บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1 อุปกรณ์การทดลอง

Mass spectrometer รุ่น Trio-2000 ของบริษัท Fisons Instruments จำกัด ประเทศสหราชอาณาจักร

Mass spectrometer รุ่น MD-800 ของบริษัท Fisons Instruments จำกัด ประเทศสหราชอาณาจักร

Gas Chromatography รุ่น GC-8000 ของบริษัท Fisons Instruments จำกัด ประเทศสหราชอาณาจักร

Column DB-1 fused silica capillary, cross-linked 5% Dimethylpolysiloxane ยาว 30 เมตร, เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มม., ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร ของบริษัท J&W Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

Column DB-5 fused silica capillary, cross-linked 5% phenyl methylsilicone; ยาว 15 เมตร, เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.2 มม., ความหนาของฟิล์ม 0.3 ไมโครเมตร ของบริษัท J&W Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องชั่ง Mettler รุ่น AT 200 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

เครื่องเขย่า (Vortex) รุ่น Vortex-Genie No.2 Scientific Industries Inc., U.S.A.

เครื่องระเหยแห้งแบบหมุน (Rotary Evaporator) รุ่น R114 ของบริษัท Buchi ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

อ่างสำหรับหล่อน้ำร้อน (Water bath) รุ่น B480 R114 ของบริษัท Buchi ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

เครื่องสูบฉีดของเหลวรุ่น 510 ของบริษัท Water Associates จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

2 สารเคมี

Sep-Pak C_{18} cartridge ของบริษัท J&W Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

Potassium hydroxide ของบริษัท EKA KEMI ประเทศสวีเดน

Anhydrous sodium sulfate ของบริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

Potassium permanganate ของบริษัท Buchi ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

L-cysteine ของบริษัท Sigma Chemical Co.,Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา

Hydrochloric acid ของบริษัท Carlo Erba ประเทศอิตาลี

Boric acid ของบริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

Monohydrogenpotassium phosphate ของบริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

Dihydrogenpotassium phosphate ของบริษัท Fluka ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

β-Glucuronidase จาก Escherichia coli ของบริษัท Sigma Chemical Co.,Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา

Acetonitrile AR grade ของบริษัท J.T. Baker Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

Ethanol AR grade ของบริษัท J.T. Baker Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

Methanol AR grade ของบริษัท J.T. Baker Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

Formic acid ของบริษัท Sigma Chemical Co.,Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารต้องห้ามมาตรฐานดังรายชื่อข้างล่างได้จากบริษัท Sigma Chemical Co.,Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารกระตุ้น (Stimulants)

D-Amphetamine Sulfate

Benzphetamine

Caffeine

Cocaine

Cocaine HCl

(+-) Ephedrine HCl

Ethamivan

Fencamfamine

Fenproporex

(+) Methamphetamine HCl

Methoxyphenamine HCl

(1S,2R)-(+)-N-Methylephedrine

(1R,2S)-(+)-N-Methylephedrine

Methylphenidate HCl

Phendimetrazine Bitratrate

(+-) Phenylpropanolamine

Strychnine Free Base

Theophylline Crystalline Anhydrous

β-Hydroxy Ethyl Theophylline

สารที่มีฤทธิ์แก้ปวดและเสพติด (Narcotic analgesics)

Alphaprodine HCl

Buprenorphine

Codeine

Levorphanol Tartrate

(+-) - Methadone HCl

Morphine Sulfate

Nalbuphine HCl

Pentazocine HCl

ยาปิดกั้นบีตา (Beta-blockers)

Acebutolol HCl

Alprenolol HCl

Atenolol

DL-Propranolol HCl

Labetalol HCl

(+-) Metoprolol - (+) Tartrate

Nadolol

Oxprenolol HCl

อะแนบอลิกสเตอรอยด์ (Anabolic steroids)

Bolasterone

Fluoxymesterone

Mesterolone

17A-Methyltestosterone

Oxymetholone

Stanozolol

Testosterone Propionate

ยาขับปัสสาวะ (Diuretics)

Acetazolamide

Amiloride HCl

Bendroflumethiazide

Benzthiazide

Bumetanide

Ethacrynic acid

Furosemide

Hydrochlorothiazide

Mersalyl acid

Spironolactone

Triamterene

วิธีดำเนินการทดลอง

1 การเตรียมน้ำบริสุทธิ์สำหรับใช้ในการวิเคราะห์

นำน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน (Deionized water) มาทำการรีฟลักซ์ (Reflux) ด้วยโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนตเพื่อกำจัดสารอินทรีย์ที่ปะปนอยู่ในน้ำ เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปกลั่นแล้วเก็บในภาชนะพลาสติก

2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

นำสารต้องห้ามมาตรฐานแต่ละชนิดมาทำการทดสอบการละลายเพื่อเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม

เตรียมสารละลายยาปิดกั้นบีตาความเข้มข้น 100 ส่วนในล้านส่วน (ppm.) ในเมธานอล 70% (V/V) ในน้ำ แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ส่วนในล้านส่วน (ppm.) สำหรับใช้เป็นสารมาตรฐานในการสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายอะแนบอลิกสเตอรอยด์ความเข้มข้น 100 ส่วนในล้านส่วน (ppm.) ในเมธานอล 70% (V/V) ในน้ำ แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ส่วนในล้านส่วน (ppm.) สำหรับใช้เป็นสารมาตรฐานในการสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายยาขับปัสสาวะความเข้มข้น 500 ส่วนในล้านส่วน (ppm.) ในเอธานอล 70% (V/V) ในน้ำ แล้วนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ส่วนในล้านส่วน (ppm.) สำหรับใช้เป็นสารมาตรฐานในการสร้างกราฟมาตรฐาน

3 การเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ด้วย LC/MS

เตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่โดยใช้ส่วนประกอบเหมือนตัวทำละลายที่ใช้เตรียมสารละลายมาตรฐาน และ เติมกรดฟอร์มิก (Formic acid) ให้ได้ความเข้มข้น 1 %

4. การวิเคราะห์สารมาตรฐานโดยใช้เทคนิค LC/MS

การวิเคราะห์สารต้องห้ามประเภท ยาปิดกั้นบีตา, อะแนบอลิกสเตอรอยด์ และยาขับปัสสาวะ โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี ที่ใช้แหล่งกำเนิดอิออนชนิดแอดโมสเฟอริกเพรสเชอร์เคมิคัลไอออไนเซชัน (LC/MS : Atmospheric Pressure Chemical Ionization Technique) และเก็บข้อมูลเฉพาะอิออนที่มีประจุบวกเท่านั้น (APCI+)

ศึกษาการแตกตัวของสารแต่ละชนิดเมื่อใช้ cone voltage ต่าง ๆ กัน การศึกษาการแตกตัวของสารจะต้องใช้สารความเข้มข้นสูงกว่าปกติจึงต้องฉีดสารมาตรฐานความเข้มข้น 100

ส่วนในล้านส่วน (ppm.) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง LC/MS โดยตรง (direct loop injection) โดยที่ไม่ผ่านคอลัมน์ HPLC

วิเคราะห์รูปแบบการแตกตัวของสารแต่ละชนิด

พิจารณาว่าอิออนที่มีมวลเท่าใดที่ให้สัญญาณมีความเข้มสูงที่สุดซึ่งจะเลือกใช้สำหรับการตรวจหา

พิจารณาการแตกตัวของสารที่ cone voltage สูง ๆ (ประมาณ 70 - 80 โวลต์) ซึ่งสารจะเกิดการแตกตัวมากโดยเลือกพีกที่มีความเข้มสูงหลาย ๆ พีก ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของสารแต่ละชนิด แล้วสรุปเป็นตารางสำหรับใช้ในการตรวจยืนยัน

เนื่องจากอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่มีผลต่อความไวในการวิเคราะห์มากจึงต้องหาอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่สุดโดยทดลองปรับอัตราการไหลตั้งแต่ 0.2 มล./นาที ไปจนถึง 1 มล./นาที

Cone voltage มีผลต่อการแตกตัวของสาร และแตกต่างกันในสารแต่ละชนิด จึงต้องหา cone voltage ที่ให้ความไวในการวิเคราะห์สูงที่สุดของสารแต่ละชนิด โดยวิเคราะห์แบบ Selective Ion Recording (SIR) โดยบันทึกอิออนที่ให้สัญญาณเข้มที่สุด แล้วปรับ cone voltage ให้มีความต่างศักย์ต่าง ๆ หลังจากนั้นนำข้อมูลมาเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟ

หา corona voltage ที่เหมาะสมที่สุด

หาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่จะสามารถวิเคราะห์ได้ (detection limit) โดยสัญญาณที่วัดได้จะต้องมีความเข้มสูงกว่าสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio) ไม่ต่ำกว่า 2 เท่า โดยวัดขนาดของสัญญาณรบกวนจากยอดของพีกที่สูงที่สุดและพีกที่ต่ำที่สุด (peek to peek)

ทำกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ส่วนในล้านส่วน (ppm)

วิเคราะห์หาช่วงที่เป็นเส้นตรง (linearity range)

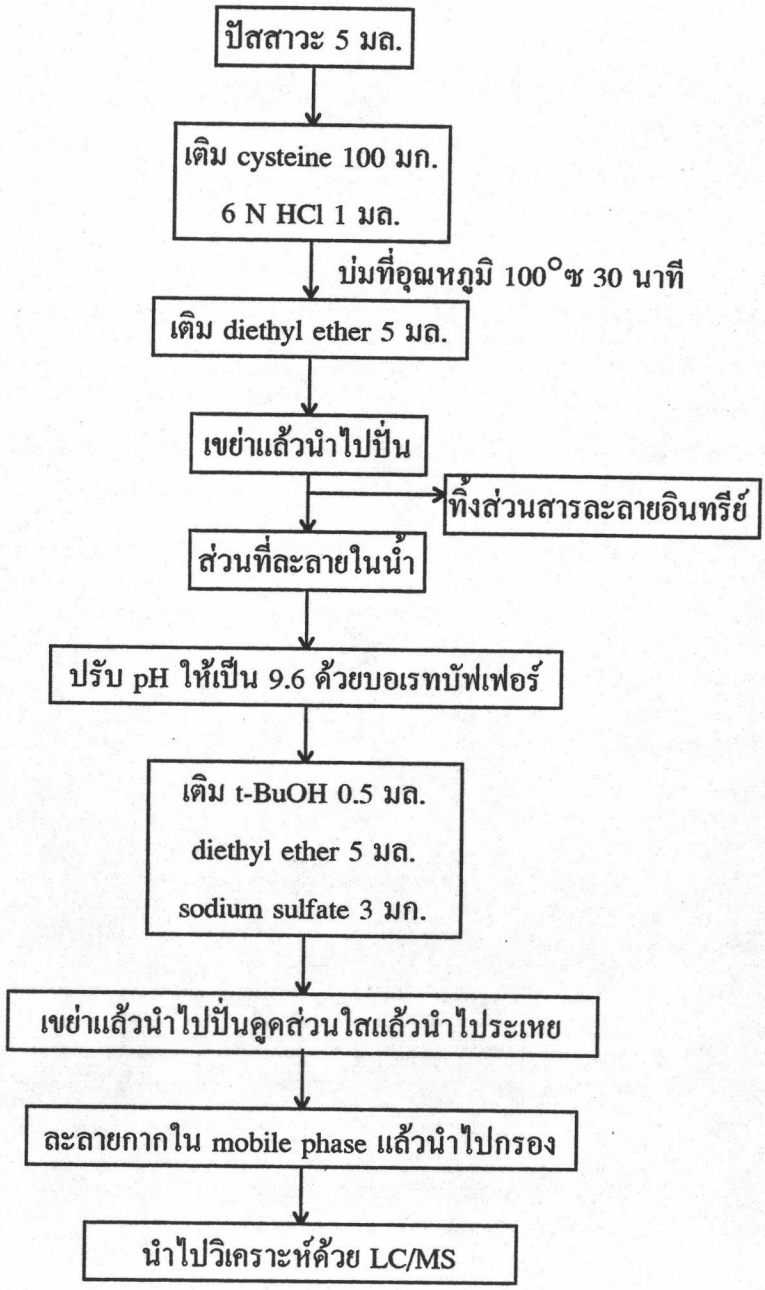
สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สมการถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression)

หาปริมาณสารที่ได้จากการสกัดกลับ (% Recovery) โดยการวิเคราะห์ปริมาณสารต้องห้ามในปัสสาวะที่ได้เติมสารมาตรฐานลงไปและนำปัสสาวะไปสกัดด้วยวิธีการต่อไปนี้

4.1. <u>วิธีวิเคราะห์ยาปิดกั้นบีตา</u>

ขั้นตอนการสกัดยาปิดกั้นบีตาจากปัสสาวะยังคงใช้วิธีการของ IOC ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้ ใส่ปัสสาวะ 5 มล. ในหลอดสำหรับปั่น เติมกรดไฮโดรคลอลิกความเข้มข้น 6 N ปริมาตร 1 มล. และเติม L-cysteine 100 มก. เขย่าเบา ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 100°ซ. เป็นเวลา 30 นาที แล้วทิ้งไว้จนอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องจึงเติม diethylether 5 มล. เขย่าเป็นเวลา 20 นาที จากนั้น

นำไปปั่นที่ 2500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดชั้นของอีเธอร์ทิ้งแล้วปรับ pH ส่วนที่เป็นน้ำให้เป็น 9.6 โดยใช้สารละลายบอเรทบัฟเฟอร์ จากนั้นเติม tert-butanol 0.5 มล., diethylether 5 มล. และ anhydrous sodium sulfate 3 ก. ปิดจุกแล้วเขย่า 20 นาที นำไปปั่นแล้วดูดชั้นของอีเธอร์แล้วนำไประเหยให้แห้งด้วย rotary evapotator จากนั้นนำมาละลายในตัวทำละลายที่ประกอบด้วยเมธานอลและน้ำในอัตราส่วน 1:1 1 มล. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสรุปดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ยาปิดกั้นบีตาด้วย LC/MS

นำสารละลายที่ได้มากรองแล้วฉีดเข้าเครื่อง LC/MS โดยฉีดสารปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยไม่ผ่านคอลัมน์ HPLC วิเคราะห์แบบ SIR โดยบันทึกเฉพาะอิออนที่มีมวลต่อไปนี้

Acebutolol บันทึกอิออนที่มีมวล 337 Da.

Alprenolol บันทึกอิออนที่มีมวล 250 Da.

Atenolol บันทึกอิออนที่มีมวล 267 Da.

Labetolol บันทึกอิออนที่มีมวล 329 Da.

Metoprolol บันทึกอิออนที่มีมวล 268 Da.

Nadolol บันทึกอิออนที่มีมวล 310 Da.

Propranolol บันทึกอิออนที่มีมวล 260 Da.

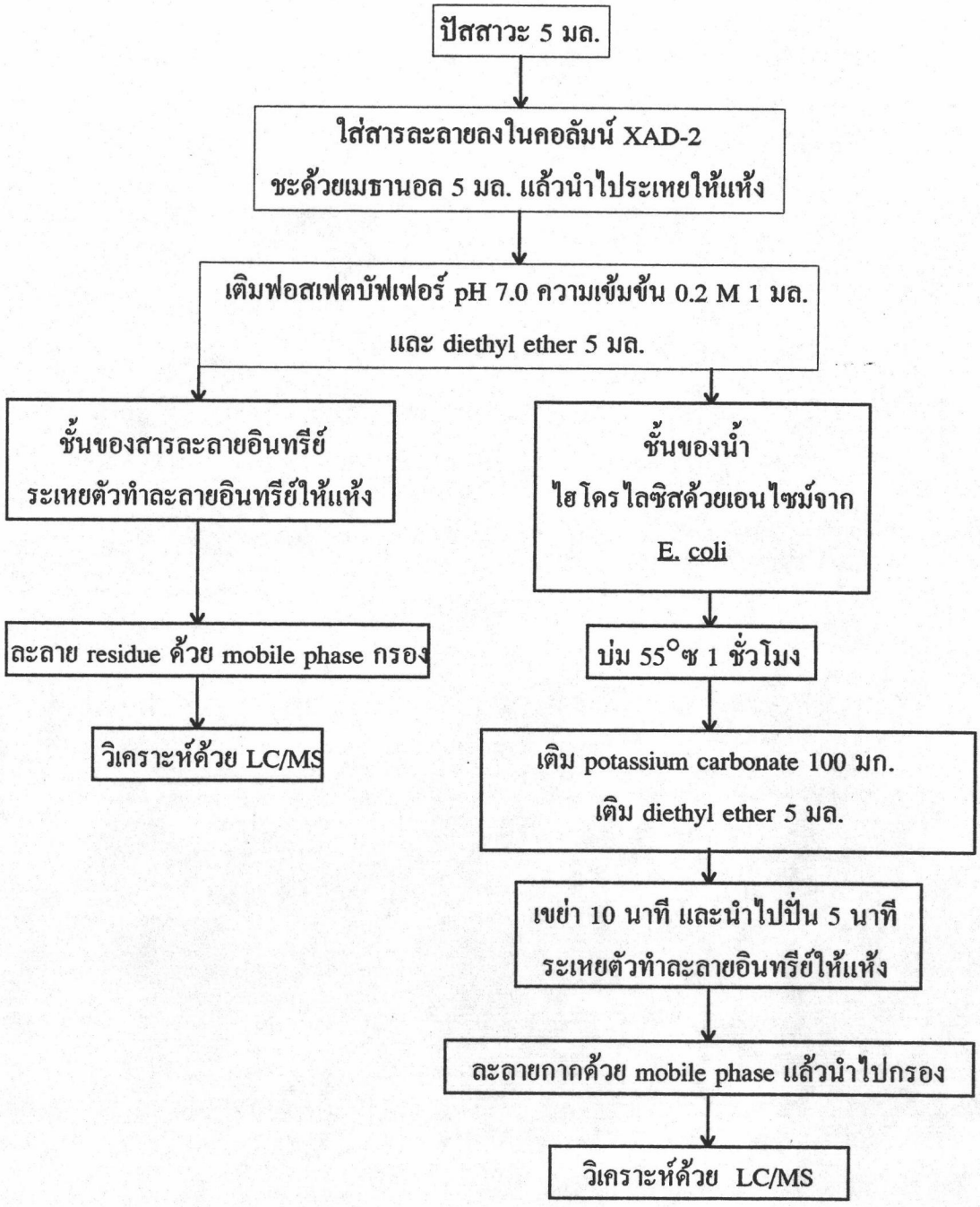
Oxprenolol บันทึกอิออนที่มีมวล 266 Da.

หากโครมาโทแกรมมีพีกเกิดขึ้นหลังจากฉีดสารให้ทำการตรวจสอบว่าพบอิออนมวลเท่าใดและตรงกับอิออนที่ใช้ตรวจหายาปิดกั้นบีตาชนิดใด ให้สงสัยว่าในปัสสาวะอาจมียาปิดกั้นบีตาชนิดนั้น และให้ทำการตรวจยืนยันโดยการฉีดสารตัวอย่างซ้ำอีกครั้ง โดยปรับ Cone voltage ให้เป็น 80 V ก่อนแล้วจึงบันทึกกลุ่มอิออนที่ใช้สำหรับตรวจยืนยันยาปิดกั้นบีตาที่สรุปไว้ในตาราง หากพบอิออนครบทุกตัวถือว่าในปัสสาวะมียาปิดกั้นบีตาชนิดนั้น

4.2. <u>วิธีวิเคราะห์ฮอร์โมนอะแนบอลิกสเตอรอยด์</u>

ขั้นตอนการสกัดอะแนบอลิกสเตอรอยด์ใช้วิธีการของ Masse และคณะ (37) เนื่องจากวิธีการของ IOC ต้องมีการเตรียมคอลัมน์ XAD-2 แต่วิธีสกัดของ Masse ใช้ sep pak C_{18} ซึ่งต้องใช้สำหรับการสกัดยาขับปัสสาวะอยู่แล้ว และ Masse รายงานว่าวิธีการสกัดวิธีนี้ได้ผลการสกัดกลับดีกว่าวิธีของ IOC ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้ ชะ sep pak C_{18} cartridge ด้วยเมธานอล 5 มล. และน้ำกลั่น 5 มล. จากนั้นใส่ปัสสาวะ 2 มล. ลงใน sep pak C_{18} cartridge เมื่อปัสสาวะถูกดูดออกหมดแล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น 5 มล. แล้วชะสเตียรอยด์ออกมาโดยใช้ เมธานอล 5 มล. เป่าให้แห้งด้วยแกสไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40°ซ. ละลายส่วนกากที่เหลือด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ (pH 5.2) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ 1 มล. นำไปสกัดสเตียรอยด์อิสระโดยใช้ diethyl ether 5 มล. ส่วนคอนจูเกตสเตียรอยด์จะอยู่ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ใช้แกสไนโตรเจนเป่าอะซิเตทบัฟเฟอร์ให้แห้งที่อุณหภูมิ 40°ซ. แล้วเติม β - glucuronidase 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55°ซ. เป็นเวลา 1 ชม. หลังจากทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม K_2CO_3 100 มก. และ diethyl ether 5 มล. เขย่าด้วย vortex-mixer เป็นเวลา 30 วินาที เติม sodium sulfate anhydrous 1 กรัม แล้วเขย่าติดต่อกันเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นที่ 2500 rpm. แล้วดูดชั้นของอีเธอร์ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยนำไประเหยด้วย rotary

evaporator แล้วจึงนำไปละลายในตัวทำละลายที่ประกอบด้วยเมธานอลในน้ำ 70% 1 มล. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสรุปดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์อะแนบอลิกสเตอรอยด์ด้วย LC/MS

นำสารละลายที่ได้มากรองแล้วฉีดเข้าเครื่อง LC/MS โดยฉีดสาร 50 ไมโครลิตร วิเคราะห์แบบ SIR โดยบันทึกเฉพาะอิออนที่มีมวลต่อไปนี้

Bolasterone บันทึกอิออนที่มีมวล 317 Da.

Fluoxymesterone บันทึกอิออนที่มีมวล 337 Da.

Mesterolone บันทึกอิออนที่มีมวล 305 Da.

Methyltestosterone บันทึกอิออนที่มีมวล 303 Da.

Oxymetholone บันทึกอิออนที่มีมวล 347 Da.

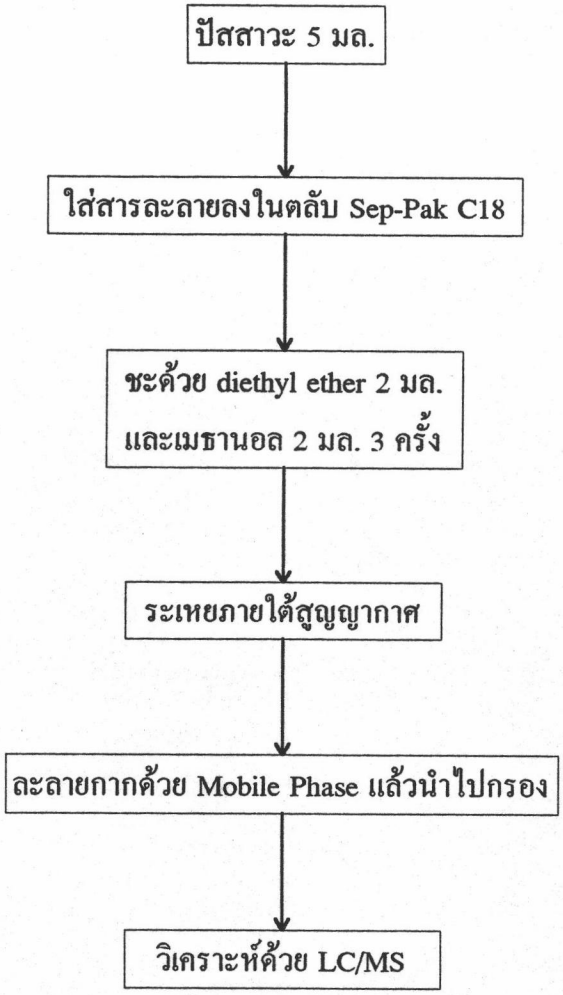
Stanozolol บันทึกอิออนที่มีมวล 329 Da.

Testosterone propionate บันทึกอิออนที่มีมวล 345 Da.

หากโครมาโทแกรมมีพีกเกิดขึ้นหลังจากฉีดสารให้ทำการตรวจสอบว่าพบอิออนมวลเท่าใดและตรงกับอิออนที่ใช้ตรวจหาอะแนบอลิกสเตอรอยด์ชนิดใด ให้สงสัยว่าในปัสสาวะอาจมีอะแนบอลิกสเตอรอยด์ชนิดนั้น และให้ทำการตรวจยืนยันโดยการฉีดสารตัวอย่างซ้ำอีกครั้ง โดยปรับ Cone voltage ให้เป็น 80 V. ก่อนแล้วจึงบันทึกกลุ่มอิออนที่ใช้สำหรับตรวจยืนยันอะแนบอลิกสเตอรอยด์ที่สรุปไว้ในตาราง หากพบอิออนครบทุกตัวถือว่าในปัสสาวะมีอะแนบอลิกสเตอรอยด์ชนิดนั้น

4.3. <u>วิธีวิเคราะห์ยาขับปัสสาวะ</u>

ขั้นตอนการสกัดยาขับปัสสาวะจากปัสสาวะยังคงใช้วิธีการของ IOC ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้ ชะ sep pak C_{18} cartridge ด้วยเมธานอล 5 มล. และน้ำกลั่น 5 มล. จากนั้นใส่ปัสสาวะ 5 มล. ลงใน sep pak C_{18} cartridge เมื่อปัสสาวะถูกดูดออกหมดแล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น 5 มล. และ n-hexane 1 มล. เก็บส่วนที่ติดอยู่ในคอลัมน์โดยชะด้วย diethylether 6 มล. และ เมธานอล 2 มล. นำส่วนที่เก็บได้ทั้งหมดไประเหยให้แห้งโดยใช้เครื่อง vacuum rotary evaporator และ vacuum desiccator แล้วจึงเติมตัวทำละลายที่ประกอบด้วยเมธานอลเมธานอลในน้ำ 70% 1 มล. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสรุปดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ยาขับปัสสาวะด้วย LC/MS

นำไปกรองแล้วฉีดเข้าเครื่อง LC/MS โดยฉีดสาร 50 ไมโครลิตร วิเคราะห์แบบ SIR โดยบันทึกเฉพาะอิออนที่มีมวลต่อไปนี้

Acetazolamide บันทึกอิออนที่มีมวล 222 Da.

Amiloride บันทึกอิออนที่มีมวล 230 Da.

Bendroflumethiazide บันทึกอิออนที่มีมวล 322 Da.

Benzthiazide บันทึกอิออนที่มีมวล 197 Da.

Bumetanide บันทึกอิออนที่มีมวล 365 Da.

Ethacrynic acid บันทึกอิออนที่มีมวล 303 Da.

Furosemide บันทึกอิออนที่มีมวล 251 Da.

Hydrochlorothiazide บันทึกอิออนที่มีมวล 298 Da.

Spironolactone บันทึกอิออนที่มีมวล 341 Da.

Triamterene บันทึกอิออนที่มีมวล 253 Da.

หากโครมาโทแกรมมีพีกเกิดขึ้นหลังจากฉีดสารให้ทำการตรวจสอบว่าพบอิออนมวลเท่าใดและตรงกับอิออนที่ใช้ตรวจหายาขับปัสสาวะชนิดใด ให้สงสัยว่าในปัสสาวะอาจมียาขับปัสสาวะชนิดนั้น และให้ทำการตรวจยืนยันโดยการฉีดสารตัวอย่างซ้ำอีกครั้ง โดยปรับ Cone voltage ให้เป็น 80 V ก่อนแล้วจึงบันทึกกลุ่มอิออนที่ใช้สำหรับตรวจยืนยันยาขับปัสสาวะที่สรุปไว้ในตาราง หากพบอิออนครบทุกตัวถือว่าในปัสสาวะมียาขับปัสสาวะชนิดนั้น

5 <u>ทดสอบความสามารถในการวิเคราะห์ซ้ำ</u>

สุ่มสารต้องห้ามมา 1 ชนิดมาทำการวิเคราะห์ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์สารชนิดนั้น โดยการฉีดสารดังกล่าวซ้ำกัน 30 ครั้งโดยฉีดสารห่างกันครั้งละ 2 นาที แล้วนำมาทำการหาพื้นที่ใต้กราฟ และหาค่าเฉลี่ยเลขคณิต (mean) และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

6 <u>ทดลองวิเคราะห์ตัวอย่างจริง</u>

การวิเคราะห์สารต้องห้ามโดยใช้เทคนิค LC/MS แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการตรวจหาและขั้นตอนการตรวจยืนยัน

ตรวจหาสารต้องห้ามโดยเลือก cone voltage ที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์สารทั้งกลุ่ม และเลือกบันทึกอิออนที่ใช้สำหรับตรวจหาสารกลุ่มนั้น

หากมีพีกปรากฏขึ้นมาในโครมาโทแกรมให้ตรวจสอบว่า อิออนที่ปรากฏมีมวลตรงกับสารใดให้นำมาตรวจยืนยันอีกครั้งโดยบันทึกอิออนทั้งหมดตามตารางสำหรับการตรวจยืนยันสารชนิดนั้น ถ้ามีอิออนที่มีมวลเท่ากับในตารางทุกอิออน แสดงว่าในปัสสาวะมีสารต้องห้ามชนิดนั้น

7 <u>การวิเคราะห์สารกระตุ้นโดยใช้เทคนิคแกสโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี</u>

สกัดปัสสาวะและสารละลายมาตรฐาน โดยใช้อีเธอร์ 2 มล. และโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 N 0.5 มล. เติมแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต 3 ก. เขย่าแล้วนำไปปั่นแยก ดูดชั้นของอีเธอร์มาวิเคราะห์ด้วย GC/MS การสรุปผลต้องนำข้อมูลทั้ง retention time และ mass spectra มาพิจารณา

เนื่องจากคาเฟอีนเป็นสารต้องห้ามที่ต้องวิเคราะห์ปริมาณ หากมีคาเฟอีนในปัสสาวะเกิน 12 ไมโครกรัมต่อปัสสาวะ 1 มิลลิลิตรจะถือว่าเป็นการตั้งใจใช้สารต้องห้าม จึงต้องทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 ไมโครกรัม/มล. แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย GC/MS การสร้างกราฟมาตรฐานจะใช้ความสูงของพีกแทนการใช้พื้นที่เนื่องจากมีความถูกต้องมากกว่า