005 โมลาร์ เป็นบัฟเฟอร์ (66)

อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 0.6 - 1.0 มิลลิลิตร/นาที

หน่วยการดูดกลืนแสงเต็มสเกล (Absorbance Unit Full Scale, AUFS) เท่ากับ .01 - .05 ตามความเหมาะสม

3.1.2 เครื่องระเหยสูญญากาศ (Vacuum Evaporator)

3.1.3 เครื่องเซนตริฟิวจ์ (Contrifuge)

3.1.4 เครื่องไล่แกสออกจากสารละลาย (Brasonic Bath) ใช้ไล่แกสในตัวทำละลายที่ใช้กับเครื่อง HPLC

3.1.5 เครื่องกรองระบบสูญญากาศ ใช้กรองตัวทำละลายที่ใช้กับเครื่อง HPLC

3.1.6 เครื่องอังน้ำไฟฟ้า (Water Bath) ชนิดปรับอุณหภูมิได้

3.1.7 เครื่องนึ่งอัด (Autoclave)

3.1.8 เอนซัยม์มัลติพลายอิมมูโนแอสเสเทคนิค

(Enzyme Multiplied Immunoassay Technique, EMIT)

ของ Syva Co. ประกอบด้วย

3.1.8.1 ปิเปตทำให้เจือจาง (Pipette Diluter) : Model 1500

ปริมาตรสารตัวอย่างที่ดูด 50 ไมโครลิตร

ปริมาตร์สารที่ปล่อย (Delivery Volume) 300 ไมโครลิตร

(รวมบัฟเฟอร์ 250 ไมโครลิตร)(47)

3.1.8.2 สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) : Gilford Starsar III

วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร

อุณหภูมิ 37°C

ความดัน 7-9 นิ้วปรอท เวลาที่ใช้ในการดูดสารเข้าสู่ไมโคร-

โฟลเซลล์ (micro flow cell) ของสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

เท่ากับ 0.3 วินาที (47)

3.1.8.3 เครื่องพิมพ์ผล (Printer) : Syva CP-5000 EMIT ® Clinical Processor

เวลาก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น (Delay Time)

เท่ากับ 10 วินาที

ช่วงเวลาที่วัดความเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสง

(Measure Time) เท่ากับ 40 วินาที (47)

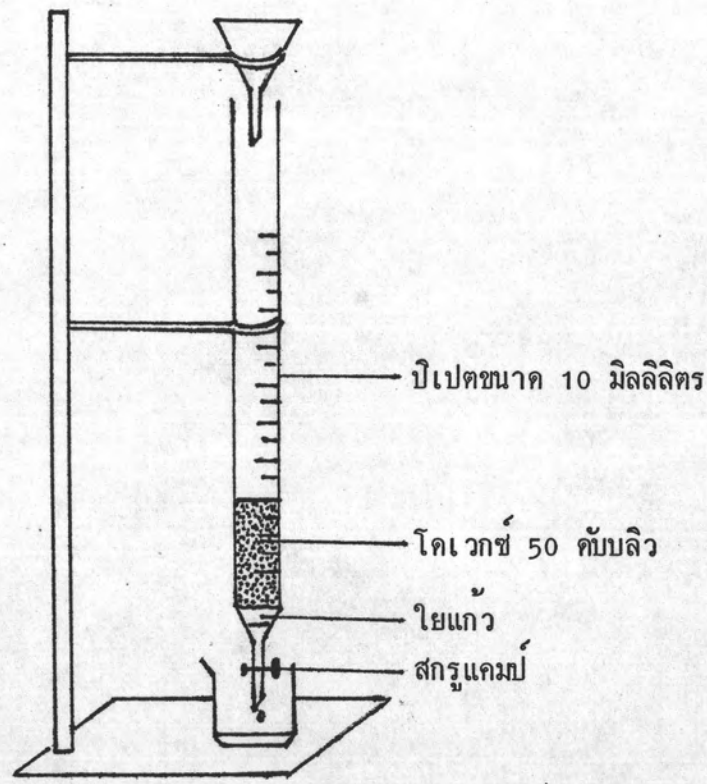
3.2 <u>วัสดุอุปกรณ์</u>

3.2.1 คอลัมน์แก้วใช้บรรจุ โดเวกซ์ 50 ดับบลิว

ประยุกต์จากปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร ตัดปลายบนให้เรียบ ดึงปลายล่างให้เรียว

เพื่อสอดสายยาง และใช้สกรูแคบป์หนีบสายยางเพื่อปรับอัตราการไหลของ

สารละลายผ่านคอลัมน์ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 แสดงคอลัมน์ประยุกต์จากปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร เพื่อบรรจุโคเวกซ์ 50 ดับบลิว

3.2.2 ใยแก้ว (Glass Wool)

3.2.3 กรวยแก้วขนาดเล็ก

3.2.4 กรวยแยก (Separator) ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.2.5 บีกเกอร์ ขนาด 25 50 125 มิลลิลิตร

3.2.6 ขวดสำหรับระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ

3.2.7 หลอดแก้วชนิดมีฝาเกลียว

3.2.8 กระดาษกรองชนิดแยกชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ (Phase Separating Filter Paper)

3.2.9 ไซริงค์ขนาดเล็กชนิดปรับปริมาตรได้โดยละเอียด (Microsyringe) ใช้ฉีดสารตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC ขนาด 10 25 และ 100 ไมโครลิตร

3.3 สารเคมี

3.3.1 โดเวกซ์ 50 ดับบลิว (Dowex 50 W)
Hydrogen form, 4% cross link, Dry mesh 100-200, ความชื้น 69%

3.3.2 เอธิลแอลกอฮอล์

3.3.3 เมทธานอล

3.3.4 กรดเกลือเข้มข้น (ความเข้มข้น 37% น้ำหนัก/น้ำหนัก)

3.3.5 แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (ความเข้มข้น 29.9% น้ำหนัก/น้ำหนัก)

3.3.6 6 นอร์มัล สารละลายกรดเกลือ
เจือจาง กรดเกลือเข้มข้น 51 มิลลิลิตร ด้วยน้ำจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.3.7 0.5 นอร์มัล สารละลายกรดเกลือ
เจือจาง กรดเกลือเข้มข้น 42.5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

3.3.8 0.5 นอร์มัล สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์
เจือจาง แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 37.2 มิลลิลิตร ด้วยน้ำจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

3.3.9 1 นอร์มัล สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์
ละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร

3.3.10 0.9% สารละลายโซเดียมคลอไรด์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 9 กรัมในน้ำ 1000 มิลลิลิตร

3.3.11 คลอโรฟอร์ม : ไอโสโพรพานอล (3 : 1)

ผสมคลอโรฟอร์ม 3 ส่วน กับ ไอโสโพรพานอล 1 ส่วน โดยปริมาตร

3.3.12 วัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้กับ HPLC

เมทธานอล : น้ำ (30 : 70) โดยปริมาตร เติม 1-เฮบเทนซัลโฟนิคแอซิด ให้ได้ 0.005 โมลาร์

3.3.13 สารเคมีที่ใช้กับ EMIT : เป็นน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Syva (47) ประกอบด้วย

3.3.13.1 EMIT DAU Buffer Solution

ก่อนใช้ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า จะได้ 0.025 โมลาร์ Tris maleate buffer พีเอช 6.0 เมื่อเจือจางแล้วจะมีอายุการใช้งาน 1 เดือน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.3.13.2 EMIT Bacteria Suspension

เป็นแบคทีเรียชนิดไม่ก่อโรค (Nonpathogenic bacteria) ชื่อ *Micrococcus luteus* ลักษณะเป็นผงแห้ง ก่อนการทดลอง 12 ชั่วโมง ให้ละลายแบคทีเรียผงแห้งนี้ 1 หลอด (75 มิลลิกรัม) ด้วยบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 (จากข้อ 3.3.13.1) 100 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ จนเป็น แบคทีเรียแขวนแขวนตะกอน (Bacteria Suspension) เก็บที่อุณหภูมิ 2-8℃ เมื่อละลายเป็นแบคทีเรียแขวนตะกอนแล้ว มีอายุการใช้งาน 7 วัน

บัฟเฟอร์เข้มข้น และแบคทีเรียผงแห้ง รวมเรียกว่า EMIT DAU Ancillary Reagent

3.3.13.3 EMIT Antibody Reagent A และ EMIT Enzyme Reagent B ทั้งสองมีลักษณะเป็นสารละลายสามารถใช้ได้ทันที เรียกรวมกันว่า EMIT Opiate Assay เก็บที่อุณหภูมิ 2-8℃

3.3.13.4 EMIT DAU Calibrator ประกอบด้วย

ก) Negative Calibrator

เป็นสารละลายปัสสาวะคนปกติซึ่งไม่มีมอร์ฟีนมาตรฐาน

ข) Low Calibrator

เป็นสารละลายปัสสาวะคนปกติ มีมอร์ฟีนมาตรฐานความเข้มข้น 0.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ค) Medium Calibrator

เป็นสารละลายปัสสาวะคนปกติ มีมอร์ฟีนมาตรฐานความเข้มข้น 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ทั้งสามนี้มีลักษณะเป็นผงแห้ง ก่อนใช้ต้องละลายด้วยน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 2-8°C เมื่อละลายแล้วมีอายุการใช้งาน 14 วัน

3.4 วิธีการ

3.4.1 การเก็บตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ป่วย

ตัวอย่างปัสสาวะเก็บจากผู้ป่วยที่เข้ารับการบำบัดรักษาในโรงพยาบาลธัญญรักษ์ เพื่องดเสพเฮโรอีน การเลือกผู้ป่วยทำโดยการคัดเลือกจากผู้ป่วยที่แจ้งว่าไม่ได้ใช้ยาอื่นก่อนเข้ารับการรักษา ไม่มีโรคแทรกซ้อน และให้ความร่วมมือดี จำนวน 5 ราย มีการซักประวัติและสัมภาษณ์พฤติกรรมการเสพเฮโรอีน แสดงในตารางที่ 8 หน้า 58

พยาบาลประจำตึกผู้ป่วยจะเป็นผู้เก็บตัวอย่างปัสสาวะ ระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างจะเก็บปัสสาวะวันละ 2 ครั้ง ในระยะ 2 วันแรกที่เข้ารับการรักษา คือ เวลาเช้า-เย็น วันต่อ ๆ ไปเก็บวันละ 1 ครั้งเวลาเช้าทุกวัน จนถึงเมื่อตรวจไม่พบสารเสพติดในปัสสาวะโดยวิธีทั้งสอง เวลาที่เสพครั้งสุดท้ายก่อนเข้ารับการรักษาได้จากการสัมภาษณ์ ดังนั้นปัสสาวะที่เก็บได้แต่ละครั้งจะนับเป็นช่วงเวลาหลังจากได้รับเฮโรอีนครั้งสุดท้าย

การวิเคราะห์จะทำในวันที่เก็บตัวอย่าง ถ้าไม่สามารถทำได้จะเก็บรักษา

ตัวอย่างโดยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

3.4.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีน

มอร์ฟีนมาตรฐานที่ใช้เป็น มอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ บี.พี. 1968 มีความบริสุทธิ์ 98% ได้จากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข

(1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานมอร์ฟีนเข้มข้น

ชั่งมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ 131.79 มิลลิกรัม ซึ่งสมมูลย์กับมอร์ฟีนเบส 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น จนครบ 100 มิลลิลิตร จะได้น้ำยามีความเข้มข้นของมอร์ฟีนมาตรฐาน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

(2) การเตรียมสารละลายมาตรฐานมอร์ฟีนเจือจาง สำหรับใช้สร้างกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนโดยวิธี HPLC

ใช้น้ำยาจาก 3.4.2(1) จำนวน 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยเมทธานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร จะได้น้ำยามีความเข้มข้นของมอร์ฟีนมาตรฐาน 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

(3) การเตรียมสารละลายมาตรฐานมอร์ฟีนเจือจาง สำหรับใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานมอร์ฟีนในปัสสาวะคนปกติ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนโดยวิธี EMIT

ใช้น้ำยาจาก 3.4.2(1) จำนวน 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร จะได้น้ำยามีความเข้มข้นของมอร์ฟีนมาตรฐาน 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3.4.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีน โดยวิธี HPLC

ฉีดสารละลายมาตรฐานมอร์ฟีนเจือจางจากข้อ 3.4.2(2) ในปริมาณต่าง ๆ เข้าเครื่อง HPLC ได้แก่ 5,6,7,8,9,10, 12,15,20,24,26 และ 30 ไมโครลิตร ซึ่งจะมีปริมาณมอร์ฟีนมาตรฐาน 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0, 2.4, 2.6 และ 3.0 ไมโครกรัม

ตามลำดับ แล้ววัดความสูงของพีค

เขียนกราฟมาตรฐาน ระหว่างปริมาณมอร์ฟีนมาตรฐานที่ฉีด (หน่วยเป็นไมโครกรัม) และความสูงของพีคที่วัดได้ (หน่วยเป็นเซนติเมตร)

3.4.2.2 การสร้างกราฟมาตรฐานของมอร์ฟีนโดยวิธี EMIT

ก) ใช้น้ำยาจาก 3.4.2(3) จำนวน 30, 100, 200, 300 และ 500 ไมโครลิตร เจือจางด้วยปัสสาวะคนปกติจนครบ 10 มิลลิลิตร จะได้ สารละลายมอร์ฟีนมาตรฐานในปัสสาวะคนปกติความเข้มข้น 0.3, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข) ใช้น้ำยาจาก 3.4.2(1) จำนวน 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 และ 1.0 มิลลิลิตร เจือจางด้วยปัสสาวะคนปกติ จนครบ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมอร์ฟีนมาตรฐานในปัสสาวะคนปกติความเข้มข้น 10, 20, 30, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

หมายเหตุ ปัสสาวะคนปกติ คือปัสสาวะของคนที่ไม่ได้รับสารในกลุ่มโอพิเอท แอลคาลอยด์ และตรวจโดยวิธี EMIT แล้วให้ผลการวิเคราะห์โอพิเอทเป็นลบ (negative)

นำสารละลายมอร์ฟีนมาตรฐานในปัสสาวะคนปกติ ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมนี้ มาวัดความเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 40 วินาที (ΔA) ด้วยวิธี EMIT (47) แล้วเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง ความเข้มข้นของมอร์ฟีนมาตรฐาน (หน่วยเป็น ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ ความเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 40 วินาที ซึ่งวัดโดยวิธี EMIT คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์ (Correlation Coefficient, γ) ระหว่างค่าทั้งสองดังนี้

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ $= \frac{n \Sigma x_i y_i - (\Sigma x_i)(\Sigma y_i)}{\sqrt{n \Sigma x_i^2 - (\Sigma x_i)^2} \sqrt{n \Sigma y_i^2 - (\Sigma y_i)^2}}$

เมื่อ x_i = ความเข้มข้นของมอร์ฟีนมาตรฐานในปัสสาวะคนปกติ (หน่วยเป็นไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

y_i = ความเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 40 วินาที ของสารละลายมอร์ฟีนมาตรฐานในปัสสาวะคนปกติความเข้มข้นต่าง ๆ วัดโดยวิธี EMIT

n = จำนวนตัวอย่างของสารละลายมอร์ฟีนมาตรฐานในปัสสาวะคนปกติ ซึ่งนำมาวัดความเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 40 วินาที โดยวิธี EMIT

3.4.3 ศึกษาประสิทธิภาพการเตรียมตัวอย่างก่อนนำมาวิเคราะห์หาคุณภาพและปริมาณโดยวิธี HPLC

3.4.3.1 ศึกษาเปอร์เซ็นต์ที่ได้สารคืน (% Recovery) ของมอร์ฟีนเมื่อสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraciton) ก่อนนำมาตรวจปริมาณด้วย HPLC

เปรียบเทียบการใช้ด่างชนิดต่าง ๆ ในการปรับ พีเอช ของสารละลายที่จะสกัด คือ

1) แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์อิ่มตัวด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนต (82)
2) แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (81)
3) โซเดียมไฮดรอกไซด์

<u>วิธีการ</u> 1) นำ 10 มิลลิลิตร เติมมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน สมมูลย์กับมอร์ฟีนเบส 500 ไมโครกรัม

2) ทำให้เป็นด่าง พีเอช 8.5 ด้วย แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์อิ่มตัวด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนต หรือ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์อย่างใดอย่างหนึ่ง

3) สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโสโพรพานอล (3:1) ครั้งละ 30 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

4) กรองชั้นคลอโรฟอร์ม : ไอโสโพรพานอล (3:1) ที่สกัดได้แต่ละครั้งผ่านกระดาษกรองชนิดแยกชั้น ซึ่งทำให้เปียกด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโสโพรพานอล (3:1) จำนวนเล็กน้อย

5) หยด 0.5 นอร์มัล สารละลายกรดเกลือ 1-2 หยด ระเหยแห้ง ละลายสิ่งตกค้าง (Residue) ที่ได้ด้วยเมทธานอล 5 มิลลิลิตร กรองหรือปั่นให้ใส

6) ดูดเอาแต่ส่วนใส ฉีดเข้า HPLC ในปริมาตรที่พอเหมาะ แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ที่ได้สารคืน (% Recovery)

$$\text{เปอร์เซ็นต์ที่ได้สารคืน} = \frac{\text{ปริมาณมอร์ฟีนที่วัดได้}}{\text{ปริมาณมอร์ฟีนที่มีอยู่จริง}} \times 100$$

3.4.3.2 ศึกษาเปอร์เซ็นต์ที่ได้สารคืน (% Recovery) ของมอร์ฟีน เมื่อใช้โดเวกซ์ 50 ดับบลิว ตามด้วยการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายเป็นขั้นตอนการทำสารให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาตรวจด้วยวิธี HPLC [(ประยุกต์ วิธีการ สกุลรัตน์ (81)]

<u>วิธีล้างโดเวกซ์ 50 ดับบลิว</u> (81)

ชั่ง โดเวกซ์ 50 ดับบลิว ประมาณ 30 กรัม

↓

ล้างด้วย 0.5 นอร์มัล สารละลายกรดเกลือ 100 มิลลิลิตร

↓

ล้างด้วยน้ำกลั่น ประมาณ 20 มิลลิลิตร

↓

ล้างด้วย 0.5 นอร์มัล สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์

100 มิลลิลิตร

↓

ล้างด้วยน้ำกลั่น ประมาณ 20 มิลลิลิตร

↓

ล้างด้วย 0.9% สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 20 มิลลิลิตร

↓

ล้างด้วยน้ำกลั่น เก็บในตู้เย็น

วิธีบรรจุ โดเวกซ์ 50 ดับบลิว ในคอลัมน์

ใช้ใยแก้วอุดที่ปลายคอลัมน์ นำไปเปตดูดโดเวกซ์ 50 ดับบลิว ที่ล้างแล้วใส่ในคอลัมน์ 3 มิลลิลิตร (ปริมาตรโดเวกซ์ 50 ดับบลิว ขณะเปียกน้ำ) รอจนเรซินนอนก้นจึงไขน้ำออกให้ขอบน้ำปริ่มเรซิน (ภาพที่ 11)

วิธีการ 1) น้ำ 20 มิลลิลิตร เติมมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐานสมมูลย์กับมอร์ฟีนเบส 500 ไมโครกรัม

2) ผ่านสารละลายในข้อ 1 ลงในคอลัมน์ที่บรรจุโดเวกซ์ 50 ดับบลิว ด้วยอัตราการไหลประมาณ 0.20 มิลลิลิตร/นาที ทิ้งส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ไป

3) ผ่านน้ำกลั่น ประมาณ 50 มิลลิลิตร ทิ้งส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ไป

4) การล้างดูดซับครั้งแรก (First elution) ใช้ 6 นอร์มัล สารละลายกรดเกลือ : เอธิลแอลกอฮอล์ (1:1) 6 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราการไหลประมาณ 0.20 มิลลิลิตร/นาที เก็บส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ไว้

5) การล้างดูดซับครั้งที่สอง (Second elution) ใช้ เอธิลแอลกอฮอล์ 20 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหลประมาณ 0.20 มิลลิลิตร/นาที เก็บส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ไว้ ส่วนนี้จะตั้งบนเครื่องอังน้ำที่ 70°C เพื่อลดปริมาตร แล้วเทรวมลงในส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ครั้งแรก ในข้อ 4

6) นำส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ทั้งสองครั้งซึ่งเทรวมกันแล้วในข้อ 5 ปรับ พีเอช ให้ได้ 8.5 ด้วย แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ สกัดด้วย คลอโรฟอร์ม : ไอโสโพรพานอล (3:1) 30 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

7) กรองชั้นของคลอโรฟอร์ม : ไอโสโพรพานอล (3:1) ที่สกัดได้แต่ละครั้ง ผ่านกระดาษกรองชนิดแยกชั้นที่ทำให้เปียกด้วย คลอโรฟอร์ม : ไอโส-โพรพานอล (3:1) จำนวนเล็กน้อย

8) หยด 0.5 นอร์มัล สารละลายกรดเกลือ 1-2 หยด ระเหยแห้ง ละลายสิ่งตกค้างที่ได้ด้วยเมทธานอล 5 มิลลิลิตร กรองหรือปั่นให้ใส ดูดเอาส่วนใสฉีดเข้า HPLC ในปริมาตรที่พอเหมาะ แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ที่ได้สารคืน

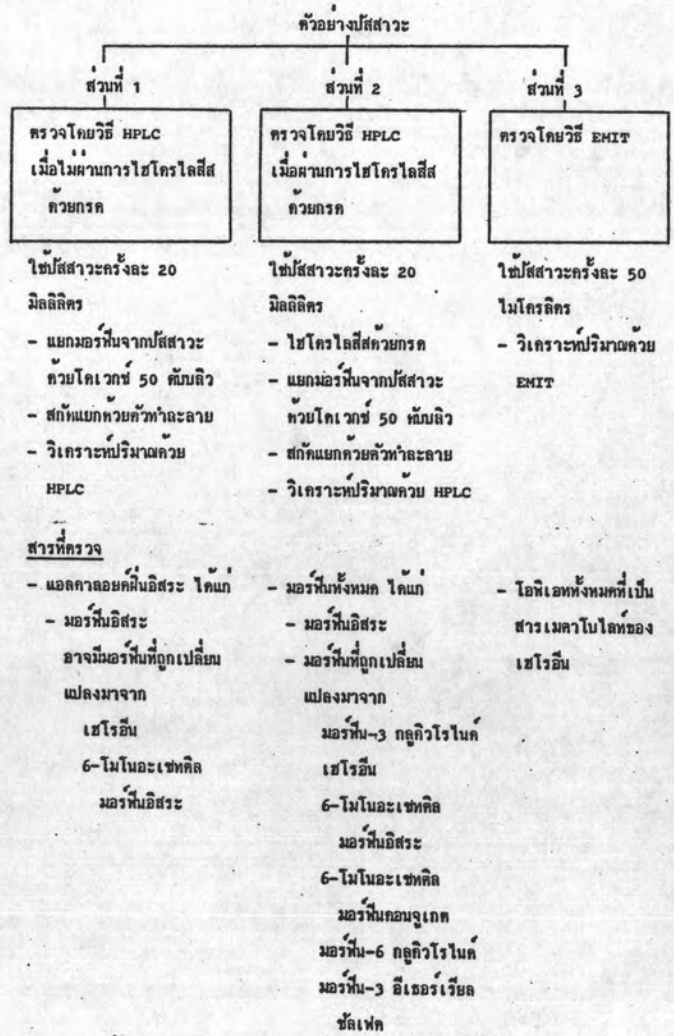
3.4.4 ศึกษาความแม่นยำ (Precission) ของวิธี EMIT ในการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนมาตรฐานที่เติมลงในปัสสาวะคนปกติ

ใช้ปัสสาวะคนปกติที่ไม่ได้รับสารในกลุ่มโอพิเอทแอลคาลอยด์ และเมื่อตรวจโดยวิธี EMIT แล้วให้ผลการวิเคราะห์เป็นลบ เติมมอร์ฟีนมาตรฐานให้ได้ความเข้มข้น 0.3 และ 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 2 ตัวอย่าง นำมาตรวจด้วยวิธี EMIT โดยทำซ้ำกัน ตัวอย่างละ 10 ครั้งซ้ำในการทดลองเดียวกัน แล้วคำนวณหาความแม่นยำเป็น ร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% Coefficient of Variation, % C.V.)

ร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน = $\frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ค่าเฉลี่ย}} \times 100$

3.4.5 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนมาตรฐานที่เติมลงในปัสสาวะคนปกติระหว่างวิธี HPLC และ EMIT

ใช้ปัสสาวะคนปกติที่ไม่ได้รับสารในกลุ่มโอพิเอทแอลคาลอยด์ และเมื่อตรวจโดยวิธี EMIT แล้วได้ผลการวิเคราะห์โอพิเอทเป็นลบ เติมมอร์ฟีนมาตรฐานให้ได้ความเข้มข้น 5 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วแบ่งปัสสาวะแต่ละความเข้มข้นนี้เป็น 3 ส่วน เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนดังนี้



รายละเอียดของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะ แต่ละส่วนมีดังนี้

3.4.5.1 <u>ส่วนที่หนึ่ง</u> วิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนด้วยวิธี HPLC เมื่อไม่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด

<u>วิธีการ</u> 1) ผ่านตัวอย่างปัสสาวะ 20 มิลลิลิตรในคอลัมน์ที่บรรจุ โดเวกซ์ 50 ดับบลิว ด้วยอัตราการไหลประมาณ 0.20 มิลลิลิตร/นาที ทิ้งส่วนของปัสสาวะที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ไป

2) ผ่านน้ำกลั่น ชะสิ่งสกปรกที่ติดมากับปัสสาวะซึ่งค้างอยู่ในคอลัมน์ จนน้ำที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ใสและไม่มีสี (ใช้น้ำกลั่นประมาณ 50 มิลลิลิตร) ทิ้งส่วนของน้ำที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ไป

3) การล้างดูดซับครั้งแรกใช้ 6 นอร์มัลสารละลายกรดเกลือ : เอธิลแอลกอฮอล์ (1:1) 6 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราการไหลประมาณ 0.20 มิลลิลิตร/นาที เก็บส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ไว้

4) การล้างดูดซับครั้งที่สอง ใช้ เอธิลแอลกอฮอล์ 20 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ด้วยอัตราการไหลประมาณ 0.20 มิลลิลิตร/นาที เก็บส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ไว้ ส่วนนี้จะต้องตั้งบนเครื่องอังน้ำที่ 70℃ เพื่อลดปริมาตร แล้วเทรวมลงในส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ครั้งแรกในข้อ 3

5) นำส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ทั้งสองครั้งซึ่งเทรวมกันแล้วในข้อ 4 ปรับพีเอชให้ได้ 8.5 ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ สกัดด้วย คลอโรฟอร์ม : ไอโสโพรพานอล (3:1) 30 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

6) กรองชั้นของคลอโรฟอร์ม : ไอโสโพรพานอล (3:1) ที่สกัดได้แต่ละครั้งผ่านกระดาษกรองชนิดแยกชั้นที่ทำให้เปียกด้วย คลอโรฟอร์ม : ไอโส-...

โพรพานอล (3:1) จำนวนเล็กน้อย

7) หยด 0.5 นอร์มัล สารละลายกรดเกลือ 1-2 หยด ระเหยแห้ง ละลายสิ่งตกค้างด้วยเมทธานอลปริมาตรพอเหมาะ กรองหรือปั่นให้ใส ดูดเอาส่วนใสฉีดเข้า HPLC ในปริมาตรที่พอเหมาะ

<u>การคำนวณปริมาณ</u> หาปริมาณมอร์ฟีนจากสารละลายตัวอย่างที่ฉีดเข้า HPLC โดยวิธี ใช้ความสูงของพีค (peak height) ที่วัดได้เทียบกับ ความสูงของพีค ของมอร์ฟีนมาตรฐานที่ทราบปริมาณ

$$Cs = \frac{Hs}{Hstd} \times Cstd$$

ดังนั้น

ความเข้มข้นของมอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร $= Cs \times \frac{a}{bc}$

เมื่อ Cs = ปริมาณมอร์ฟีนในสารละลายตัวอย่างที่ฉีดเข้า HPLC (หน่วยเป็น ไมโครกรัม)

Hs = ความสูงของพีค ของมอร์ฟีนในสารละลายตัวอย่างเมื่อฉีดเข้า HPLC ในปริมาณ Cs (หน่วยเป็น เซนติเมตร)

Hstd = ความสูงของพีคของมอร์ฟีนมาตรฐาน เมื่อฉีดเข้า HPLC ในปริมาณ Cstd (หน่วยเป็น เซนติเมตร)

Cstd = ปริมาณมอร์ฟีนในสารละลายมอร์ฟีนมาตรฐานที่ฉีดเข้า HPLC (หน่วยเป็น ไมโครกรัม)

a = ปริมาตรเมทธานอลที่ใช้ละลายสิ่งตกค้าง (หน่วยเป็น ไมโครลิตร)

b = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างที่ฉีดเข้า HPLC (หน่วยเป็น ไมโครลิตร)

c = ปริมาตรตัวอย่างปัสสาวะที่ใช้ (หน่วยเป็นมิลลิลิตร)

3.4.5.2 <u>ส่วนที่สอง</u> วิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนด้วยวิธี HPLC เมื่อผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด

<u>วิธีการ</u> 1) วิธีการไฮโดรไลสีสด้วยกรด (Acid Hydrolysis) (82) ใช้ตัวอย่างปัสสาวะ 20 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือเข้มข้น 2 มิลลิลิตร ปิดฝา นึ่งในเครื่องนึ่งอัด (Autoclave) ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที นำออกจากเครื่องนึ่งอัด ปล่อยให้เย็น

2) ปรับ พีเอช ให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรอง หลังจากนั้นดำเนินขั้นตอนวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.4.5.1 ทุกประการ

3.4.5.3 <u>ส่วนที่สาม</u> วิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนด้วยวิธี EMIT

<u>วิธีการ</u> (47)

1) ใช้ปิเปตทำให้เจือจาง ดูดตัวอย่างปัสสาวะ หรือสารละลายมอร์ฟีนมาตรฐาน (ในข้อ 3.3.13.4 หน้า 32) อย่างใดอย่างหนึ่ง ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีสับสเตรท (ในข้อ 3.3.13.2 หน้า 31) 200 ไมโครลิตร พร้อมทั้งปล่อยบัฟเฟอร์ (ในข้อ 3.3.13.1 หน้า 31) 250 ไมโครลิตร ไล่ตามลงไปด้วย

2) ใช้ปิเปตทำให้เจือจาง ดูดสารละลายแอนติบอดี้ชนิดต่อต้านมอร์ฟีน (ในข้อ 3.3.13.3 หน้า 31) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในส่วนผสมข้อ 1 พร้อมทั้งปล่อยบัฟเฟอร์ 250 ไมโครลิตร ไล่ตาม

ลงไปด้วย

3) ใช้ปิเปตทำให้เจือจาง ดูดสารละลายมอร์ฟีนเชื่อมกับไลโซซัยม์ (ในข้อ 3.3.13.3 หน้า 31) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในส่วนผสมข้อ 2 พร้อมทั้งปล่อยบัฟเฟอร์ 250 ไมโครลิตรไล่ตามลงไปด้วย

4) ให้ส่วนผสมในข้อ 3 ถูกดูดเข้าไปในสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เครื่องพิมพ์ผลจะบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 10 วินาที นับจากดูดส่วนผสมของสารเข้าเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เป็นค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น (Ao) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 50 วินาที แล้วบันทึกค่าความเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสงในช่วงเวลา 40 วินาทีนี้ (ΔA)

<u>การคำนวณปริมาณโดยประมาณ</u>

เขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง ΔA กับความเข้มข้นของสารละลายมอร์ฟีนมาตรฐาน 3 ความเข้มข้น คือ 0.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (หรือ Negative Calibrator) 0.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (หรือ Low Calibrator) และ 5.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (หรือ Medium Calibrator) บนกระดาษ เซมิ-ลอการิทึม (Semi-logarithm paper) หรือตั้งโปรแกรมให้เครื่องพิมพ์ผลสร้างกราฟมาตรฐานแล้วบันทึกไว้ เมื่อนำค่า ΔA ของตัวอย่างปัสสาวะที่วัดได้ มาเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างบนกระดาษ เซมิ-ลอการิทึม หรือป้อนเข้าเครื่องพิมพ์ผล ก็จะสามารถหาความเข้มข้นของมอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะนั้นได้ โดยที่ ΔA ของตัวอย่างปัสสาวะใดมีค่าต่ำกว่า ΔA ของสารละลายมอร์ฟีนมาตรฐานความเข้มข้น 0.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (หรือ Low Calibrator) จะแสดงผลการวิเคราะห์เป็นลบ (negative)

3.4.6 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในปัสสาวะผู้ป่วยไทย (ผู้เสพติดเฮโรอีน) ระหว่างวิธี HPLC และ EMIT

ใช้ปัสสาวะผู้ป่วยซึ่งเก็บตามวิธีการเก็บตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วย (ดังรายละเอียดในข้อ 3.4.1 หน้า 32) แบ่งปัสสาวะที่เก็บได้แต่ละครั้งเป็น 3 ส่วน เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนด้วยวิธี HPLC เมื่อไม่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรดและผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด และวิธี EMIT เช่นเดียวกับในข้อ 3.4.5 ทุกประการ

นำผลการวิเคราะห์ที่ตรวจได้จากวิธี EMIT มาเปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์ที่ตรวจได้จากวิธี HPLC ที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรดและวิธี HPLC ที่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์ (Correlation Coefficient) ระหว่างผลวิเคราะห์ที่ตรวจได้จากวิธี EMIT และวิธี HPLC เพื่อประเมินว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะโดยวิธีทั้งสองมีความสัมพันธ์กันหรือไม่ และทดสอบการเปรียบเทียบข้อมูลเป็นคู่ (Paired Comparison Test) เพื่อประเมินว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณมอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะโดยวิธีทั้งสองมีความแตกต่างกันหรือไม่

$$\text{ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์} = \frac{n\,\Sigma x_i y_i - (\Sigma x_i)(\Sigma y_i)}{\sqrt{n\,\Sigma x_i^2 - (\Sigma x_i)^2}\ \sqrt{n\,\Sigma y_i^2 - (\Sigma y_i)^2}}$$

เมื่อ x_i = ความเข้มข้นของโอพิเอทเทียบสมมูลย์กับมอร์ฟีน ในตัวอย่างปัสสาวะ ซึ่งตรวจโดยวิธี EMIT

y_i = ความเข้มข้นของมอร์ฟีนในตัวอย่างปัสสาวะ ซึ่งตรวจโดยวิธี HPLC

n = จำนวนตัวอย่างปัสสาวะที่นำมาวิเคราะห์หาปริมาณมอร์ฟีน เปรียบเทียบระหว่างวิธี HPLC และ EMIT

ทดสอบการเปรียบเทียบข้อมูลเป็นคู่ (Paired Comparison Test)

การทดสอบทางสถิติที่ใช้คือ ที-เทสต์ (t-Test) โดยใช้ค่า t เป็นค่าทดสอบทางสถิติ

$$t = \frac{\bar{d} - \mu_d}{s_{\bar{d}}}$$

เมื่อ $\bar{d}$ = ค่าเฉลี่ยของความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ระหว่างวิธี EMIT และ HPLC ที่ผ่านการไฮโดรไลสีสด้วยกรด

$s_{\bar{d}}$ = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ $\bar{d}$

μ_d = พารามิเตอร์ในสมมติฐาน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย