

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 วัสดุอุปกรณ์

- 2.1.1 Gas Chromatograph, 6890N Series GC system, Agilent Technologies, U.S.A.
 - a) GC capillary-column, HP5-MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), J&W Scientific
- 2.1.2 Mass spectrometer, 5973inert Mass Selective Detector Series MS system, Agilent Technologies, U.S.A.
 - a) Vacuum turbo-pumps
 - b) Electron ionization (EI) mode
 - c) Quadrupole mass analyzer
- 2.1.3 Multi Purpose Sampler MPS 2, Gertsel, Germany
- 2.1.4 Solid phase microextraction fiber, Supelco, U.S.A.
 - a) 65 μm Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB)
- 2.1.5 เครื่องชั่งสาร, Ohaus, U.S.A
- 2.1.6 เครื่องชั่งสารอย่างละเอียด, Mettler Toledo, Switzerland
- 2.1.7 เครื่องผสมสาร, Thermolyne, U.S.A
- 2.1.8 ตู้อบ, Memmert, Germany
- 2.1.9 บล็อกให้ความร้อน, Pierce, U.S.A
- 2.1.10 Microsyringe ขนาด 10 ไมโครลิตร, Gerstel, Australia
- 2.1.11 เครื่องระเหยสาร, Pierce, U.S.A
- 2.1.12 Reacti-THERM, Pierce, U.S.A
- 2.1.13 Manual crimper, 20 mm, Agilent Technologies, U.S.A.
- 2.1.14 Manual crimper, 11 mm, Agilent Technologies, U.S.A.
- 2.1.15 Manual decapper, 20 mm, Agilent Technologies, U.S.A.
- 2.1.16 Manual decapper, 11 mm, Agilent Technologies, U.S.A.
- 2.1.17 10ml, clear 23 x 46 mm headspace screw top vials, Gertsel, Germany

- 2.1.18 2ml, clear 12 x 32 mm crimp top vials, Gertsel, Germany
- 2.1.19 Screw caps with septa for 18 mm vials, magnetic, septum silicone blue transparent/PTFE white, Gertsel, Germany
- 2.1.20 Crimp caps for 11 mm vials, red silicone rubber/PTFE septa, La-Pha-Pack, Germany
- 2.1.21 Positive displacement pipette, Gilson SAS, France
- 2.1.22 Capillaries and pistons, Gilson SAS, France

2.2 สารเคมี

- 2.2.1 Amphetamine hydrochloride (AP•HCl), Purity 99.84%, Lipomed, Switzerland
- 2.2.2 Methamphetamine hydrochloride (MA•HCl), Purity 99.42%, Lipomed, Switzerland
- 2.2.3 Methamphetamine-d5 hydrochloride (MA-d5•HCl), Purity 99.04%, Lipomed, Switzerland
- 2.2.4 Hydrochloric acid 37% (HCl), AR grade, Merck, Germany
- 2.2.5 Sodium hydroxide (NaOH), ACS grade, Merck, Germany
- 2.2.6 Potassium carbonate (K_2CO_3), AR grade, Fisher Scientific, UK
- 2.2.7 Methanol, HPLC grade, Fisher Scientific, UK
- 2.2.8 Heptafluorobutyric chloride (HFBCl), Purity 95%, Tokyo kasei, Japan
- 2.2.9 Heptafluorobutyric anhydride (HFBA), Purity 99%, Sigma-aldrich, Switzerland
- 2.2.10 N-Methyl-bis(trifluoroacetamide) (MBTFA), Purity 99%, Sigma-aldrich, Switzerland
- 2.2.11 N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane (MSTFA+1%TMCS), GC grade, Sigma-aldrich, Switzerland
- 2.2.12 Trifluoroacetic acid (TFAA), Purity 98%, Sigma-aldrich, Switzerland
- 2.2.13 Dimethyl sulfoxide (DMSO), ACS grade, Amresco, USA
- 2.2.14 Ethyl acetate, AR grade, Lab-scan, Thailand
- 2.2.15 Acetone, AR grade, B.D.H., UK

2.2.16 Helium gas, 99.999% (UHP grade), TIG, Thailand

2.2.17 Nitrogen gas, 99.99% (HP grade), TIG, Thailand

2.3 การเตรียมสารมาตรฐานและสารละลายอื่นๆ

2.3.1 การเตรียม stock standard solution

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานของแอมเฟตามีน เมทแอมเฟตามีน และ MA-d5 ให้มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมสารมาตรฐาน AP•HCl (Lipomed, Purity 99.84%), MA•HCl (Lipomed, Purity 99.42%) และ MA-d5•HCl (Lipomed, Purity 99.04%) ละลายในเมทานอลให้มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3.2 การเตรียม working standard solution

เตรียมโดยเจือจาง stock standard solution ของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน ให้มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ และในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ แบบ serial dilutions ให้มีความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 และ 0.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังตาราง 2.1 ก่อนนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตาราง 2.1 การเตรียม working standard solution

สารละลาย มาตรฐาน	ความเข้มข้นของ working standards solutions (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	First dilution	Serial dilutions
แอมเฟตามีน	20	1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.02
เมทแอมเฟตามีน	20	1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.02

2.3.3 การเตรียม working internal standard solution

เตรียมโดยเจือจาง stock internal standard solution ของ MA-d5 ให้มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ และในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ให้มีความเข้มข้น 0.6, 0.3 และ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังตาราง 2.2 ก่อนนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตาราง 2.2 การเตรียม working internal standard solution

สารละลาย มาตรฐาน	ความเข้มข้นของ working internal standards solutions (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	First dilution	Serial dilutions
MA-5	20	0.6, 0.3, 0.1

2.3.4 การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

เตรียมโดยชั่งสารโพแทสเซียมคาร์บอเนตให้มีน้ำหนัก 138.21 กรัม จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้น 1 โมลาร์

2.3.5 การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

เตรียมโดยนำกรดไฮโดรคลอริก 37% ปริมาตร 48.25 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้น 1 โมลาร์

2.3.6 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

เตรียมโดยชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้มีน้ำหนัก 40 กรัม จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้น 1 โมลาร์

2.4 วิธีดำเนินการ

2.4.1 สภาวะของเฮดสเปสโพลีลิด-เฟสไมโครเอ็กซ์แทรกชัน (HS-SPME) และแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC/MS)

สภาวะของเฮดสเปสโพลีลิด-เฟสไมโครเอ็กซ์แทรกชัน (HS-SPME) ที่ใช้ตรวจวัดหาปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผม ตามวิธีของมอนด์นีย์ (Monnatee *et al.*, 2008) ซึ่งมีค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

- 1) ไฟเบอร์ชนิด PDMS/DVB, 65 ไมโครเมตร
- 2) อุณหภูมิในการอบ (incubation) คือ 90 องศาเซลเซียส
- 3) ระยะเวลาในการอบ (incubation) คือ 5 นาที
- 4) อุณหภูมิในการสกัด (extraction) คือ 90 องศาเซลเซียส
- 5) ระยะเวลาในการสกัด (extraction) คือ 10 นาที
- 6) อุณหภูมิของ desorption คือ 250 องศาเซลเซียส
- 7) ระยะเวลาของ desorption คือ 5 นาที
- 8) อุณหภูมิของ bake-out คือ 270 องศาเซลเซียส
- 9) ระยะเวลาของ bake-out คือ 5 นาที

สภาวะของแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC/MS) ที่ใช้ตรวจวัดหาปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผม ตามวิธีของมอนด์นีย์ (Monnatee *et al.*, 2008) ซึ่งมีค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

- 1) คอลัมน์ชนิด HP-5MS; ความยาวคอลัมน์ 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ 0.25 มิลลิเมตร และความหนาของ film thickness fused silica capillary column 0.25 ไมโครเมตร
- 2) ส่วนให้ความร้อน (oven) กำหนดค่าอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 60 องศาเซลเซียสและคงอุณหภูมิไว้ 2.5 นาที จากนั้นจึงเพิ่มอุณหภูมิขึ้น 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส จากนั้นให้คงอุณหภูมิไว้ 1 นาที รวมใช้เวลาทั้งหมด 12.5 นาที
- 3) อัตราการเคลื่อนที่ของแก๊สฮีเลียม (flow rate) คือ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
- 4) อุณหภูมิของ injection port ที่ 250 องศาเซลเซียส
- 5) อุณหภูมิของ interface/transfer line ที่ 280 องศาเซลเซียส
- 6) อุณหภูมิของ MS source ที่ 230 องศาเซลเซียส
- 7) อุณหภูมิของ MS quadrupole ที่ 150 องศาเซลเซียส

8) การเก็บข้อมูลแบบสแกน (scan mode) ของแอมเฟตามีน เมทแอมเฟตามีน และ MA-d5 โดยเลือกใช้ช่วงสแกนตั้งแต่ 45-550 atomic mass unit (amu.) เพื่อศึกษา retention time และผลจากการทำข้อมูลแบบสแกนจะนำไปเลือกค่ามวลต่อประจุของสาร (m/z) จำนวน 3 ไอออนต่อหนึ่งสารมาตรฐาน เพื่อนำไปใช้ในการเก็บข้อมูลแบบ SIM mode ของแอมเฟตามีน เมทแอมเฟตามีน และ MA-d5 เพื่อใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของขั้นตอนการสกัดเส้นผมต่อไป

2.4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของขั้นตอนการสกัดจากตัวอย่างเส้นผมจากผู้เสพยาบ้า

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดด้วยสารละลายที่เป็นกรดและด่างในเส้นผม โดยทดสอบสภาวะที่เหมาะสม 3 สภาวะ คือ ระยะเวลาที่ใช้สกัดเส้นผมด้วยสารละลายที่เป็นกรดและด่างในช่วงเวลา 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที โดยกำหนดสภาวะอุณหภูมิและความเข้มข้นของสารละลายของการสกัดเส้นให้คงที่ จากนั้นทดสอบอุณหภูมิที่ใช้สกัดเส้นผมด้วยสารละลายที่เป็นกรดและด่างในช่วงอุณหภูมิ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส โดยกำหนดสภาวะเวลาและความเข้มข้นของสารละลายของการสกัดเส้นให้คงที่ และทดสอบความเข้มข้นของสารละลายสำหรับการสกัดเส้นผมด้วยสารละลายที่เป็นกรดและด่างในช่วงความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 โมลาร์ โดยกำหนดสภาวะเวลาและอุณหภูมิของการสกัดเส้นให้คงที่ (แสดงดังตาราง 2.3) สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างในการศึกษานี้ได้ประยุกต์วิธีของมนต์นที โดยใช้สารมาตรฐานภายในเป็น MA-d5 ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ใช้ benzaldehyde (0.0001% v/v) เป็นสารมาตรฐานภายใน วิธีการเตรียมตัวอย่างเส้นผมมีดังนี้ เริ่มจากเติมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนที่เตรียมในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ ลงในเส้นผม 20 มิลลิกรัมของอาสาสมัครบุคคลที่ไม่มีประวัติการใช้สารเสพติดที่ความเข้มข้น 1.0 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผมที่ปริมาตร 200 μ l และเติม MA-d5 ที่ความเข้มข้น 4.5 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ที่ปริมาตร 150 μ l ลงไปในขวด 10 มิลลิลิตร หมุนปิดฝาเกลียวขวดแก้วให้แน่น นำขวดแก้วไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 60 นาที และนำสารละลายที่สกัดจากเส้นผมย้ายลงในขวดแก้วชนิดฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร ขวดใหม่ จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่ปริมาตร 1,650 ไมโครลิตร ก่อนนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วย HS-SPME GC/MS

ผลจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดเส้นผมด้วยสารละลายกรดและด่างในหัวข้อนี้ จะนำไปใช้ในขั้นตอนการศึกษาสารเตรียมอนุพันธ์ (derivatizing reagents) ที่เหมาะสมในการตรวจหาปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผมด้วย HS-SPME GC-MS

ตาราง 2.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของขั้นตอนการสกัดด้วยสารละลาย HCl และ NaOH

สภาวะการสกัดเส้นผม	กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	โซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH)
1. ระยะเวลาการสกัด	20, 30, 40, 50, 60 นาที	20, 30, 40, 50, 60 นาที
2. อุณหภูมิที่ใช้สกัด	60, 70, 80, 90 องศาเซลเซียส	60, 70, 80, 90 องศาเซลเซียส
3. ความเข้มข้นของสารละลาย	0.1, 0.5, 1.0, 1.5 โมลาร์	

2.4.3 การศึกษาสารเตรียมอนุพันธ์ (derivatizing reagents) ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผม

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาสารเตรียมอนุพันธ์ 5 ชนิด ได้แก่ Trifluoroacetic acid (TFAA), Heptafluorobutyric anhydride (HFBA), Heptafluorobutyric chloride (HFBCl), N-Methyl-bis(trifluoroacetamide) (MBTFA) และ N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane (MSTFA+1%TMCS) ในการตรวจหาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนซึ่งจะทำ 3 ครั้งต่อหนึ่งสารเตรียมอนุพันธ์ ดังนี้

2.4.3.1 ศึกษาเปรียบเทียบสารเตรียมอนุพันธ์ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนด้วยวิธี direct injection GC-MS

1) TFAA สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างได้ทำตามวิธีของ Han (Han *et al.*, 2006) ดังนี้ เริ่มจากเติมสารละลายมาตรฐาน AP และ MA ที่ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติม MA-d5 (internal standard) ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในขวดแก้วขนาด 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่ผสมกันระหว่างเมทานอลกับกรดไฮโดรคลอริกในอัตราส่วนคือ 99:1 (v/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อปรับสภาพสารละลายให้เป็นกรด จากนั้นนำสารในขวดแก้วมาระเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 15 นาที จนเหลือแต่คราบตะกอนติดก้นหลอดทดลอง ทำการเติมสารเตรียมอนุพันธ์ TFAA 50 ไมโครลิตร และ ethyl acetate 50 ไมโครลิตร และปิดฝาขวดให้แน่น จากนั้นนำไปอุ่นในบล็อกร้อนให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นเปิดฝาขวดนำสารในขวดแก้วมาระเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที จนเหลือแต่คราบตะกอนติดก้นหลอดทดลอง ทำการเติมเมทานอล 25 ไมโครลิตร และปิดฝาขวดให้แน่น ก่อนใช้เข็มไมโครไซริงค์ดูดสารละลายในขวดแก้วปริมาตร 1 ไมโครลิตรฉีดเข้าเครื่อง GC-MS ด้วยวิธี direct injection

2) HFBA สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างได้ทำตามวิธีของ Skender (Skender *et al.*, 2002) ดังนี้ เริ่มจากเติมสารละลายมาตรฐาน AP และ MA ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติม MA-d5 (internal standard) ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในขวดแก้วขนาด 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่ผสมกัน ระหว่างเมทานอลกับกรดไฮโดรคลอริกในอัตราส่วนคือ 99:1 (v/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อปรับสภาพสารละลายให้เป็นกรด จากนั้นนำสารในขวดแก้วมาระเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจนที่ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 15 นาที จนเหลือแต่คราบตะกอนติดก้นหลอดทดลอง ทำการเติมสาร เตรียมอนุพันธ์ HFBA 50 ไมโครลิตร และ ethyl acetate 50 ไมโครลิตร และปิดฝาขวดให้แน่น จากนั้นนำไปอุ่นในบล็อคให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นเปิดฝาขวดนำ สารในขวดแก้วมาระเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที จนเหลือ แต่คราบตะกอนติดก้นหลอดทดลอง ทำการเติม ethyl acetate 25 ไมโครลิตร และปิดฝาขวดให้แน่น ก่อนใช้เข็มไมโครไซริงค์ดูดสารละลายในขวดแก้วปริมาตร 1 ไมโครลิตรฉีดเข้าเครื่อง GC-MS ด้วยวิธี direct injection

3) HFBCI สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างได้ประยุกต์ใช้ตามวิธีของ Skender (Skender *et al.*, 2002) และ Wu (Wu *et al.*, 2008) ดังนี้ เริ่มจากเติมสารละลายมาตรฐาน AP และ MA ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติม MA-d5 (internal standard) ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในขวด แก้วขนาด 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่ผสมกันระหว่างเมทานอลกับกรดไฮโดรคลอริกใน อัตราส่วนคือ 99:1 (v/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อปรับสภาพสารละลายให้เป็นกรด จากนั้นนำสาร ในขวดแก้วมาระเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 15 นาที จนเหลือแต่ คราบตะกอนติดก้นหลอดทดลอง ทำการเติมสารเตรียมอนุพันธ์ HFBCI 50 ไมโครลิตร และ ethyl acetate 50 ไมโครลิตร และปิดฝาขวดให้แน่น จากนั้นนำไปอุ่นในบล็อคให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 20 นาที จากนั้นเปิดฝาขวดนำสารในขวดแก้วมาระเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจนที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที จนเหลือแต่คราบตะกอนติดก้นหลอดทดลอง ทำการเติม ethyl acetate 25 ไมโครลิตร และปิดฝาขวดให้แน่น ก่อนใช้เข็มไมโครไซริงค์ดูดสารละลายในขวดแก้ว ปริมาตร 1 ไมโครลิตรฉีดเข้าเครื่อง GC-MS ด้วยวิธี direct injection

4) MBTFA + MSTFA with 1%TMCS สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างได้ ทำตามวิธีของ Cordero (Cordero *et al.*, 2007) ดังนี้ เริ่มจากเติมสารละลายมาตรฐาน AP และ MA ที่ ความเข้มข้น 1 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติม MA-d5 (internal standard) ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในขวดแก้วขนาด 2 มิลลิลิตร ทำการเติมสารเตรียมอนุพันธ์ MBTFA 15 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารในขวดแก้วมา ระเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 15 นาที จนเหลือแต่คราบตะกอน



ติดกันตลอดทดลอง ทำการเติมสารเตรียมอนุพันธ์ MSTFA+1%TMCS 30 ไมโครลิตร และปิดฝาขวดให้แน่นจากนั้นนำไปอุ่นในบล็อกลให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 60 นาที ทำการเติมสารเตรียมอนุพันธ์ MBTFA 10 ไมโครลิตร และปิดฝาขวดให้แน่นจากนั้นนำไปอุ่นในบล็อกลให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 30 นาที ก่อนใช้เข็มไมโครไซริงค์ดูดสารละลายในขวดแก้ว ปริมาตร 1 ไมโครลิตรฉีดเข้าเครื่อง GC-MS ด้วยวิธี direct injection

2.4.3.2 ศึกษาเปรียบเทียบสาร HFBA, HFBCI และ HFBCI:HFBA (8:2 v/v) ร่วมกับสภาวะการสกัดด้วยสารละลายกรดและด่างที่เหมาะสม ในการตรวจหาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนด้วยวิธี HS-SPME GC-MS

วิธีการเตรียมตัวอย่างของสารเตรียมอนุพันธ์ 3 ชนิด สำหรับตรวจหาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน โดยเริ่มจากเติมสารละลายมาตรฐาน AP และ MA ที่เตรียมใน 1M HCl หรือ 0.5M NaOH ให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติม MA-d5 (internal standard) ที่เตรียมใน 1M HCl หรือ 0.5M NaOH ให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในขวดแก้วชนิดฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร หมุนปิดฝาเกลียวขวดแก้วให้แน่น จากนั้นนำไปเตรียมอนุพันธ์โดยเติมสาร HFBA หรือ HFBCI หรือ HFBCI:HFBA (8:2 v/v) 50 ไมโครลิตร และเติมสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่ปริมาตร 1,650 ไมโครลิตร ก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี automated HS-SPME GC-MS

2.4.3.3 เปรียบเทียบสภาวะของสาร HFBCI ภายใต้สภาวะการสกัดด้วยสารละลายกรดและสารผสม HFBCI:HFBA (8:2 v/v) ภายใต้สภาวะการสกัดด้วยสารละลายด่างในการตรวจหาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผมด้วยวิธี automated HS-SPME GC-MS

ภายหลังจากการศึกษาสารเตรียมอนุพันธ์ทั้ง 3 ชนิด ข้างต้น ภายใต้สภาวะการสกัดเส้นผมด้วยกรดและด่างที่เหมาะสม นำสภาวะที่เหมาะสมในหัวข้อ 2.4.3.2 มาทดสอบสภาวะของวิธีการตรวจหาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผมของอาสาสมัครบุคคลที่ไม่มีประวัติการใช้สารเสพติด 20 มิลลิกรัม ที่ผ่านการเติมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีน ที่ความเข้มข้น 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม

สภาวะการสกัดเส้นผมด้วยกรดร่วมกับสาร HFBA และสภาวะการสกัดด้วยด่างร่วมกับสาร HFBCI:HFBA (8:2 v/v) โดยเติมสารละลายมาตรฐาน AP และ MA ที่เตรียมใน 1M HCl หรือ 0.5 M NaOH ให้มีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในเส้นผม 20 มิลลิกรัมของอาสาสมัครบุคคลที่ไม่มีประวัติการใช้สารเสพติดที่ความเข้มข้น 0.2 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม และเติม MA-d5 (internal standard) ที่เตรียมใน 1 M HCl หรือ 0.5 M

NaOH ให้มีความเข้มข้น 300 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 2.25 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ลงไปในขวด 10 มิลลิลิตร หมุนปิดฝาเกลียวขวดแก้วให้แน่น นำขวดแก้วไปอบในตู้อบลมร้อนภายใต้สภาวะการสกัดเส้นผมด้วยกรดและด่างที่เหมาะสมตามผลการศึกษาในหัวข้อ 2.4.2 สำหรับการสกัดด้วยกรดนำขวดแก้วไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 60 นาที ส่วนการสกัดด้วยด่างนำขวดแก้วไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 30 นาที และนำสารละลายที่สกัดจากเส้นผมย้ายลงในขวดแก้วชนิดฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร ขวดใหม่ และนำไปเตรียมอนุพันธ์โดยเติมสาร HFBCl 50 ไมโครลิตร ลงในขวดที่สกัดเส้นผมด้วยกรด หรือ HFBCl:HFBA (8:2 v/v) 50 ไมโครลิตร ลงในขวดที่สกัดเส้นผมด้วยด่าง จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่ปริมาตร 1,650 ไมโครลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี automated HS-SPME GC-MS

2.5 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

นำวิธีที่ได้จากการเตรียมอนุพันธ์ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์หาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผมในหัวข้อที่ 2.4.3.3 มาทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตามแนวปฏิบัติของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA, 2001) โดยวิธีการเตรียมตัวอย่างมีดังนี้ เติมสารละลายมาตรฐานแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่เตรียมในสารละลายต่างความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในเส้นผม 20 มิลลิกรัม ของอาสาสมัครบุคคลที่ไม่มีประวัติการใช้สารเสพติด และเติม MA-d5 (internal standard) ที่ความเข้มข้น 2.25 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงไปในขวด 10 มิลลิลิตร หมุนปิดฝาเกลียวขวดแก้วให้แน่น นำขวดแก้วไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 30 นาที และนำสารละลายที่สกัดจากเส้นผมย้ายลงในขวดแก้วชนิดฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร ขวดใหม่ และนำไปเตรียมอนุพันธ์โดยเติมสาร HFBCl:HFBA (8:2 v/v) 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่ปริมาตร 1,650 ไมโครลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HS-SPME GC/MS

2.5.1 การหาค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงของการวัด (working range)

การทดสอบความเป็นเส้นตรงของ standard curve ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณจากเครื่องตรวจวัดและความเข้มข้นของสาร ในการทดสอบนี้จะเติมสารละลายมาตรฐานแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน ลงในเส้นผม 20 มิลลิกรัมของอาสาสมัครบุคคลที่ไม่มีประวัติ

การใช้สารเสพติดที่ 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0.2, 0.5, 1, 2.5, 5 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ตามวิธีในหัวข้อที่ 2.5 โดยจะทดสอบความเป็นเส้นตรงแบบภายในวันเดียวกัน ทำ 3 ครั้งต่อหนึ่งความเข้มข้นภายในหนึ่งวัน ในขณะที่การทดสอบความเป็นเส้นตรงแบบระหว่างวัน จะทำ 3 ครั้งต่อหนึ่งความเข้มข้นและทำต่อเนื่องกัน 4 วัน จากนั้นนำมาสร้างกราฟมาตรฐานและหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r²)

2.5.2 การหาค่าความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ของการวิเคราะห์

การทดสอบความถูกต้องคือ การทดสอบความสามารถของระบบตรวจวิเคราะห์ที่สามารถหาระดับค่าความใกล้เคียงของสารระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าอ้างอิงมาตรฐาน หรือในกรณีที่มีกำรวัดซ้ำ ค่าเฉลี่ยของค่าที่วัดได้ควรมีค่าใกล้เคียงกับค่าอ้างอิงมาตรฐาน ส่วนการทดสอบความเที่ยงคือ การทดสอบหาปริมาณของสารในตัวอย่างเดียวกันหลายๆครั้ง และให้ผลที่ใกล้เคียงกันในกลุ่มของการตรวจวิเคราะห์ การทดสอบนี้จะเติมสารละลายมาตรฐานแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน ลงในเส้นผม 20 มิลลิกรัมของอาสาสมัครบุคคลที่ไม่มีประวัติการใช้สารเสพติดที่ความเข้มข้นต่ำ กลาง และสูง ของ standard curve ซึ่งในการทดสอบใช้ที่ความเข้มข้น 0.5, 2.5 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ตามลำดับ ในการทดสอบภายในวันเดียวกัน จะทำ 7 ครั้งในแต่ละความเข้มข้น ส่วนการทดสอบระหว่างวัน จะทำ 3 ครั้งต่อหนึ่งความเข้มข้นและทำต่อเนื่องกัน 4 วัน จากการทดสอบความถูกต้องสามารถคำนวณหา %relative recovery (%RR) ด้วยการหาสัดส่วนของระดับสารที่ได้จากการทดลองต่อระดับสารของค่าอ้างอิงมาตรฐานมาคูณด้วย 100 ซึ่งมีช่วงที่สามารถยอมรับได้ไม่เกิน ±15% RR ทั้งในการทดสอบภายในวันเดียวกันและการทดสอบระหว่างวัน ดังนี้

$$\% \text{relative recovery} = (\text{ระดับสารที่ได้จากการทดลอง} / \text{ระดับสารของค่าอ้างอิงมาตรฐาน}) \times 100$$

สำหรับผลของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่ได้จากการทดสอบความเที่ยงสามารถนำมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%coefficient of variation; %CV) ด้วยการนำค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) มาหารสัดส่วนต่อค่าเฉลี่ย (mean, \bar{X}) และคูณด้วย 100 โดยมีช่วงที่สามารถยอมรับได้ไม่เกิน 15% ทั้งแบบ intra-day และ inter-day ดังนี้

$$\% \text{CV} = (\text{ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน} / \text{ค่าเฉลี่ยของข้อมูล}) \times 100$$

2.5.3 การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation; LOQ)

LOD เป็นการทดสอบหาขีดความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะตรวจหาความเข้มข้นต่ำสุดของปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่สามารถตรวจพบได้ โดยมี %RR และ %CV ที่ระดับความเข้มข้นนี้เกินกว่า ± 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่า LOQ เป็นการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่สามารถตรวจวัดและบอกปริมาณได้อย่างถูกต้องและมีความเที่ยง โดยมี %RR และ %CV ที่ความเข้มข้นนี้ต่ำกว่า $\pm 15\%$ สำหรับวิธีการทดสอบเพื่อหาค่า LOD และ LOQ นี้ จะเดิมสารละลายมาตรฐานแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนลงในเส้นผม 20 มิลลิกรัมของอาสาสมัครบุคคลที่ไม่มีประวัติการใช้สารเสพติดที่ความเข้มข้น 0.10, 0.15 และ 0.20 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ซึ่งทำการวิเคราะห์ 10 ครั้งต่อหนึ่งความเข้มข้น

2.6 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างเส้นผมจากผู้ที่ใช้ยาบ้า

2.6.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษาวิจัย

กลุ่มตัวอย่างเส้นผมที่ใช้สำหรับการศึกษานี้ได้รับการอนุมัติให้ศึกษาวิจัยโดยผ่านมติของคณะกรรมการจริยธรรมของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อวันที่ 28 กรกฎาคม 2552 (รายละเอียดการเก็บตัวอย่างเส้นผม แสดงไว้ในภาคผนวก ก) ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการเก็บและตรวจวิเคราะห์หาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน โดยวิธีของมอนตันที (Monnatee *et al.*, 2008) จากโครงการวิจัยเรื่อง “การลดพฤติกรรมเสี่ยงต่อการ ติดเชื้อ เอช ไอ วี (HIV) และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ในเยาวชนที่เกี่ยวข้องกับยาเสพติดในภาคเหนือของประเทศไทย: ระยะที่ 2 การแทรกแซง” จำนวน 95 ราย และให้ผลบวก (positive) เท่ากับ 31% จากจำนวนตัวอย่างเส้นผมทั้งหมด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้คำนวณหาขนาดตัวอย่างด้วยการประมาณค่าสัดส่วนในข้อมูลเชิงกลุ่มของงานวิจัยโดยใช้สูตรในการคำนวณ คือ

$$n = \frac{N Z_{\alpha}^2 pq}{N E^2 + Z_{\alpha}^2 pq}$$

n = จำนวนขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

N = จำนวนกลุ่มตัวอย่าง

$$\begin{aligned}
 Z_{\alpha} &= \text{ณ ช่วงความเชื่อมั่นที่ 95\% ได้ค่า 1.96} \\
 p &= \text{ค่าสัดส่วนของตัวอย่างที่ต้องการเท่ากับ 0.31} \\
 q &= \text{ค่าสัดส่วนของตัวอย่างที่ไม่ต้องการเท่ากับ 0.69} \\
 E &= \text{ค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ได้ค่า 0.1}
 \end{aligned}$$

$$n = \frac{95 (1.96)^2 (0.31)(0.69)}{95 (0.1)^2 + (1.96)^2 (0.31)(0.69)}$$

$$n = 44.06$$

ดังนั้นขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมกับการศึกษานี้คือ จำนวน 45 ราย โดยจะเลือกตัวอย่างตามความน่าจะเป็น (probability sampling) โดยใช้ตารางเลขสุ่ม (table of random numbers) ซึ่งเป็นตารางที่ประกอบไปด้วยเลข 0-9 อาจจะเป็นเลขหลักเดียวหรือหลายหลัก โดยให้เลขเหล่านั้นมีโอกาสถูกเลือกเท่าๆกัน วิธีการสุ่มเริ่มจากกำหนดเลขที่ให้กับทุกตัวอย่างเส้นผม โดยให้จำนวนหลักของเลขที่เท่ากับจำนวนหลักของขนาดประชากรคือ 01-95 เลือกเลข 2 หลักจากตารางเลขสุ่ม ใช้เลข 2 ตัวแรกของแต่ละบรรทัด โดยเริ่มจากแถวบนซ้ายสุดลงมาข้างล่างจนครบการสุ่มตัวอย่างขนาด 45 ราย หากพบว่าหมายเลขที่ปรากฏไม่มีในประชากรหรือซ้ำก็จะต้องตัดตัวเลขเหล่านี้ทิ้งไป และเลือกตัวเลขใหม่จนครบจำนวนตัวอย่างที่กำหนดไว้ (กัลยา, 2539)

2.6.2 ปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างเส้นผมจากผู้เสพยาบ้า

สำหรับวิธีการตรวจหาระดับแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน ในกลุ่มตัวอย่างที่สุ่มมาทั้ง 45 ราย โดยการนำเส้นผมตัวอย่างที่มีมาทำการชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 20 มิลลิกรัม ใส่ในขวดแก้วชนิดฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร เติม 200 ไมโครลิตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เพื่อทำการสกัดสารแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนออกมาจากเส้นผม จากนั้นเติม MA-d5 ความเข้มข้น 2.25 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมเส้นผม ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงไป และหมุนปิดฝาเกลียวขวดแก้วให้แน่น นำขวดแก้วไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 30 นาที และนำสารละลายที่สกัดจากเส้นผมย้ายลงในขวดแก้วชนิดฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร ขวดใหม่ ก่อนนำไปเตรียมอนุพันธ์โดยเติมสาร HFBCI:HFBA (8:2 v/v) 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่ปริมาตร 1,650 ไมโครลิตร

ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HS-SPME GC-MS เพื่อตรวจวิเคราะห์หาแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนในเส้นผม

2.6.3 ศึกษาหาความสอดคล้องกัน (measure of agreement) ของผลการตรวจวัดปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนจากตัวอย่างเส้นผมจากผู้ให้สเปยาบ้า ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการศึกษานี้กับวิธีการศึกษาของมนต์นที (Monnatee *et al.*, 2008)

เปรียบเทียบผลการตรวจพบโดยคิดเป็นร้อยละของแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน และหาช่วง (range) ของปริมาณที่ตรวจพบ จากนั้นเปรียบเทียบความสอดคล้องกันระหว่างผลการตรวจวิเคราะห์แอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนของทั้ง 2 วิธี โดยใช้ Cohen's Kappa statistic

2.7 สถิติที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูล

2.7.1 Descriptive statistics สถิติที่ใช้ คือค่าเฉลี่ย ค่าสูงสุด ค่าต่ำสุด ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ค่า 95 %CI เพื่อนำมาใช้อธิบายระดับของแอมเฟ- ตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่ตรวจพบในเส้นผมของกลุ่มตัวอย่าง

2.7.2 เปรียบเทียบเมทแอมเฟตามีนที่ตรวจพบในเส้นผมที่ผ่านการสกัดด้วยกรด (HCl) ในการศึกษาสภาวะระยะเวลา อุณหภูมิ และความเข้มข้นที่เหมาะสมตามหัวข้อที่ 2.4.2 และการสกัดด้วยด่าง (NaOH) ในการศึกษาสภาวะระยะเวลา อุณหภูมิ และความเข้มข้นที่เหมาะสมตามหัวข้อที่ 2.4.2 ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ compare means ชนิด One-Way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบระดับที่แตกต่างกันของเมทแอมเฟตามีนที่ตรวจพบในแต่ละสภาวะการสกัด และกำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

2.7.3 เปรียบเทียบแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีนที่ตรวจพบในการศึกษาสารเตรียมอนุพันธ์ (derivatising Agents) แต่ละชนิด ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ compare means ชนิด One-way ANOVA เพื่อเปรียบเทียบระดับที่แตกต่างกันของสาร AP และ MA และกำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

2.7.4 ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณแอมเฟตามีนและเมทแอมเฟตามีน จากตัวอย่างเส้นผมจริงกลุ่มเดียวกัน ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยการศึกษารั้งนี้กับการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Monnatee (Monnatee *et al.*, 2008) ด้วย Cohen's Kappa statistic เพื่อประเมินระดับความสอดคล้องกันของทั้ง 2 วิธีการตรวจวิเคราะห์