การตรวจวิเคราะห์แอมเฟตามินในสารตัวอย่างจากร่างกาย

นางสาว พูนภิรมย์ ศิริพูล

002101

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2524

I16718823

Determination of Amphetamines in Biological Fluids

Miss Poonpirom Siripool

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1981

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจวิเคราะห์แอมเฟตามีนในสารตัวอย่างจากร่างกาย
โดย	นางสาว พูนภิรมย์ ศิริพูล
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราพรรณ ด่านอุตรา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุประดิษฐ์ บุนนาค)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรรเสริญ ทรัพยโตษก)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราพรรณ ด่านอุตรา)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์ วิชัย โปษยะจินดา)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ปรีดา ชัยศิริ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์ เทพ หิมะทองคำ)

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจวิเคราะห์แอมเฟตามีนในสารตัวอย่างจากร่างกาย
ชื่อนิสิต	นางสาว พูนภิรมย์ ศิริพูล
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราพรรณ ด่านอุตรา
ภาควิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2523

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

รายงานนี้เสนอการวิเคราะห์แอมเฟตามีนด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี สเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรี และราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ การวิเคราะห์ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี ทำโดยใช้อีเทอร์สกัดปัสสาวะที่เป็นด่าง pH 10-11 และเตรียมอนุพันธ์ของ 7-Chloro-4-Nitrobenzo-2,1,3-Oxadiazole (NBD-Cl) ซึ่งเป็นสารเรืองแสงสีเหลืองสดภายใต้รังสีเหนือม่วง 365 นาโนเมตร และแยกอนุพันธ์ที่เตรียมได้ออกจากสารอื่นโดยใช้ซิลิกาเจล GF_{254} และสารผสมเอทีลอาซิเตท : ไซโคลเฮกเซน 2:3 โดยปริมาตร อนุพันธ์นี้มีค่า R_f 0.46 ความไวของวิธีวิเคราะห์ในสภาวะที่ใช้ศึกษามีค่าประมาณ 1 ไมโครกรัม

อนุพันธ์แอมเฟตามีนนี้ ให้ค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์มากที่สุด ที่ emission และ excitation wavelength เท่ากับ 520 และ 468 นาโนเมตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์แอมเฟตามีนความเข้มข้น 0.002 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ปรากฏว่าค่าร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนต่ำสุด มีค่าเท่ากับ 5.6 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ เมื่อคิดเทียบสารที่วัดได้เป็นร้อยละของสารที่เติมลงไปในปัสสาวะ มีค่าระหว่าง 91 ถึง 122 เมื่อใช้คอนเปอร์ซัลเฟตตกตะกอนโปรตีน ก่อนการสกัดสารออกจากปัสสาวะ ทำให้ค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนต่ำสุดเปลี่ยนไปเป็น 7.6 และค่าความถูกต้องเปลี่ยนไปเป็นระหว่าง 114 และ 157

การดัดแปลง การวิเคราะห์แอมเฟตามีนในปัสสาวะ โดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ โดยใช้น้ำยาจากบริษัท Roche Diagnostics ทำให้ตัดทอนปริมาณแอนติบอดีและสารติดฉลากลงได้เป็น 1/8 และ 1/4ของปริมาณที่บริษัทแนะนำการวิเคราะห์นี้มีความไว 1 นาโนกรัมต่อหลอดทดลอง หรือ 22 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์แอมเฟตามีนเข้มข้นระหว่าง 156.3 ถึง 10,000 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ภายในการทดลองเดียวกัน และระหว่างการทดลอง 3 ครั้ง เมื่อคิดเป็นค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

มีค่าระหว่าง 6.4 ถึง 19.4 และ 12.5 ถึง 16.0 ตามลำดับ ความจำเพาะของแอนติบอดีที่ใช้อยู่ในระดับสูง คือ ให้ค่าปฏิกิริยา ข้ามชนิดสูงสุดเพียงร้อยละ 1.06 กับเมทแอมเฟตามีน และความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์มีค่าระหว่างร้อยละ 95.5 ถึง 108.4

ลักษณะการขับถ่ายแอมเฟตามีนในปัสสาวะของอาสาสมัคร 5 ราย ซึ่งรับประทานแอมเฟตามีนซัลเฟต 5 มิลลิกรัม ค่อนข้างแตกต่างกัน ความเข้มข้นของแอมเฟตามีนในปัสสาวะซึ่งตรวจโดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ มีค่าสูงสุดเป็น 707 ถึง 5500 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ระหว่างเวลา 15 ถึง 30 ชั่วโมง หลังรับประทานยา และปริมาณแอมเฟตามีนสะสม ที่ขับถ่ายออกมาเมื่อเวลาประมาณ 70 ชั่วโมง หลังรับประทานยา มีค่าระหว่างร้อยละ 12.6 ถึง 60.6 ของปริมาณแอมเฟตามีนที่รับประทาน

ผลการวิเคราะห์แอมเฟตามีนในปัสสาวะโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์โดยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ เมื่อความเข้มข้นที่วิเคราะห์โดยวิธีหลังสูงกว่า 500 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

Thesis Title	Determination of Amphetamines in Biological Fluids
Name	Miss Poonpirom Siripool
Thesis Advisor	Assistant Professor Varapan Danutra,Ph.D.
Department	Biochemistry
Academic Year	1980

Abstract

The thesis described the determination of urinary amphetamine by thin-layer chromatography (TLC) spectrofluorophotometry (SFM) and radioimmunoassay (RIA). The first two techniques involved the preparation of amphetamine-NBD, an intense yellow fluorescence derivative under 365 nanometer UV light. Ether extracts of basic (pH 10-11) urine specimen and 7-Chloro-4-Nitrobenzo-2,1,3-Oxadiazole (NBD-Cl) were used in the derivative formation.

Purification of the derivative by TLC with silica gel GF_{254} in ethylacetate : cyclohexane 2:3 v/v gave an R_f value of 0.46. The sensitivity of the method was approximately one microgram.

Amphetamine-NBD showed maximum relative fluorescence intensity at emission and excitation wavelengths of 520 and 468 nanometer respectively.

A minimum percentage coefficient of variation was found to be 5.6 in the determination of standard amphetamine base added into normal urine at a concentration of 0.002 ng/cm^3 whereas the recovery ranged from 91-122 % was obtained. Protein precipitaion with copper sulphate prior to the extraction proces increased the minimum coefficient of

variation to 7.6 % and the percentage recovery to 114-157.

Modified protocol of Abuscreens from ROCHE DIAGNOSTICS was implemented for the RIA of amphetamine between 156.3-10,000 ng/cm^3. The antibody and radioligand could be decreased to one eighth and one fourth of the recommended quantities respectively. The modified method gave a sensitivity of 22 ng/cm^3 or 1 ng/tube. The antibody was considered to be highly specific having maximum (1.06%) cross reaction with methamphetamine among various drugs tested. The coefficient of variation varied from 6.4-19.4% and 12.5-16.0% for within and between assays respectively and the percentage recovery ranged from 95.5 to 108.4 was obtained.

Serial urine specimen from five volunteers who ingested 5 mg of amphetamine sulphate were assayed by TLC and RIA. The two methods were comparable when the concentration of amphetamine by RIA was higher than 500 ng/cm^3. Maximum concentration between 707 and 5500 ng/cm^3 were found 15-30 hour after ingestion and 12.6-60.6% of the ingested dose were excreted in 70 hour peroid.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้ ที่ได้ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราพรรณ ด่านอุตรา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สรรเสริญ ทรัพยโตษก

รองศาสตราจารย์นายแพทย์ วิชัย โปษยะจินดา

อาจารย์ ดร.ปรีดา ชัยศิริ

รองศาสตราจารย์นายแพทย์ เทพ หิมะทองคำ

ภาควิชาชีวเคมี สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยยาเสพติด และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการฝ่ายเวชศาสตร์ประชากร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณสภาวิจัยแห่งชาติที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ฆ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

รายการตารางประกอบ ..... ฌ

รายการรูปประกอบ ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ 1

2. เคมีภัณฑ์และเครื่องมือ

2.1 เคมีภัณฑ์ 15

2.2 สารมาตราฐาน 15

2.3 เครื่องมือ 16

2.4 ตัวอย่างปัสสาวะ 16

3. วิธีการ

3.1 การเตรียมสารละลาย 17

3.2 การเตรียมแผ่นซิลิกาเจล 19

3.3 การสกัดแอมเฟตามีนจากปัสสาวะ 20

3.4 การเตรียมอนุพันธ์ Amphetamine-NBD 20

3.5 การวิเคราะห์ 20

3.5.1 วิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี 20

3.5.2 วิธีสเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรี 21

3.5.3 วิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ 23

4. ผลการทดลอง

4.1 วิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี

4.1.1 ผลการศึกษาความจำเพาะของอนุพันธ์ NBD-Cl กับอะมีนชนิดต่าง ๆ 33

4.1.2 ผลการศึกษาความไวของวิธีวิเคราะห์ 33

4.1.3 ผลการวิเคราะห์แอมเฟตามีนในปัสสาวะของอาสาสมัคร. 37

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

4.2 วิธีสเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรี

4.2.1 ผลการศึกษา excitation และ emission spectrum 38

4.2.2 ผลการศึกษาความแม่นยำของการอ่านค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์ 38

4.2.3 ผลการศึกษาความแม่นยำและความถูกต้องของการวิเคราะห์ 38

4.2.4 ผลการศึกษาอิทธิพลของการตกตะกอนโปรตีน 43

4.3 วิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์

4.3.1 ผลการศึกษาตามวิธีที่บริษัทแนะนำ 47

4.3.2 ผลการศึกษาหารายละเอียดที่เหมาะสมในการทำราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ 49

4.3.3 ผลการศึกษาอิทธิพลของปัสสาวะคนปกติต่อกราฟมาตราฐาน 53

4.3.4 ผลการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์ 58

4.3.5 ผลการวิเคราะห์แอมเฟตามินในปัสสาวะตัวอย่างจากอาสาสมัคร 64

4.3.6 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์แอมเฟตามินในปัสสาวะ โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี และราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ 67

4.3.7 ผลการควบคุมคุณภาพของวิธีวิเคราะห์ 67

5. วิจารณ์ผลการทดลอง 70

เอกสารอ้างอิง 78

ประวัติผู้เขียน 84

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1.	ข้อเปรียบเทียบของวิธีวิเคราะห์แอมเฟตามีน	12
2.	รายละเอียดการทำราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ เพื่อศึกษาตามวิธีที่บริษัทแนะนำ	23
3.	รายละเอียดการทำราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ เพื่อศึกษาหาปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสม	24
4.	รายละเอียดการทำราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ เพื่อศึกษารายละเอียดวิธีทำที่เหมาะสม	25
5.	รายละเอียดการทำราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ เพื่อศึกษาอิทธิพลของบัสสาวะต่อกราฟมาตราฐาน	27
6.	รายละเอียดการทำราดิโออิมมิวโนแอสเสย์ เพื่อศึกษาการวิเคราะห์แอมเฟตามีน	28
7.	ผลการวิเคราะห์อนุพันธ์ NBD-Cl ของอะมีนต่าง ๆ ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตรกราฟฟี	35
8.	ความแม่นยำของการอ่านค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์	40
9.	ความแม่นยำและความถูกต้องของการวิเคราะห์แอมเฟตามีนด้วยวิธีสเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรี	42
10.	ความแม่นยำของการอ่านค่าความเรืองแสงสัมพัทธ์	44
11.	ความแม่นยำและความถูกต้องของการวิเคราะห์แอมเฟตามีนด้วยวิธีสเปคโตรฟลูออโรโฟโตเมทรี	46
12.	ความจำเพาะของแอนติแอมเฟตามีน	58
13.	ความแม่นยำของการวิเคราะห์แอมเฟตามีนด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์	62
14.	ความถูกต้องของการวิเคราะห์แอมเฟตามีนด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์	63
15.	ปริมาณสูงสุดในบัสสาวะตัวอย่างจากอาสาสมัครที่รับประทานแอมเฟตามีนซัลเฟต 5 มิลลิกรัม	64
16.	ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์แอมเฟตามีนในบัสสาวะ โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี และราดิโออิมมิวโนแอสเสย์	68

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1.	โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่มแอมเฟตามีน	3
2.	วิธีการเปลี่ยนรูปของแอมเฟตามีน	5
3.	ปฏิกิริยาระหว่างแอมเฟตามีนกับ NBD-Cl	8
4.	หลักการณ์ของวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์	10
5.	กราฟมาตราฐานแสดงการคำนวณความไวของวิธีวิเคราะห์	30
6.	วิธีหาความจำเพาะของแอนติบอดี	31
7.	โครมาโตแกรมแสดงตำแหน่งของอนุพันธ์ NBD-Cl	34
8.	โครมาโตแกรมของปัสสาวะตัวอย่างจากอาสาสมัครรายที่ 1 ก่อนรับประทานแอม-เฟตามีนซัลเฟต	36
9.	โครมาโตแกรมของอนุพันธ์แอมเฟตามีนจากปัสสาวะตัวอย่างของอาสาสมัครรายที่ 5 ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน	37
10.	รูปแบบของการกระตุ้นและการคายแสงของ amphetamine-NBD.....	39
11.	กราฟมาตราฐานของ amphetamine-NBD	41
12.	กราฟมาตราฐานของ amphetamine-NBD	45
13.	กราฟมาตราฐานของการวิเคราะห์แอมเฟตามีนด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์....	48
14.	การหาปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสม	50
15.	อิทธิพลของปริมาณแอนติบอดีต่อกราฟมาตราฐาน	51
16.	อิทธิพลปริมาณแอมเฟตามีนติดฉลากต่อกราฟมาตราฐาน	52
17.	อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาต่อการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว	54
18.	อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการรวมตัวของแอมเฟตามีนกับแอนติบอดี	55
19.	อิทธิพลเวลาต่อการรวมตัวของแอมเฟตามีนกับแอนติบอดี	56
20.	อิทธิพลของปัสสาวะคนปกติต่อกราฟมาตราฐาน	57
21.	กราฟมาตราฐานของการวิเคราะห์แอมเฟตามีนด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์.....	60
22.	กราฟมาตราฐานของการวิเคราะห์แอมเฟตามีนด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์.....	61
23.	ปริมาณของแอมเฟตามีนที่ขับถ่ายออกทางปัสสาวะของอาสาสมัคร 5 ราย	65
24.	ปริมาณสะสมของแอมเฟตามีนที่ขับถ่ายออกทางปัสสาวะของอาสาสมัคร 5 ราย ...	66
25.	คุณภาพของวิธีวิเคราะห์แอมเฟตามีนด้วยวิธีราดิโออิมมิวโนแอสเสย์.....	69