

เนื้อเรื่อง

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาเป็นปัสสาวะผู้สูบบุหรี่ โดยนำมาทดสอบทันทีและบางส่วนเก็บใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มล. หลอดละ 500 μ L เก็บที่อุณหภูมิ 4°C, -8°C และ -20°C จนกว่าการทดสอบ

2. สารเคมีและน้ำยา

2.1 สารเคมี

สารเคมี	สูตรโมเลกุล	น้ำหนัก โมเลกุล	เกรด	บริษัทที่ผลิต
Acetone	C ₃ H ₆ O	58.08	AR	BDHAnalaR [®]
Barbituric acid	C ₄ H ₄ N ₂ O ₃	128.09	AR	ALDRICH
Chloramine-T	C ₇ H ₇ ClNO ₂ S·Na(3H ₂ O)	227.64	AR	Sigma
Potassium cyanide	KCN	65.12	AR	MERCK
Sodium acetate	C ₂ H ₃ NaO ₂	82.03	AR	BDHAnalaR [®]
Glacial acetic acid	CH ₃ COOH	60.05	AR	BDHAnalaR [®]
Conc. HCl	HCl	36.46	AR	J.T.Baker
Sodium metabisulfite	Na ₂ S ₂ O ₅	190.11	AR	J.T.Baker
Cotinine standard	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	176.21	AR	Sigma

2.2 น้ำยา

2.2.1 Barbituric acid in acetone : H₂O (50% v/v) ความเข้มข้น 78 mM

เตรียมสารละลาย acetone : H₂O ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อใช้เป็นตัวทำละลาย ซึ่ง barbituric acid 9.991 กรัม ละลายให้เข้ากัน ปริมาตรจนครบ 1,000 มล. เก็บสารละลายไว้ที่ 4°C จนกว่าจะใช้งาน

2.2.2 Chloramine-T ความเข้มข้น 0.4 mol/L

ซึ่ง chloramine-T 18.21 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 200 มล. เก็บสารละลายไว้ที่ 4°C จนกว่าจะใช้งาน

2.2.3 Potassium cyanide solution ความเข้มข้น 1.5 mol/L

ซึ่ง KCN จำนวน 19.53 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรจนครบ 200 มล. (สารละลายมีกลิ่นและมีฤทธิ์กัดกร่อนจึงควรระมัดระวังในการเตรียม และควรเตรียมสารในตู้ดูดควัน) เก็บสารละลายไว้ที่ 4°C จนกว่าจะใช้งาน

2.2.4 Sodium acetate buffer ความเข้มข้น 4 mol/L, pH 4.7

ซึ่ง sodium acetate จำนวน 126.46 กรัม ละลายน้ำ สารละลายจะเย็นระหว่างการละลาย เติม glacial acetic acid 61.14 มล. ปรับ pH ให้ได้ 4.7 ด้วย conc. HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มล. (conc. HCl มีความเป็นกรดสูง การปรับ pH จึงควรรนำกรดใส่ลงในสารละลายที่ละน้อยและควรเตรียมสารในตู้ดูดควัน) เก็บสารละลายไว้ที่ 4°C จนกว่าจะใช้งาน

2.2.5 Cotinine standard ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{mol/L}$

ละลาย cotinine standard ที่เก็บไว้ 4°C จำนวน 0.0176 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 100 มล. เก็บสารละลายไว้ที่ 4°C จนกว่าจะใช้งาน เนื่องจากสาร cotinine standard ดูดความชื้นได้ จึงควรชั่งสารอย่างรวดเร็ว

3. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่สำคัญ

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 หลอดทดลองขนาด 13×100 มม.

3.1.2 หลอดหยด (dropper) พลาสติก ขนาด 1 มล. ที่มีขีดบอกปริมาตรที่ 100, 250 และ 500 μL

3.1.3 ปิเปตต์อัตโนมัติ แบบปรับปริมาตร 50 – 200 และ 200 – 1,000 μL

3.1.4 แถบสีมาตรฐานการตรวจวัดโคตินีน

3.1.5 ขวดหยด ขนาด 30 และ 60 มล. ที่มีปริมาตรหยดละ 73 และ 86 μL ตามลำดับ

3.2 เครื่องมือ

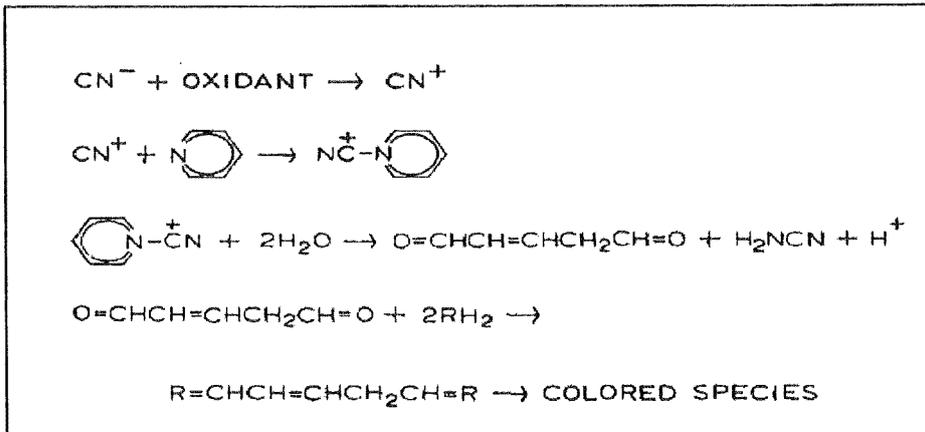
3.2.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

3.2.2 เครื่องวัด pH

4. วิธีการศึกษา

4.1 การตรวจวัดโคตินีนโดยใช้หลักการ direct barbituric acid (DBA method)

การตรวจวัดโคตินีนในปัสสาวะใช้หลักการ direct barbituric acid (DBA method) ตามปฏิกิริยา Konig reaction (Jack L.Lambert, 1975) ซึ่งเป็นการตรวจวัดไซยาไนด์ (cyanide) กล่าวคือ KCN ที่แตกตัวเป็น CN^- ในภาวะกรดจะจับกับ Cl^- จาก chloramine-T ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารออกซิแดนซ์ เกิดเป็น CNCl (cyanogen chloride) โดย CN^+ ที่เกิดขึ้นเข้าจับกับ pyridine ring ของ barbituric acid เกิดการเปลี่ยนแปลงจนได้สารประกอบสีส้มแดง วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 nm ความเข้มของสีเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของโคตินีนในสิ่งส่งตรวจ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีดังนี้



สารที่เติม (μL)	Reagent blank	Standard	Unknown
น้ำกลั่น	500	-	-
Standard cotinine	-	500	-
Urine	-	-	500
Sodium acetate buffer	250	250	250
KCN	100	100	100
Chloramine-T	100	100	100
Barbituric acid	500	500	500

ผสมวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วอ่านผลหรือวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 505 nm

4.2 การศึกษาเปรียบเทียบการใช้ปิเปตต์อัตโนมัติ (autopipette) และการใช้หลอดหยด (dropper)

การศึกษาเปรียบเทียบการใช้ปิเปตต์อัตโนมัติและการใช้หลอดหยด ศึกษาโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 μmol/L และตรวจวัดตามวิธีในข้อ 4.1 โดยการตรวจปริมาณสารละลายใช้ปิเปตต์อัตโนมัติ และใช้หลอดหยด (dropper) แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของการตรวจวัดโคตินีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาเปรียบเทียบระหว่างการตรวจปริมาณสารละลายโดยใช้ปิเปตต์อัตโนมัติและใช้หลอดหยด (dropper)

4.3 การทดสอบนํ้ายาตรวจวัดโคตินีนตามวิธี DBA method

4.3.1 การศึกษาความแม่นยำของการตรวจวัดโคตินีน (Precision)

การศึกษาความแม่นยำของการตรวจวัดโคตินีนแบ่งเป็นการศึกษาในตัวอย่างปัสสาวะและศึกษาในสารละลายมาตรฐาน การศึกษาในตัวอย่างปัสสาวะใช้ปัสสาวะของผู้สูบบุหรี่ที่เก็บปัสสาวะแบบสุ่ม (random void midstream urine) ไม่เติมสารกันเสียแล้วแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มล. หลอดละ 500 μL เก็บไว้ที่ -4°C ตรวจวัดด้วยวิธีในข้อ 4.1 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 505 nm

ส่วนการศึกษาในสารละลายมาตรฐานนั้นใช้สารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 15 และ 25 μmol/L ที่เก็บไว้ที่ 4°C ตรวจวัดตามวิธีในข้อ 4.1 การศึกษาความแม่นยำแบ่งการศึกษาเป็น 2 แบบคือ

4.3.1.1 การทดสอบแบบ within-run คือ ตรวจวัดความเข้มข้นโคตินีนในปัสสาวะ และสารละลายมาตรฐานอย่างละ 20 ครั้งใน 1 วัน

4.3.1.2 การทดสอบแบบ between-run คือ ตรวจวัดความเข้มข้นโคตินีนในปัสสาวะ และ สารละลายมาตรฐานอย่างละ 25 ครั้ง โดยวัดเป็นเวลา 25 วัน (วันละ 1 ครั้ง) นำผลการตรวจวัดที่ได้คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) โดย

$$\text{สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (\%CV)} = \frac{\text{SD} \times 100}{\text{mean}}$$

4.3.2 การศึกษาความถูกต้องของการตรวจวัดโคตินีน (Accuracy)

การศึกษาความถูกต้องของการตรวจวัดโคตินีน ศึกษาโดยการเติมสารมาตรฐานโคตินีนให้มีความเข้มข้นในตัวอย่างปัสสาวะเท่ากับ 10, 25, 50, และ 100 $\mu\text{mol/L}$ แล้วตรวจวัดตามวิธีในข้อ 4.1 จากนั้นนำผลมาวิเคราะห์ดูว่าจะสามารถวิเคราะห์สารกลับคืนมาเท่ากับที่เติมลงไปหรือไม่ โดยสามารถคำนวณได้ 2 แบบ คือ การคำนวณเฉพาะการวิเคราะห์สารมาตรฐานกลับเปรียบเทียบกับส่วนที่เติมลงไป เรียกว่า ร้อยละการกลับคืน (% recovery) และการคำนวณโดยใช้ปริมาณสารทั้งหมดที่วิเคราะห์ในตัวอย่างภายหลังจากเติมสารลงไปแล้ว เรียกว่า ร้อยละความคาดหวัง (% expectation) โดยเติมสารในการทดสอบดังนี้

ครั้งที่	ตัวอย่างปัสสาวะ (μL)	สารมาตรฐานโคตินีน 500 $\mu\text{mol/L}$ (μL)	น้ำกลั่น (μL)	ความเข้มข้นสารมาตรฐานโคตินีนในตัวอย่างปัสสาวะ ($\mu\text{mol/L}$)
1	490	-	10	-
2	490	10	-	10
3	475	-	25	-
4	475	25	-	25
5	450	-	50	-
6	450	50	-	50
7	400	-	100	-
8	400	100	-	100

และนำผลที่ทดสอบได้มาคำนวณหาร้อยละการวิเคราะห์กลับ ตามความสัมพันธ์ดังนี้

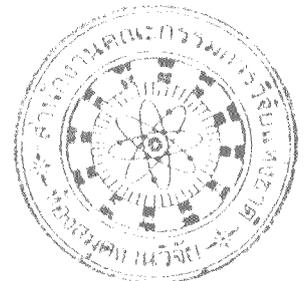
$$\text{กำหนดให้ ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้หลังเติม} = A$$

$$\text{ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ก่อนเติม} = B$$

$$\text{ปริมาณสารที่เติมลงไป} = C$$

$$\% \text{ Recovery} = [(A-B)/C] \times 100$$

$$\% \text{ Expectation} = [A/(B+C)] \times 100$$



4.3.3 การศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวัดโคตินีน (Detection limit)

การหาขีดจำกัดของการตรวจวัดโคตินีน ศึกษาโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 25 $\mu\text{mol/L}$ เพื่อให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25 และ 12.50 $\mu\text{mol/L}$ ตรวจวัดตามวิธีใน

ข้อ 4.1 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 505 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้แต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐานและหาสมการ

ตรวจวัดหลอด blank ตามวิธีในข้อ 4.1 จำนวน 20 หลอด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 505 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นปรับศูนย์ แล้วนำผลมาคำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และขีดจำกัดของการตรวจวัดโคตินีน (Detection limit) ตามความสัมพันธ์

$$\text{Detection limit} = \text{mean} + 3 \text{ SD}$$

แล้วจึงนำค่า detection limit ที่คำนวณได้มาแทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นที่เป็นขีดจำกัดของการตรวจวัดโคตินีน

4.3.4 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Sensitivity)

การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ศึกษาโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานโคตินีน ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 และ 25 $\mu\text{mol/L}$ ตรวจวัดตามวิธีในข้อ 4.1 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 505 นาโนเมตร สร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น แล้วความเข้มข้นต่ำสุดที่มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่บนเส้นตรงถือว่าเป็นความไวของการตรวจวัด

4.3.5 การศึกษาค่าความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดโคตินีน (Linearity)

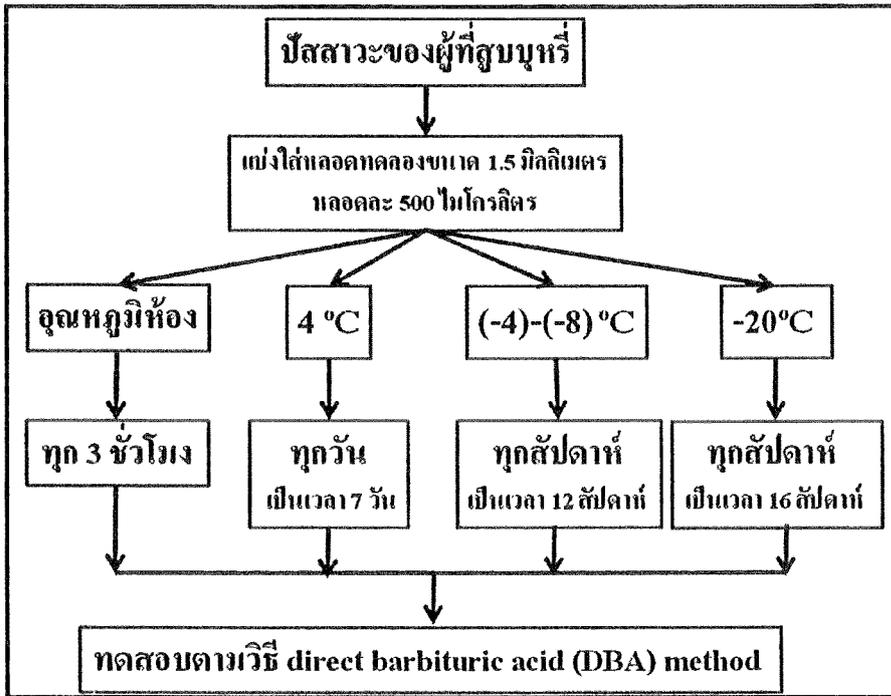
การศึกษาค่าความเป็นเส้นตรงศึกษาโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 5, 10, 15, 25, 50, 100, 150 และ 200 $\mu\text{mol/L}$ และตรวจวัดตามวิธีในข้อ 4.1 สร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น ค่าความเข้มข้นมากที่สุดที่มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่บนเส้นตรงถือว่าเป็นค่าความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัด

4.3.6 การทดสอบความคงตัวของสารมาตรฐานและน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวัด (Stability)

การทดสอบความคงตัวของสารมาตรฐานและน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวัด เพื่อศึกษาความคงตัวของโคตินีนในสารละลายมาตรฐานและความคงตัวของน้ำยาที่เตรียมขึ้นได้ตรวจวัดสารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 5, 10, 15, 25, 50 และ 100 $\mu\text{mol/L}$ และตรวจวัดตามวิธีในข้อ 4.1 ตรวจวัดทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 24 สัปดาห์ (6 เดือน) โดยน้ำยาและสารละลายมาตรฐานเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C นำค่าการดูดกลืนแสงและระยะเวลาที่ผ่านไปมาสร้างกราฟเพื่อดูแนวโน้มการเปลี่ยนแปลง

4.3.7 การทดสอบความคงตัวของโคตินีนในตัวอย่างปัสสาวะ (Urine stability)

การทดสอบความคงตัวของโคตินีนในตัวอย่างปัสสาวะ ศึกษาโดยใช้ปัสสาวะของผู้ที่สูบบุหรี่เก็บปัสสาวะแบบสุ่ม (random void midstream urine) ไม่เติมสารกันเสีย แล้วแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มล. หลอดละ 500 μL แยกเก็บที่อุณหภูมิห้อง 4°C, -4° ถึง -8°C และ -20°C ทดสอบตามวิธี ในข้อ 4.1 การศึกษาความคงตัวของโคตินีนในปัสสาวะที่เก็บในอุณหภูมิต่าง ๆ ดังแสดงในรูป



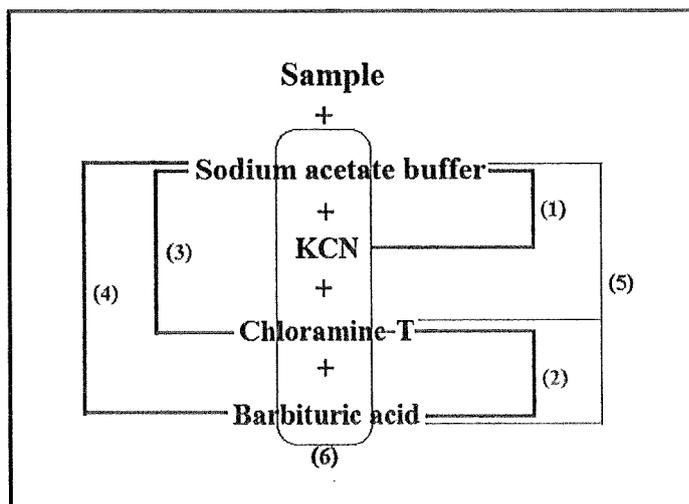
4.4 การทดสอบความคงตัวของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาการตรวจวัดโคตินีน (Color Stability)

เพื่อทดสอบความคงตัวของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาการตรวจวัดโคตินีน ศึกษาโดยตรวจวัดสารมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 $\mu\text{mol/L}$ ตามวิธีในข้อ 4.1 โดยทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองขนาด 12×75 มม. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 nm ทุกนาทีนับตั้งแต่เติมน้ำยาตัวสุดท้าย (barbituric acid) เป็นเวลา 30 นาที โดยวางหลอดทดลองไว้ในเครื่องวัดการดูดกลืนแสง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลาที่ผ่านไปแต่ละนาทีและหาเวลาที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ตรวจวัดได้

4.5 การปรับปรุงวิธีการตรวจวัด

4.5.1 การทดสอบการผสมน้ำยาก่อนการตรวจวัด

การศึกษาการทดสอบผสมน้ำยาก่อนการตรวจวัด เพื่อลดขั้นตอนการเติมน้ำยาในปฏิกิริยาตรวจวัดหาสารโคตินีน ทดสอบโดยผสมน้ำยาที่เตรียมโดยใช้น้ำยาความเข้มข้นปกติ และสัดส่วนคงเดิมดังแสดงในขั้นตอนการตรวจวัด 4.1 ซึ่งผสมน้ำยา 2 ชนิด 3 ชนิด และ 4 ชนิดเข้าด้วยกันจากน้ำยาตั้งต้น 4 ชนิด รวมทั้งหมดเป็น 6 แบบการทดลองดังแสดงในรูป



4.5.1.1 ผสม sodium acetate buffer กับ KCN ส่วนผสมที่ได้เรียกว่า mixture 1 ทดสอบตามขั้นตอนดังนี้ standard + mixture 1+ chloramine-T + barbituric acid

4.5.1.2 ผสม chloramine-T กับ barbituric acid ส่วนผสมที่ได้เรียกว่า mixture 2 ทดสอบตามขั้นตอนดังนี้ standard + sodium acetate buffer + KCN + mixture 2

4.5.1.3 ผสม sodium acetate buffer กับ chloramine-T ส่วนผสมที่ได้เรียกว่า mixture 3 แบ่งการทดสอบเป็น 2 แบบ ตามลำดับการเติมที่แตกต่างกัน คือ

4.5.1.3.1 standard + mixture 3 + KCN + barbituric acid

4.5.1.3.2 standard + KCN + mixture 3 + barbituric acid

4.5.1.4 ผสม sodium acetate buffer กับ barbituric acid ส่วนผสมที่ได้เรียกว่า mixture 4

แบ่งการทดสอบเป็น 6 แบบคือ

4.5.1.4.1 standard + mixture 4 + KCN + chloramine-T

4.5.1.4.2 standard + KCN + mixture 4 + chloramine-T

4.5.1.4.3 standard + KCN + chloramine-T + mixture 4

4.5.1.4.4 standard + mixture 4 + chloramine-T + KCN

4.5.1.4.5 standard + chloramine-T + mixture 4 + KCN

4.5.1.4.6 standard + chloramine-T + KCN + mixture 4

4.5.1.5 ผสม sodium acetate buffer, chloramine-T และ barbituric acid ส่วนผสมที่ได้เรียกว่า mixture 5 ทดสอบตามขั้นตอนดังนี้ standard + mixture 5 + KCN

4.5.1.6 ผสม sodium acetate buffer, chloramine-T, KCN และ barbituric acid ส่วนผสมที่ได้เรียกว่า mixture 6 ทดสอบตามขั้นตอนดังนี้ standard + mixture 6

4.5.2 การทดสอบคุณสมบัติของการผสมน้ำยา barbituric acid กับ sodium acetate buffer
 การทดสอบคุณสมบัติของการผสมน้ำยา barbituric acid กับ sodium acetate buffer ใช้ขั้นตอน
 ทดสอบ คือ 4.5.1.4.2 Standard + KCN + mixture 4 + chloramine-T

4.5.2.1 การศึกษาความแม่นยำของการตรวจวัดโคตินีนของน้ำยาผสม (Precision)

การศึกษาความแม่นยำของการตรวจวัดโคตินีนโดยใช้น้ำยาผสมระหว่าง barbituric acid
 กับ sodium acetate buffer แบ่งเป็นการศึกษาในตัวอย่างปัสสาวะและศึกษาในสารละลายมาตรฐาน
 การศึกษาในตัวอย่างปัสสาวะใช้ปัสสาวะของผู้สุบบุหรี่ที่เก็บปัสสาวะแบบสุ่ม (random void midstream
 urine) ไม่เติมสารกันเสียแล้วแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มล. หลอดละ 500 μL เก็บไว้ที่ -4°C
 ตรวจวัดด้วยขั้นตอนในข้อ 4.5.1.4.2 ส่วนการศึกษาในสารละลายมาตรฐานนั้นใช้สารละลายมาตรฐานโค
 ตินีน ความเข้มข้น 15 และ 25 $\mu\text{mol/L}$ ที่เก็บไว้ที่ 4°C ตรวจวัดตามขั้นตอนในข้อ 4.5.1.4.2 การศึกษา
 ความแม่นยำแบ่งการศึกษาเป็น 2 แบบคือ

4.5.2.1.1 การทดสอบแบบ within-run คือ ตรวจวัดความเข้มข้นโคตินีนใน
 ปัสสาวะ และสารละลายมาตรฐานอย่างละ 25 ครั้งใน 1 วัน

4.5.2.1.2 การทดสอบแบบ between-run คือ ตรวจวัดความเข้มข้นโคตินีนใน
 ปัสสาวะ และสารละลายมาตรฐานอย่างละ 25 ครั้ง โดยวัดเป็นเวลา
 25 วัน (วันละ 1 ครั้ง)

นำผลการตรวจวัดที่ได้คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และ
 สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) โดย

$$\text{สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (\% CV)} = \frac{\text{SD} \times 100}{\text{mean}}$$

4.5.2.2 การศึกษาความถูกต้องของการตรวจวัดโคตินีนของน้ำยาผสม (Accuracy)

การศึกษาความถูกต้องของการตรวจวัดโคตินีนซึ่งใช้น้ำยาผสมระหว่าง barbituric acid
 กับ sodium acetate buffer ศึกษาโดยการเติมสารมาตรฐานโคตินีนให้มีความเข้มข้นในตัวอย่าง
 ปัสสาวะเท่ากับ 10, 25, 50 และ 100 $\mu\text{mol/L}$ แล้วตรวจวัดตามวิธีในข้อ 4.5.1.4.2 จากนั้นนำผลมา
 วิเคราะห์ดูว่าจะสามารถวิเคราะห์สารกลับคืนมาเท่ากับที่เติมลงไปหรือไม่ โดยสามารถคำนวณได้ 2
 แบบ คือ การคำนวณเฉพาะการวิเคราะห์สารมาตรฐานกลับเปรียบเทียบกับส่วนที่เติมลงไป เรียกว่า
 ร้อยละการกลับคืน (% recovery) และการคำนวณโดยใช้ปริมาณสารทั้งหมดที่วิเคราะห์ในตัวอย่าง
 ภายหลังจากเติมสารลงไปแล้ว เรียกว่า ร้อยละความคาดหวัง (% expectation) โดยเติมสารในการ
 ทดสอบตามตารางที่ 3

แล้วนำผลที่ทดสอบได้มาคำนวณหาร้อยละการวิเคราะห์กลับ ตามความสัมพันธ์ดังนี้

กำหนดให้	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้หลังเติม	=	A
	ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ก่อนเติม	=	B
	ปริมาณสารที่เติมลงไป	=	C

$$\% \text{ Recovery} = [(A-B)/C] \times 100$$

$$\% \text{ Expectation} = [A/(B+C)] \times 100$$

4.5.2.3 การศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวัดโคตินีนของน้ำยาผสม (Detection Limit)

การหาขีดจำกัดของการตรวจวัดโคตินีนซึ่งใช้น้ำยาผสมระหว่าง Barbituric acid กับ sodium acetate buffer ศึกษาโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานโคตินีน ความเข้มข้น 25 $\mu\text{mol/L}$ เพื่อให้มีความเข้มข้น 0.2, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25 และ 12.50 $\mu\text{mol/L}$ ตรวจวัดตามวิธีในข้อ 4.5.1.4.2 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้แต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐานและหาสมการ

ตรวจวัดหลอด blank ตามวิธีในข้อ 4.5.1.4.2 จำนวน 25 หลอด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 505 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นปรับศูนย์ แล้วนำผลมาคำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และขีดจำกัดของการตรวจวัดโคตินีน (Detection limit) ตามความสัมพันธ์

$$\text{Detection limit} = \text{mean} + 3 \text{ SD}$$

แล้วจึงนำค่า detection limit ที่คำนวณได้มาแทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นที่เป็นขีดจำกัดของการตรวจวัดโคตินีนโดยใช้น้ำยาผสม

4.5.2.4 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ของน้ำยาผสม (Sensitivity)

การหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ซึ่งใช้น้ำยาผสมระหว่าง barbituric acid กับ sodium acetate buffer ศึกษาโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานโคตินีน ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 และ 25 $\mu\text{mol/L}$ ตรวจวัดตามวิธีในข้อ 4.5.1.4.2 ผลที่ได้นำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น และความเข้มข้นต่ำสุดที่มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่บนเส้นตรงถือว่าเป็นความไวของการตรวจวัดโดยใช้น้ำยาผสม

4.5.2.5 การศึกษาค่าความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดโคตินีน (Linearity)

การศึกษาค่าความเป็นเส้นตรงศึกษาซึ่งใช้น้ำยาผสมระหว่าง barbituric acid กับ sodium acetate buffer ศึกษาโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 5, 10, 15, 25, 50, 100, และ 200 $\mu\text{mol/L}$ และตรวจวัดตามวิธีในข้อ 4.5.1.4.2 สร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้น ค่าความเข้มข้นมากที่สุดที่มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่บนเส้นตรงถือว่าเป็นค่าความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดโดยใช้น้ำยาผสม

4.5.2.6 การทดสอบความคงตัวของน้ำยาผสมที่ใช้ในการตรวจวัด (Stability)

การทดสอบความคงตัวของน้ำยาผสมระหว่าง barbituric acid กับ sodium acetate buffer ในการศึกษาโดยตรวจวัดสารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 5, 10, 15, 25, 50 และ 100 $\mu\text{mol/L}$ ซึ่งตรวจวัดตามวิธีในข้อ 4.5.1.4.1 ตรวจวัดทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และ 4.5.1.4.2 ตรวจวัดทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยน้ำยาและสารละลายมาตรฐานเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C นำค่าการดูดกลืนแสงและระยะเวลาที่เก็บน้ำยาผสมมาสร้างกราฟเพื่อดูแนวโน้มการเปลี่ยนแปลง

4.5.2.7 การทดสอบความคงตัวของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาการตรวจวัดโคตินีนของน้ำยาผสม (Color stability)

เพื่อทดสอบความคงตัวของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาการตรวจวัดโคตินีน ศึกษาโดยตรวจวัดสารมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 $\mu\text{mol/L}$ ตามวิธีในข้อ 4.5.1.4.2 โดยทำปฏิกิริยาในหลอดทดลองขนาด 12x75 มม. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 nm ทุกนาที่นับตั้งแต่เติมน้ำยาตัวสุดท้าย (chloramine-T) เป็นเวลา 30 นาที โดยวางหลอดทดลองไว้ในเครื่องวัดการดูดกลืนแสงนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลาที่วางหลอดทดลองไว้แต่ละนาทีและหาเวลาที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ตรวจวัดได้

4.6 การศึกษาเปรียบเทียบชุดตรวจโคตินีนที่ปรับปรุงขึ้นเทียบกับชุดตรวจ COT one step test device

เพื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจวัดที่ได้ปรับปรุงขึ้น ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบผลการตรวจวัดกับวิธีที่มีขายในท้องตลาด คือ วิธี COT One Step Cotinine Test device ซึ่งเป็นการตรวจเชิงคุณภาพที่อาศัยหลักการ competitive immunoassay โดยโคตินีนที่อยู่ในปัสสาวะและสารคอนจูเกตจะแย่งจับกับ binding site ของแอนติบอดี ระหว่างทำการทดสอบตัวอย่างปัสสาวะจะเคลื่อนไปข้างหน้าด้วยคาพิลลารี หากโคตินีนในตัวอย่างปัสสาวะต่ำกว่า 200 ng/ml หรือไม่มีโคตินีน จะไม่สามารถจับกับแอนติบอดีได้ทั้งหมด ดังนั้นแอนติบอดีจึงถูกจับด้วยคอนจูเกตมากกว่าโคตินีนที่อยู่ในปัสสาวะ ทำให้เกิดแถบสีขึ้นในบริเวณ test แสดงว่าเป็นผลลบหากโคตินีนในตัวอย่างมากกว่า 200 ng/ml โคตินีนจะแย่งจับกับ binding site ของแอนติบอดีได้มากกว่าตัวคอนจูเกต เมื่อเคลื่อนไปข้างหน้าทำให้มองไม่เห็นแถบสีในบริเวณ test ถือว่าเป็นผลบวก

ขั้นตอนการทดสอบ

1. นำชุดทดสอบมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง
2. หยดตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 3 หยด ลงบริเวณที่กำหนด
3. จับเวลา 5 นาที แล้วอ่านผลการทดสอบโดยสังเกตแถบสีที่เกิดขึ้น
4. ผลบวก: เกิดสี 1 แถบที่ C (control line)

ผลลบ : เกิดแถบสี 2 แถบที่ C (control line) และ T (test line)

ผลการศึกษา

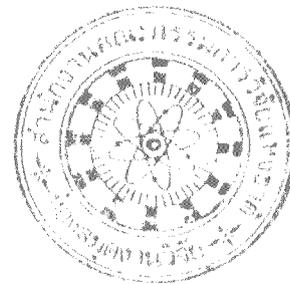
1. ผลการเปรียบเทียบการใช้ปิเปตต์อัตโนมัติ (autopipette) และการใช้หลอดหยด (dropper)

ผลตรวจวัดสารมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 $\mu\text{mol/L}$ ที่ให้ความเข้มข้นสี 1+, 2+, 3+ และ 4+ ตามลำดับ ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงแต่ละความเข้มข้นทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง โดยใช้ปิเปตต์อัตโนมัติ (auto pipette) และหลอดหยด (dropper) ในการตวงปริมาตรสารละลาย จากการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{mol/L}$ เมื่อใช้ปิเปตต์อัตโนมัติและใช้หลอดหยด มีค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง 0.115 ถึง 0.139 และ 0.123 ถึง 0.129 ตามลำดับ ความเข้มข้น 25 $\mu\text{mol/L}$ มีค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง 0.312 ถึง 0.315 และ 0.242 ถึง 0.324 ตามลำดับ ความเข้มข้น 50 $\mu\text{mol/L}$ มีค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง 0.600 ถึง 0.675 และ 0.611 ถึง 0.636 ตามลำดับ ความเข้มข้น 100 $\mu\text{mol/L}$ มีค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง 1.138 ถึง 1.302 และ 1.026 ถึง 1.148 ตามลำดับ ซึ่งจากการสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่า เครื่องมือทั้งสองอย่างให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกันทุกความเข้มข้น จึงแสดงให้เห็นว่าการใช้ปิเปตต์อัตโนมัติและหลอดหยดให้ค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบการใช้ปิเปตต์อัตโนมัติ (Autopipette) และการใช้หลอดหยด (Dropper)

Cotinine standard		ค่าการดูดกลืนแสง (OD 505 nm) (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)			
Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	Grading	Autopipette		Dropper	
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
10	1+	0.115	0.139	0.123	0.129
25	2+	0.312	0.315	0.242	0.324
50	3+	0.600	0.675	0.611	0.636
100	4+	1.138	1.302	1.026	1.148

จากผลการศึกษาดังกล่าวเห็นได้ว่าการใช้หลอดหยด (dropper) แทนการใช้ autopipette ให้ผลการตรวจวัดใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงมั่นใจได้ว่า การใช้หลอดหยดในชุดทดสอบนั้นมีความถูกต้องเหมือนการใช้ autopipette ในห้องปฏิบัติการ



2. ผลการทดสอบน้ำยาตรวจวัดโคตินีนตามวิธี DBA

2.1 ผลการศึกษาความแม่นยำของการตรวจวัดโคตินีน (Precision)

ผลการศึกษาความแม่นยำการตรวจวัดโคตินีนในตัวอย่างปัสสาวะของผู้สูบบุหรี่และในสารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 15 และ 25 $\mu\text{mol/L}$ ตรวจวัดตามวิธี DBA พบว่า

2.1.1 ผลการทดสอบแบบ within-run

ผลการทดสอบปัสสาวะทำ 20 ครั้งติดต่อกันใน 1 วัน ทำการทดสอบ 2 ชุดการทดสอบ มีค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD) ครั้งที่ 1 เท่ากับ 0.141 ± 0.003 ครั้งที่ 2 เท่ากับ 0.135 ± 0.002 มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) ครั้งที่ 1 และ ครั้งที่ 2 เท่ากับ 2.13 และ 1.48 ตามลำดับ

ผลการทดสอบสารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 15 และ 25 $\mu\text{mol/L}$ ทำ 20 ครั้งติดต่อกันใน 1 วัน มีค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD) ความเข้มข้น 15 และ 25 $\mu\text{mol/L}$ เท่ากับ 0.298 ± 0.003 และ 0.501 ± 0.006 ตามลำดับ มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) ความเข้มข้น 15 และ 25 $\mu\text{mol/L}$ เท่ากับ 1.01 และ 1.20 ตามลำดับ

ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาคผนวก ก

2.1.2 ผลการทดสอบแบบ between-run

ผลการทดสอบปัสสาวะทำ 25 ครั้งติดต่อกัน 25 วัน วันละ 1 ครั้ง มีค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD) เท่ากับ 0.138 ± 0.007 มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) เท่ากับ 5.07

ผลการทดสอบสารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 25 $\mu\text{mol/L}$ ทำ 25 ครั้งติดต่อกัน 25 วัน วันละ 1 ครั้ง มีค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD) เท่ากับ 0.476 ± 0.035 มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) เท่ากับ 7.35

ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาคผนวก ข

ตารางที่ 2 แสดงผลการศึกษาความแม่นยำการตรวจวัดโคตินีน (precision) แบบ within-run และ between-run ของตัวอย่างปัสสาวะและสารมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 15 และ 25 $\mu\text{mol/L}$

การทดสอบ		Urine		Cotinine standard	
		ครั้งที่1	ครั้งที่2	15 $\mu\text{mol/L}$	25 $\mu\text{mol/L}$
within-run (n=20)	mean	0.141	0.135	0.298	0.501
	SD	0.003	0.002	0.003	0.006
	%CV	2.13	1.48	1.01	1.2
between-run (n=25)	mean	0.138		ND*	0.476
	SD	0.007		ND	0.035
	%CV	5.07		ND	7.35

*ND = not done

2.2 ผลการศึกษาความถูกต้องของการตรวจวัดโคตินีน (Accuracy)

ผลการศึกษาความถูกต้องของการตรวจวัดโคตินีน โดยการเติมสารมาตรฐานโคตินีน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในปัสสาวะเท่ากับ 10, 25, 50, และ 100 $\mu\text{mol/L}$ และตรวจวัดตามวิธี DBA คำนวณหาร้อยละการกลับคืน (% recovery) และ ร้อยละความคาดหวัง (% expectation) จากการศึกษาพบว่าค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery) เท่ากับ 100, 102, 101 และ 97 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 100 ค่าร้อยละความคาดหวัง (% expectation) เท่ากับ 100, 101, 101 และ 98 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 100 ดังแสดงในตารางที่ 3

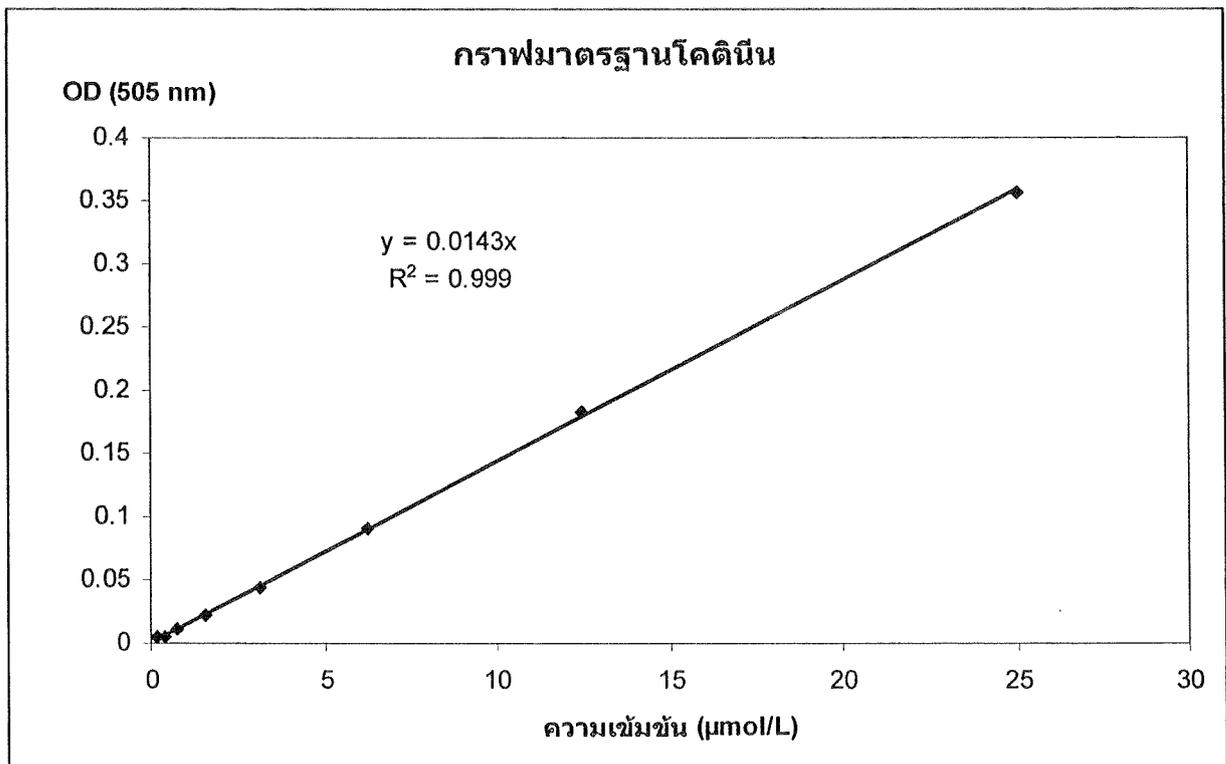
ตารางที่ 3 แสดงผลการศึกษาความถูกต้องของการตรวจวัด (Accuracy) แสดงค่าเป็นร้อยละการกลับคืน (% Recovery) และ ร้อยละความคาดหวัง (% Expectation)

ครั้งที่	ปัสสาวะ (μL)	Cotinine standard 500 $\mu\text{mol/L}$ (μL)	น้ำกลั่น (μL)	ความเข้มข้น Cotinine standard ที่เติม ($\mu\text{mol/L}$)	ผลการตรวจวัด Cotinine : OD 505 nm [Conc. ($\mu\text{mol/L}$)]			วัด cotinine ที่เติมได้ ($\mu\text{mol/L}$)	% Recovery	% Expectation
					1	2	เฉลี่ย			
1	490	—	10	—	0.128 (6.74)	0.126 (6.63)	0.127 (6.68)	10.08	101	100
2	490	10	—	10	0.317 (16.68)	0.320 (16.84)	0.319 (16.76)			
3	475	—	25	—	0.125 (6.58)	0.126 (6.63)	0.126 (6.61)	25.47	102	101
4	475	25	—	25	0.607 (31.95)	0.612 (32.21)	0.610 (32.08)			
5	450	—	50	—	0.115 (6.05)	0.118 (6.21)	0.117 (6.13)	50.66	101	101
6	450	50	—	50	1.073 (56.47)	1.085 (57.11)	1.079 (56.79)			
7	400	—	100	—	0.100 (5.26)	0.104 (5.47)	0.102 (5.37)	97.39	97	98
8	400	100	—	100	1.974 (103.89)	1.931 (101.63)	1.953 (102.76)			
เฉลี่ย								100	100	

2.3 ผลการศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัดโคตินีน (Detection Limit)

การทดสอบตรวจวัด blank ตามวิธี DBA จำนวน 20 หลอดโดยใช้น้ำกลั่นปรับศูนย์ แล้วนำผลมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยรวมกับสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\text{mean} + 3 \text{SD}$) เพื่อหาขีดจำกัดของการตรวจวัด ผลการศึกษาพบค่าการดูดกลืนแสงของหลอด blank มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.004 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.0007 และค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.0061 ซึ่งเมื่ออ่านจากกราฟมาตรฐานและคำนวณจากสมการมีความเข้มข้นเท่ากับ $0.43 \mu\text{mol/L}$ ดังแสดงในรูปที่ 1 และภาคผนวก ค

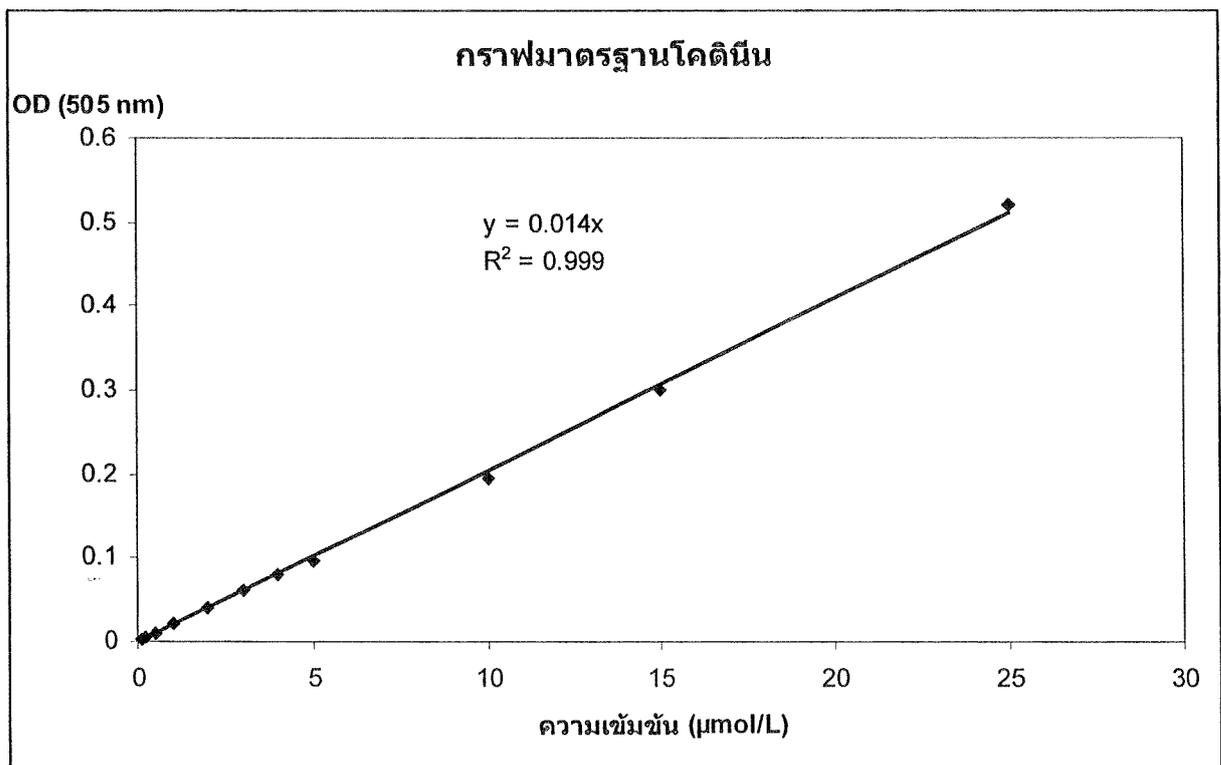
รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานโคตินีน และสมการที่ใช้ในการคำนวณหาขีดจำกัดของการตรวจวัดโคตินีน (Detection limit)



2.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Sensitivity)

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ศึกษาโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานโคตินีน ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 และ 25 $\mu\text{mol/L}$ ตรวจวัดตามวิธี DBA นำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานความเข้มข้นต่ำสุดที่อยู่บนเส้นตรง ถือว่าเป็นความไวของการตรวจวัดจากการศึกษาพบว่า มีค่าเท่ากับ 0.125 $\mu\text{mol/L}$ ดังแสดงในรูปที่ 2 และภาคผนวก ง

รูปที่ 2 แสดงกราฟมาตรฐานโคตินีนมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Sensitivity) เท่ากับ 0.125 $\mu\text{mol/L}$



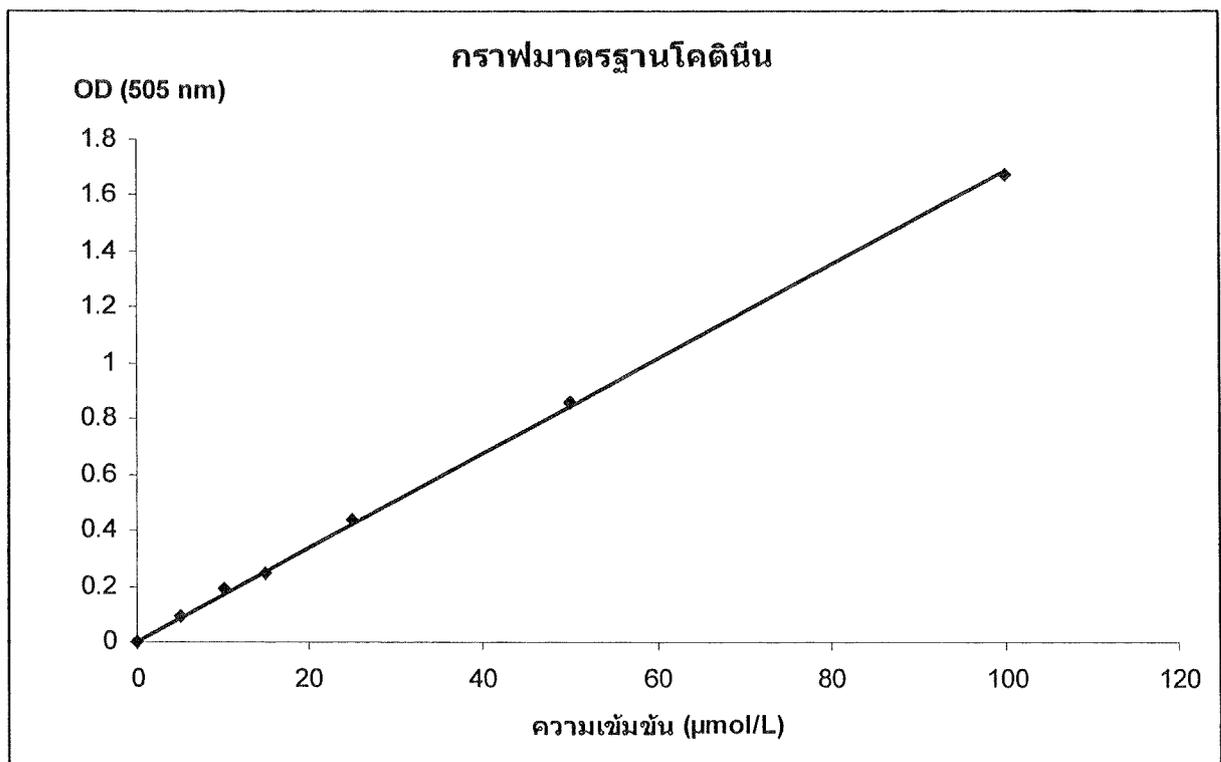
สรุปผลการศึกษา 2.1-2.5 คุณสมบัติของน้ำยาก่อนการพัฒนา

ผลการศึกษาความแม่นยำการตรวจวัดโคตินีนก่อนการพัฒนาชุดทดสอบพบว่า มีความแม่นยำแบบ within-run โดยมีค่า % CV 1-2 และ between-run มีค่า % CV ระหว่าง 5-7% มีค่าความถูกต้อง (accuracy) เท่ากับ 100% ขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 0.43 $\mu\text{mol/L}$ มีความไวของการทดสอบ (sensitivity) 0.125 $\mu\text{mol/L}$ และค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 100 $\mu\text{mol/L}$

2.5 ผลการศึกษาค่าความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดโคตินีน (Linearity)

การศึกษาค่าความเป็นเส้นตรงโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 5, 10, 15, 25, 50, 100, 150 และ 200 $\mu\text{mol/L}$ และตรวจวัดตามวิธี DBA นำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน และความเข้มข้นมากที่สุดที่ยังอยู่บนเส้นตรงของกราฟมาตรฐานถือว่าเป็นค่าความเป็นเส้นตรง จากผลการศึกษาพบว่ามีความเข้มข้นเท่ากับ 100 $\mu\text{mol/L}$ ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.673 ดังแสดงในรูปที่ 3 และภาคผนวก จ

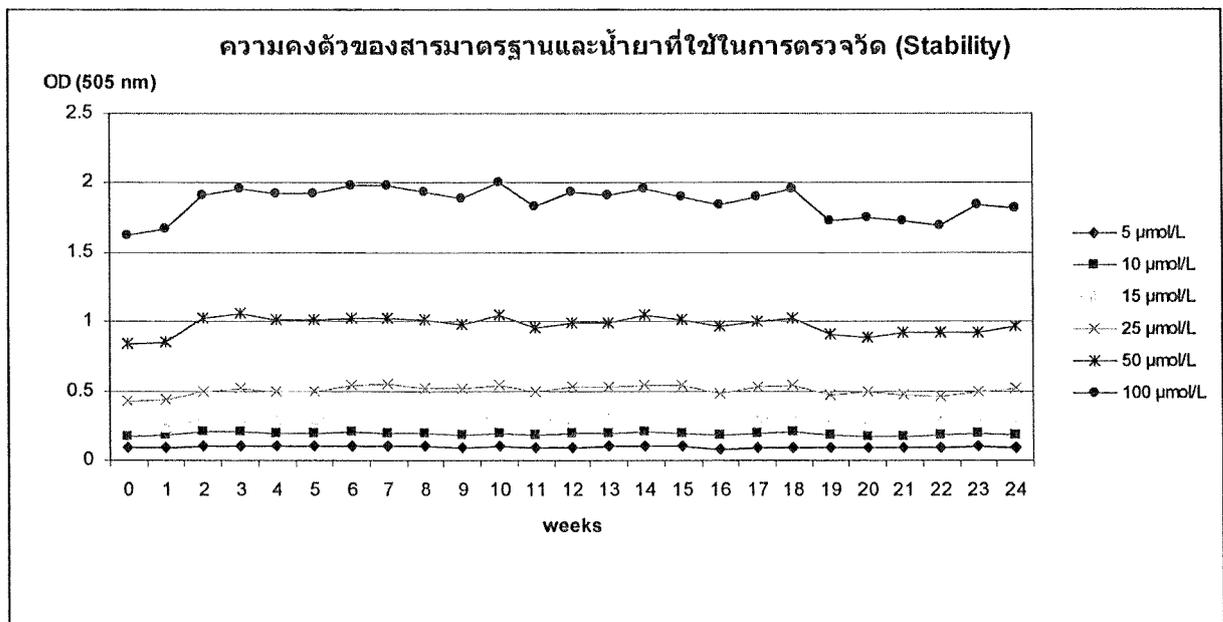
รูปที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐานโคตินีนมีค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) เท่ากับ 100 $\mu\text{mol/L}$



2.6 ผลการทดสอบความคงตัวของสารมาตรฐานและน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวัด (Stability)

การทดสอบความคงตัวของสารมาตรฐานและน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวัด ศึกษาโดยตรวจวัดสารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 5, 10, 15, 25, 50 และ 100 $\mu\text{mol/L}$ ตามวิธี DBA ซึ่งตรวจวัดทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 24 สัปดาห์ (6 เดือน) โดยน้ำยาและสารละลายมาตรฐานเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C ผลการศึกษาพบว่า สารมาตรฐานโคตินีนและน้ำยามีความคงตัวอย่างน้อย 24 สัปดาห์ (6 เดือน) ดังแสดงในรูปที่ 4 และภาคผนวก จ

รูปที่ 4 แสดงกราฟการทดสอบความคงตัวของสารมาตรฐานและน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวัด (Stability)



2.7 ผลการทดสอบความคงตัวของโคตินีนในตัวอย่างปัสสาวะ (Urine stability)

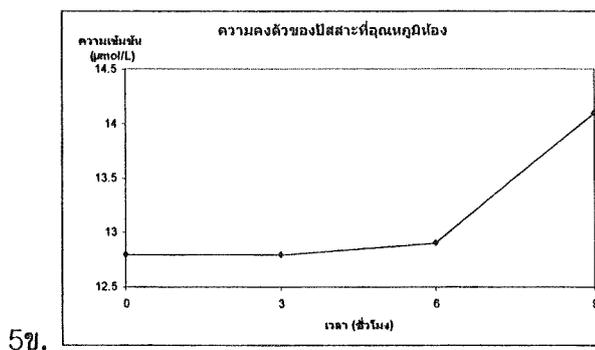
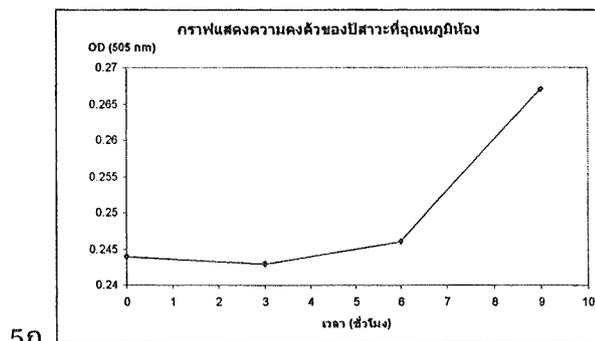
ผลการทดสอบความคงตัวของโคตินีนในตัวอย่างปัสสาวะ ที่แยกเก็บอุณหภูมิตั้งที่ 4°C, -4 ถึง -8°C และ -20°C ตามวิธี DBA แบ่งการทดสอบตามเวลาที่กำหนด พบว่า

ผลการศึกษาความคงตัวของปัสสาวะซึ่งเก็บที่อุณหภูมิห้องโดยทำการตรวจวัดทุก 3 ชั่วโมง พบค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 0.244 ซึ่งมีความเข้มข้น 12.8 $\mu\text{mol/L}$ เมื่อเก็บไว้และทดสอบในชั่วโมงที่ 3, 6 และ 9 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเป็น 0.243, 0.246 และ 0.267 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5ก. ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 12.8, 12.9 และ 14.1 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5ข. พบร้อยละการเปลี่ยนแปลงเท่ากับร้อยละ 0.0, 0.8 และ 10.2 ตามลำดับเมื่อเทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้น ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบความคงตัวของปัสสาวะที่อุณหภูมิห้อง

เวลา (ชั่วโมง)	OD 505 nm	ความเข้มข้น ($\mu\text{mol/L}$)	% การเปลี่ยนแปลง
0	0.244	12.8	0.0
3	0.243	12.8	0.0
6	0.246	12.9	0.8
9	0.267	14.1	10.2

รูปที่ 5 กราฟแสดงความคงตัวของปัสสาวะที่อุณหภูมิห้อง

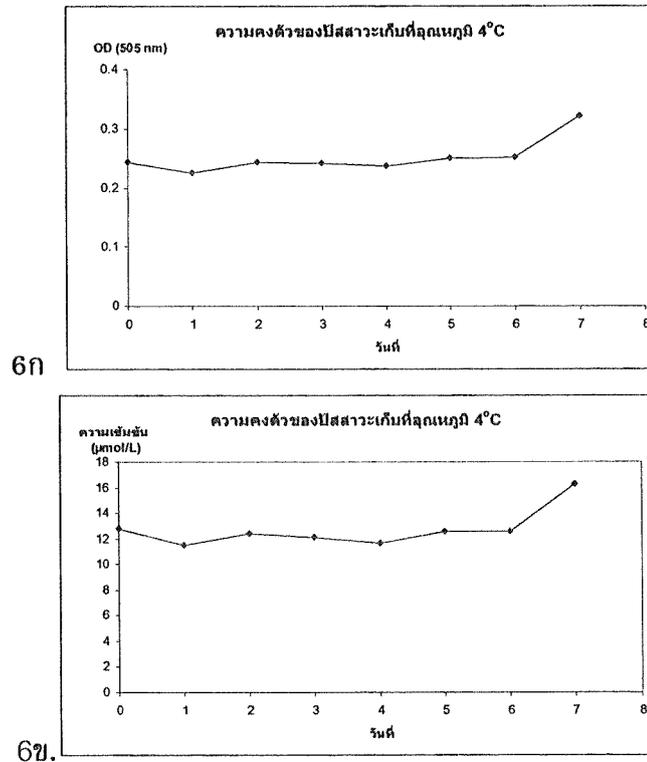


ผลการศึกษาความคงตัวของปัสสาวะซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4°C โดยทำการตรวจวัดทุกวันวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน พบค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 0.244 ซึ่งมีความเข้มข้น 12.8 $\mu\text{mol/L}$ เมื่อเก็บไว้และทดสอบในวันที่ 1 ถึง 7 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.226, 0.244, 0.242, 0.237, 0.250, 0.252 และ 0.321 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 6ก. ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 11.5, 12.4, 12.1, 11.7, 12.6, 12.6 และ 16.3 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 6ข. พบร้อยละการเปลี่ยนแปลงเท่ากับร้อยละ -10.5, -3.1, -5.9, -8.5, -1.3, -2.0 และ 27.7 เมื่อเทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้น ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบความคงตัวของปัสสาวะที่อุณหภูมิ 4°C

วันที่	OD 505 nm	ความเข้มข้น ($\mu\text{mol/L}$)	% การเปลี่ยนแปลง
0	0.244	12.8	0
1	0.226	11.5	-10.5
2	0.244	12.4	-3.1
3	0.242	12.1	-5.9
4	0.237	11.7	-8.5
5	0.250	12.6	-1.3
6	0.252	12.6	-2.0
7	0.321	16.3	27.7

รูปที่ 6 กราฟแสดงความคงตัวของปัสสาวะที่อุณหภูมิ 4°C

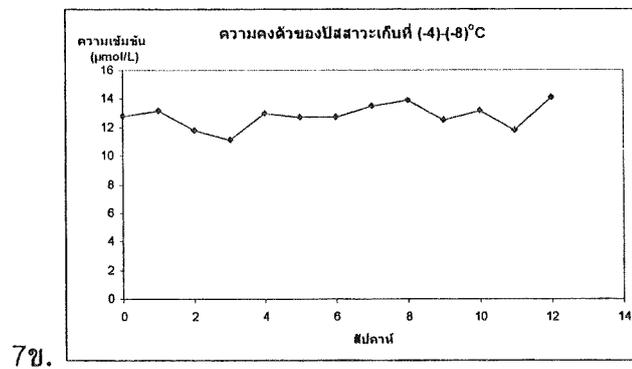
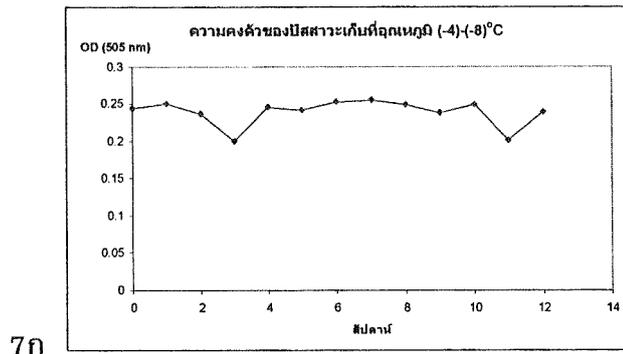


ผลการศึกษาความคงตัวของปัสสาวะซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ -4° ถึง -8°C โดยทำการตรวจสัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 0.244 ซึ่งมีความเข้มข้น 12.8 µmol/L เมื่อเก็บไว้และทดสอบในสัปดาห์ที่ 1 ถึง 12 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.251, 0.237, 0.200, 0.246, 0.242, 0.253, 0.256, 0.250, 0.238, 0.250, 0.201 และ 0.239 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 7ก. ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 13.2, 11.8, 11.1, 13.0, 12.7, 12.7, 13.5, 13.9, 12.5, 13.2, 11.8 และ 14.1 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 7ข. พบร้อยละการเปลี่ยนแปลงเท่ากับร้อยละ 3.2, -7.6, -13.2, 1.2, -0.7, -1.2, 5.3, 8.5, -2.3, 2.8, -7.7 และ 9.8 เมื่อเทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้น ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบความคงตัวของปัสสาวะที่อุณหภูมิ -4° ถึง -8°C

สัปดาห์ ที่	OD 505 nm	ความ เข้มข้น ($\mu\text{mol/L}$)	% การ เปลี่ยน แปลง	สัปดาห์ ที่	OD 505 nm	ความ เข้มข้น ($\mu\text{mol/L}$)	% การ เปลี่ยน แปลง
0	0.244	12.8	0	7	0.256	13.5	5.3
1	0.251	13.2	3.2	8	0.25	13.9	8.5
2	0.237	11.8	-7.6	9	0.238	12.5	-2.3
3	0.200	11.1	-13.2	10	0.250	13.2	2.8
4	0.246	13.0	1.2	11	0.201	11.8	-7.7
5	0.242	12.7	-0.7	12	0.239	14.1	9.8
6	0.253	12.7	-1.2				

รูปที่ 7 กราฟแสดงความคงตัวของปัสสาวะที่อุณหภูมิ -4° ถึง -8°C

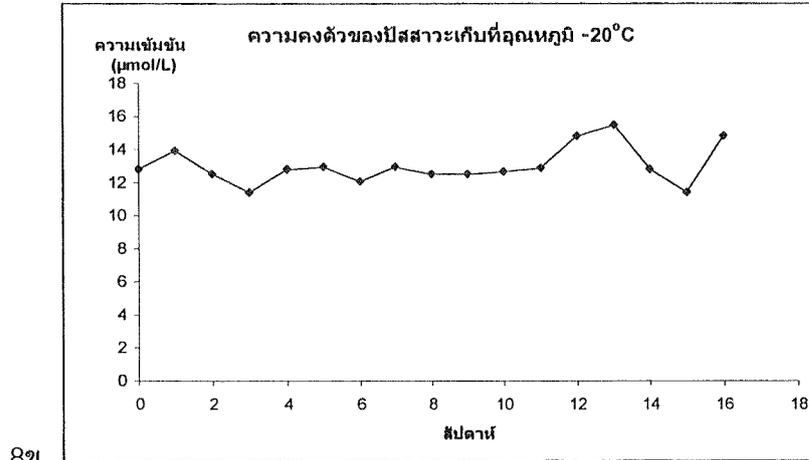
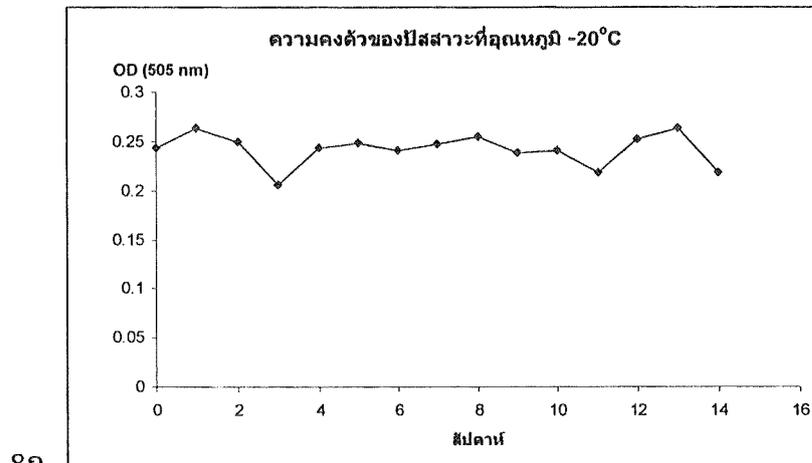


ผลการศึกษาความคงตัวของปัสสาวะซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ -20°C โดยทำการตรวจสอบสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นเท่ากับ 0.244 ซึ่งมีความเข้มข้น $12.8 \mu\text{mol/L}$ เมื่อเก็บไว้และทดสอบในสัปดาห์ที่ 1 ถึง 16 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงเป็น 0.264, 0.250, 0.206, 0.243, 0.248, 0.241, 0.247, 0.255, 0.238, 0.241, 0.219, 0.252, 0.264, 0.218, 0.205 และ 0.266 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 8ก. ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 13.9, 12.5, 11.4, 12.8, 13.0, 12.1, 13.0, 12.5, 12.5, 12.7, 12.9, 14.8, 15.5, 12.8, 11.4 และ 14.8 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 8ข. พบร้อยละการเปลี่ยนแปลงเท่ากับร้อยละ 13.9, 12.5, 11.4, 12.8, 13.1, 12.1, 13.0, 12.5, -2.2, -1.1, 0.4, 0.2, 21.1, 0.2, -11.3 และ 15.5 เมื่อเทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้น ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบความคงตัวของปัสสาวะที่อุณหภูมิ -20°C

สัปดาห์ที่	OD 505 nm	ความเข้มข้น ($\mu\text{mol/L}$)	% การเปลี่ยนแปลง	สัปดาห์ที่	OD 505 nm	ความเข้มข้น ($\mu\text{mol/L}$)	% การเปลี่ยนแปลง
0	0.244	12.8	0	9	0.238	12.5	-2.2
1	0.264	13.9	8.6	10	0.241	12.7	-1.1
2	0.250	12.5	-2.5	11	0.219	12.9	0.4
3	0.206	11.4	-10.9	12	0.252	14.8	0.2
4	0.243	12.8	-0.1	13	0.264	15.5	21.1
5	0.248	13.0	1.8	14	0.218	12.8	0.2
6	0.241	12.1	-5.9	15	0.205	11.4	-11.3
7	0.247	13.0	1.3	16	0.266	14.8	15.5
8	0.255	12.5	-2.3				

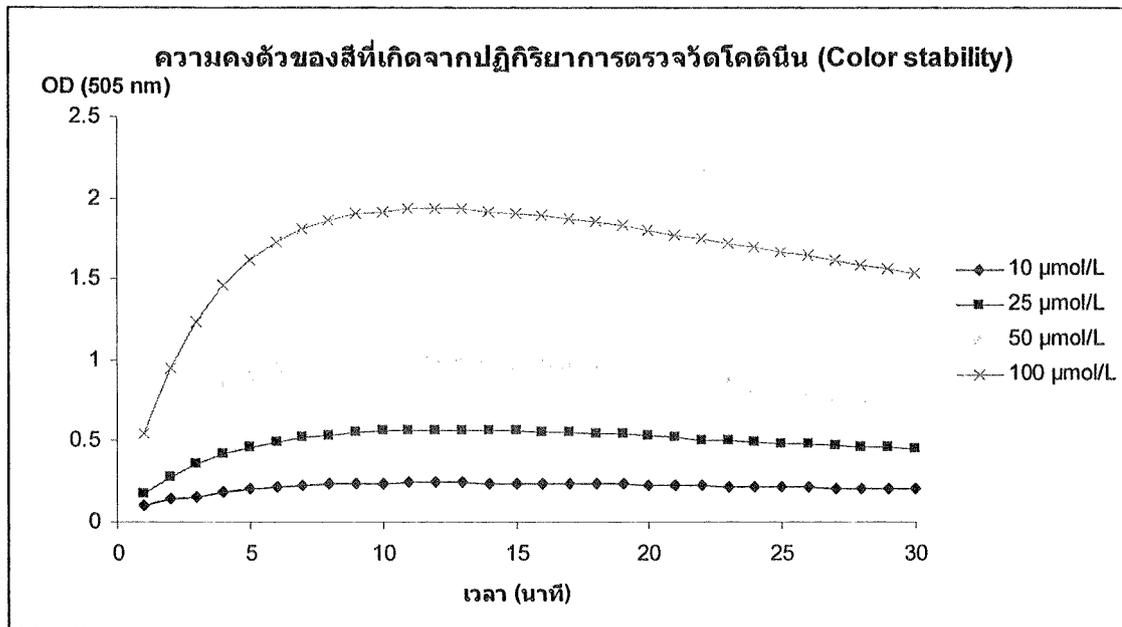
รูปที่ 8 ความคงตัวของปัสสาวะที่อุณหภูมิต่ำ -20°C



3. ผลการทดสอบความคงตัวของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาการตรวจวัดโคตินีน (Color stability)

การทดสอบความคงตัวของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาการตรวจวัด โดยตรวจวัดสารมาตรฐานโคตินีน ความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 µmol/L ตามวิธี DBA วัดค่าการดูดกลืนแสงทุกนาที่นับตั้งแต่เติมน้ำยาตัวสุดท้าย (barbituric acid) เป็นเวลา 30 นาที จากการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 µmol/L ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปแต่พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 11-13, 13, 10, และ 12 นาที ตามลำดับ ผลดังแสดงในรูปที่ 9 และภาคผนวก ข

รูปที่ 9 ผลการทดสอบความคงตัวของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาการตรวจวัดโคตินีน (Color stability)



สรุปผลการศึกษาข้อ 2.6 และ 2.7 และข้อ 3 ความคงตัวของสารมาตรฐานโคตินีน น้ำยาและตัวอย่างปัสสาวะ และความคงตัวของสีที่เกิดจากปฏิกิริยา

จากผลการศึกษาพบว่าสารมาตรฐานโคตินีนและน้ำยาที่ตรวจวัดมีความคงตัว 6 เดือนเมื่อเก็บที่ 4°C ส่วนตัวอย่างปัสสาวะมีความคงตัวที่อุณหภูมิห้องเท่ากับ 6 ชั่วโมง ที่ 4°C เท่ากับ 6 วัน ที่อุณหภูมิ -4°C เท่ากับ 12 สัปดาห์ และที่ -20°C เท่ากับ 16 สัปดาห์ ส่วนสีที่เกิดจากปฏิกิริยาพบว่า มีความคงตัว 10-15 นาที

4. การปรับปรุงวิธีการตรวจวัด

4.1 ผลการศึกษาการผสมน้ำยาก่อนการตรวจวัด

ผลการศึกษาการผสมน้ำยาก่อนการตรวจวัด โดยการผสมน้ำยา sodium acetate buffer กับ KCN พบว่าเมื่อทดสอบปฏิกิริยาทันทีที่เกิดปฏิกิริยามีค่าการดูดกลืนแสงเกิดขึ้น เมื่อทิ้งน้ำยาผสมไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 5 วันไม่เกิดปฏิกิริยา การผสมน้ำยา barbituric acid กับ chloramine-T ทดสอบปฏิกิริยาทันที พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบการผสมน้ำยา Sodium acetate buffer กับ KCN (แบบที่ 1) ขั้นตอนทดสอบคือ Standard + mixture + Chloramine-T + Barbituric acid การผสมน้ำยา Barbituric acid กับ Chloramine-T (แบบที่ 2) ขั้นตอนทดสอบคือ Standard + Sodium acetate buffer + KCN + mixture และ การผสมน้ำยา Sodium acetate buffer กับ Chloramine-T (แบบที่ 3) มีขั้นตอนทดสอบคือ 3.1) Standard + mixture + KCN + Barbituric acid และ 3.2) Standard + KCN + mixture + Barbituric acid

Cotinine standard ($\mu\text{mol/L}$)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD 505 nm)						
	แบบที่ 1		แบบที่ 2	แบบที่ 3			
	0 Day	5 Day		3.1		3.2	
			0 Day	3 Day	0 Day	3 Day	
5	0.045	no reaction	no reaction	0.134	-0.020	0.056	0.038
10	0.089			0.632	-0.018	0.116	0.073
15	0.128			0.519	0.008	0.166	0.087
25	0.211			0.618	0.065	0.247	0.140
50	0.465			0.995	0.210	0.761	0.283
100	0.882			1.394	0.468	1.289	0.567

ผลการศึกษาน้ำยา sodium acetate buffer กับ chloramine-T และสลับขั้นตอนการตรวจวัดตามวิธีการศึกษา 4.5.1.3 พบว่าเกิดปฏิกิริยาเมื่อทดสอบทันที การตรวจวัดด้วยขั้นตอน 4.5.1.3.1 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าการตรวจวัดด้วยขั้นตอน 4.5.1.3.2 เมื่อทิ้งน้ำยาผสมไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 3 วันพบว่าค่าการดูดกลืนแสงลดลงมาก ดังข้อมูลแสดงในตารางที่ 8

ผลการศึกษาน้ำยา sodium acetate buffer กับ barbituric acid และสลับขั้นตอนการตรวจวัดตามวิธี 4.5.1.4 พบว่าเมื่อทดสอบปฏิกิริยาทันทีที่เกิดปฏิกิริยาในการทดสอบด้วยขั้นตอน 4.5.1.4.1, 4.5.1.4.2, 4.5.1.4.3 และ 4.5.1.4.6 ไม่เกิดปฏิกิริยาในการทดสอบด้วยขั้นตอน 4.5.1.4.4 และ 4.5.1.4.5 เมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของขั้นตอนที่เกิดปฏิกิริยา พบว่า ขั้นตอน 4.5.1.4.2 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด และขั้นตอน 4.5.1.4.1, 4.5.1.4.6 และ 4.5.1.4.3 มีค่าการดูดกลืนแสงน้อยลงตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงผลการทดสอบการผสมน้ำยา sodium acetate buffer กับ barbituric acid

(แบบที่ 4) ขั้นตอนทดสอบคือ 4.1) Standard + mixture + KCN + chloramine-T

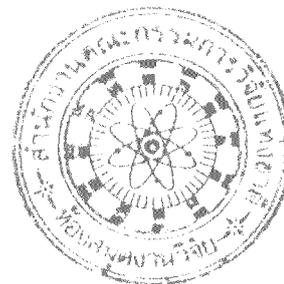
4.2) Standard + KCN + mixture + chloramine-T

4.3) Standard + KCN + chloramine-T + mixture

4.4) Standard + mixture + chloramine-T + KCN

4.5) Standard + chloramine-T + mixture + KCN

4.6) Standard + chloramine-T + KCN + mixture



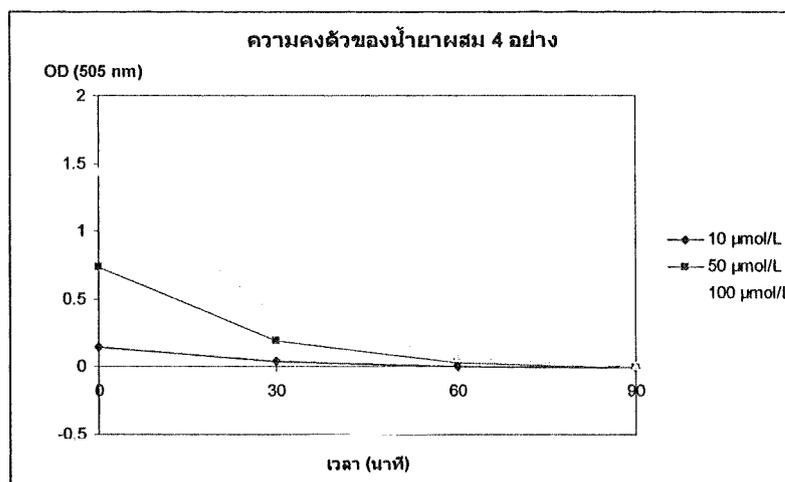
Cotinine standard (μmol/L)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD 505 nm)															
	แบบที่ 4															
	4.1					4.2						4.3	4.4	4.5	4.6	
0 week	1 week	2 week	3 week	4 week	0 week	1 week	2 week	3 week	4 week	5 week						
5	0.081	0.059	0.042	0.046	0.057	0.097	0.093	0.078	0.077	0.066	0.051	0.018	no reaction	no reaction	0.040	
10	0.168	0.099	0.087	0.079	0.095	0.190	0.184	0.160	0.155	0.136	0.098	0.030			0.072	
15	0.230	0.174	0.154	0.112	0.120	0.285	0.244	0.212	0.242	0.198	0.141	0.043			0.109	
25	0.350	0.242	0.237	0.207	0.182	0.464	0.449	0.389	0.378	0.339	0.196	0.074			0.183	
50	0.785	0.611	0.573	0.413	0.368	0.963	0.936	0.780	0.824	0.711	0.502	0.157			0.369	
100	1.531	1.074	0.981	0.915	0.713	1.802	1.716	1.574	1.443	1.298	0.912	0.298			0.774	

ผลการศึกษาน้ำยา 3 อย่างคือ sodium acetate buffer, chloramine-T และ barbituric acid ทดสอบปฏิกิริยาทันที พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยา การผสมน้ำยา 4 อย่างคือ sodium acetate buffer, KCN, chloramine-T และ barbituric acid ทดสอบปฏิกิริยาทันที พบว่าเกิดปฏิกิริยา จึงทดสอบความคงตัวของน้ำยาผสมโดยทิ้งน้ำยาผสมไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้วตรวจวัดทุก 30 นาทีเป็นเวลา 90 นาที พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปค่าการดูดกลืนแสงลดลงมากจนกระทั่งไม่เกิดปฏิกิริยาโดยสังเกตการลดลงได้ตั้งแต่การวัดในนาทีที่ 30 ดังแสดงในตารางที่ 10 และ รูปที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบการผสมน้ำยา sodium acetate buffer, chloramine-T และ barbituric acid ขั้นตอนทดสอบคือ Standard + mixture + KCN (แบบที่ 5), การผสมน้ำยา sodium acetate buffer, KCN, chloramine-T และ barbituric acid ขั้นตอนทดสอบคือ Standard + mixture + KCN (แบบที่ 6)

Cotinine standard ($\mu\text{mol/L}$)	ค่าการดูดกลืนแสง (OD 505 nm)				
	แบบที่ 5	แบบที่ 6			
		0 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที
10	no reaction	0.147	0.039	0.002	-0.010
50		0.733	0.192	0.032	-0.004
100		1.436	0.370	0.068	0.005

รูปที่ 10 แสดงผลการศึกษาความคงตัวของน้ำยาผสม 4 อย่าง (แบบที่ 6) คือ sodium acetate buffer, KCN, chloramine-T และ barbituric acid ทดสอบทุก 30 นาทีหลังการผสมน้ำยาทิ้งไว้



เนื่องจากจำนวนน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวัดมีหลายชนิดชนิด ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการรวมชนิดน้ำยาบางอย่างเข้าด้วยกัน เพื่อลดขั้นตอน เพื่อศึกษาผลการรวมน้ำยาก่อนการทำปฏิกิริยา ได้ออกแบบการศึกษาตามข้อ 4.1 ผลการศึกษาพบว่า สามารถรวมน้ำยา sodium acetate buffer และ barbituric acid (เรียกว่า mixture) เข้าด้วยกันโดยที่ยังให้ผลการทำปฏิกิริยาเหมือนการตรวจวัดในขั้นตอนปกติที่เติมน้ำยาทีละตัว

จากผลการศึกษาพบว่าขั้นตอนที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดคือ เติมตัวอย่าง + KCN + mixture + chloramine -T โดย mixture มีความคงตัว 1 เดือน

4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติของการผสมน้ำยา Barbituric acid กับ Sodium acetate buffer โดยใช้ขั้นตอนการทดสอบ คือ 4.5.1.4.2 standard + KCN + mixture 4 + chloramine-T

4.2.1 การศึกษาความแม่นยำของการตรวจวัดโคตินีนของน้ำยาผสม (Precision)

ผลการศึกษาความแม่นยำการตรวจวัดโคตินีนของน้ำยาผสมในตัวอย่างปัสสาวะของผู้สูบบุหรี่และในสารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 15 และ 25 $\mu\text{mol/L}$ ตรวจวัดตามขั้นตอน 4.5.1.4.2 พบว่า

4.2.1.1 ผลการทดสอบแบบ within-run

ผลการทดสอบปัสสาวะทำ 25 ครั้งติดต่อกันใน 1 วัน มีค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD) เท่ากับ 0.094 ± 0.010 มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) เท่ากับ 10.64

ผลการทดสอบสารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 15 และ 25 $\mu\text{mol/L}$ ทำ 25 ครั้งติดต่อกันใน 1 วัน มีค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean \pm SD) ความเข้มข้น 15 และ 25 $\mu\text{mol/L}$ เท่ากับ 0.208 ± 0.018 และ 0.338 ± 0.021 ตามลำดับ มีค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% CV) ความเข้มข้น 15 และ 25 $\mu\text{mol/L}$ เท่ากับ 8.65 และ 6.21 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 11 และภาคผนวก ข

ตารางที่ 11 ผลการศึกษาความแม่นยำการตรวจวัดโคตินีนของน้ำยาผสม (precision) แบบ within-run และ between-run ของตัวอย่างปัสสาวะและสารมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 15 และ 25 $\mu\text{mol/L}$

การทดสอบ		Urine	Cotinine standard	
			15 $\mu\text{mol/L}$	25 $\mu\text{mol/L}$
within-run (n=25)	mean	0.094	0.208	0.338
	SD	0.010	0.018	0.021
	% CV	10.64	8.65	6.21

4.2.2 ผลการศึกษาความถูกต้องของการตรวจวัดโคตินีนของน้ำยาผสม (Accuracy)

ผลการศึกษาความถูกต้องของการตรวจวัดโคตินีนของน้ำยาผสม โดยการเติมสารมาตรฐานโคตินีน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในปัสสาวะเท่ากับ 10, 25, 50, และ 100 $\mu\text{mol/L}$ และตรวจวัดตามขั้นตอน 4.5.1.4.2 คำนวณหาร้อยละการกลับคืน (% recovery) และ ร้อยละความคาดหวัง (% expectation) จากการศึกษาพบว่าค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery) เท่ากับ 95, 101, 100 และ 103 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 100 ค่าร้อยละความคาดหวัง (% expectation) เท่ากับ 97, 101, 100 และ 103 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 100 ดังแสดงในตารางที่ 12

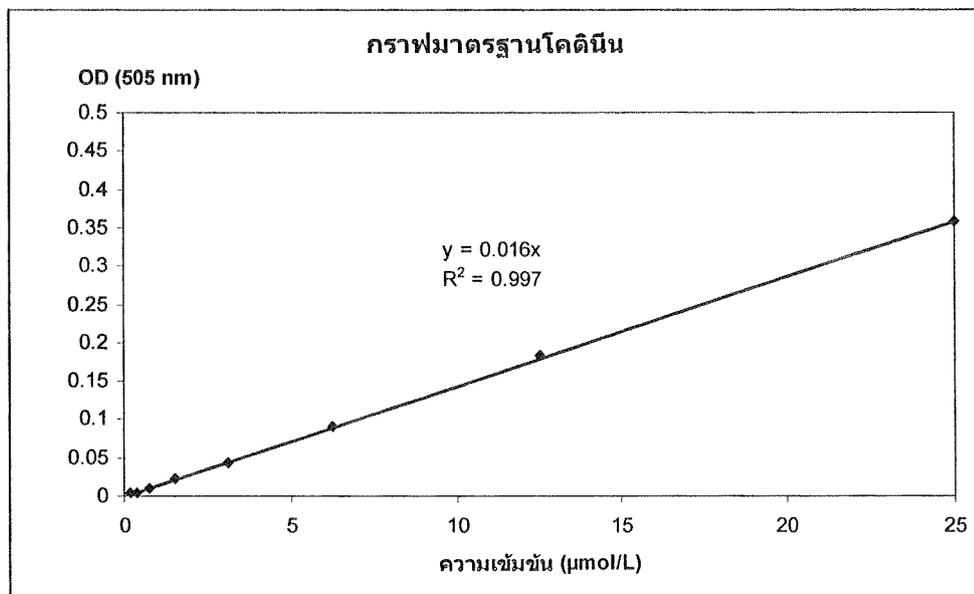
ตารางที่ 12 แสดงผลการศึกษาความถูกต้องของการตรวจวัดของน้ำยาผสม (Accuracy) แสดงค่าเป็นร้อยละการกลับคืน (% Recovery) และ ร้อยละความคาดหวัง (% Expectation)

ครั้งที่	ปัสสาวะ (μL)	Cotinine standard 500 $\mu\text{mol/L}$ (μL)	น้ำ กลั่น (μL)	ความ เข้มข้น cotinine standard ที่เติม ($\mu\text{mol/L}$)	ผลการตรวจวัด Cotinine: OD 505 nm [Conc. ($\mu\text{mol/L}$)]			วัด cotinine ที่เติมได้ ($\mu\text{mol/L}$)	% Recovery	% Expectation
					1	2	เฉลี่ย			
1	490	—	10	—	0.109 (6.81)	0.101 (6.31)	0.105 (6.56)	9.50	95	97
2	490	10	—	10	0.25 (15.63)	0.264 (16.50)	0.257 (16.06)			
3	475	—	25	—	0.099 (6.19)	0.107 (6.69)	0.103 (6.44)	25.31	101	101
4	475	25	—	25	0.487 (30.44)	0.529 (33.06)	0.508 (31.75)			
5	450	—	50	—	0.091 (5.69)	0.105 (6.56)	0.098 (6.13)	49.75	100	100
6	450	50	—	50	0.84 (52.50)	0.948 (59.25)	0.894 (55.88)			
7	400	—	100	—	0.093 (5.81)	0.086 (5.38)	0.0895 (5.59)	102.91	103	103
8	400	100	—	100	1.723 (107.69)	1.749 (109.31)	1.736 (108.50)			
								เฉลี่ย	100	100

4.2.3 ผลการศึกษาขีดจำกัดการตรวจวัดโคตินีนของน้ำยาผสม (Detection limit)

การทดสอบตรวจวัด blank ตามขั้นตอน 4.5.1.4.2 จำนวน 25 หลอดโดยใช้น้ำกลั่นปรับ
ศูนย์ แล้วนำผลมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยรวมกับสามเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean + 3 SD) เพื่อหา
ขีดจำกัดของการตรวจวัด ผลการศึกษาพบค่าการดูดกลืนแสงของหลอด blank มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.025 ค่า
เบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.00087 และค่าขีดจำกัดของการตรวจวัดเท่ากับ 0.00262 ซึ่งเมื่ออ่านจากกราฟ
มาตรฐานและคำนวณจากสมการมีความเข้มข้นเท่ากับ 1.75 $\mu\text{mol/L}$ ดังแสดงในรูปที่ 11 และภาคผนวก ญ

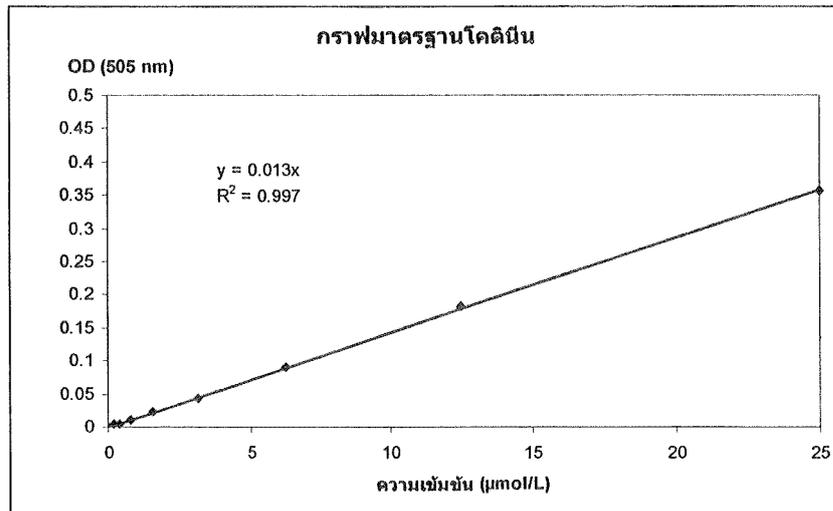
รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานของโคตินีน และสมการที่ใช้ในการคำนวณหาขีดจำกัดของการตรวจวัด
โคตินีนของน้ำยาผสม (Detection Limit)



4.2.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ของน้ำยาผสม (Sensitivity)

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ ศึกษาโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานโค
ตินีน ความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 และ 25 $\mu\text{mol/L}$ ตรวจวัดตามขั้นตอน 4.5.1.4.2
นำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานความเข้มข้นต่ำสุดที่อยู่บนเส้นตรง ถือว่าเป็นความไวของการตรวจวัดจาก
การศึกษาพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.25 $\mu\text{mol/L}$ ดังแสดงในรูปที่ 12 และภาคผนวก ญ

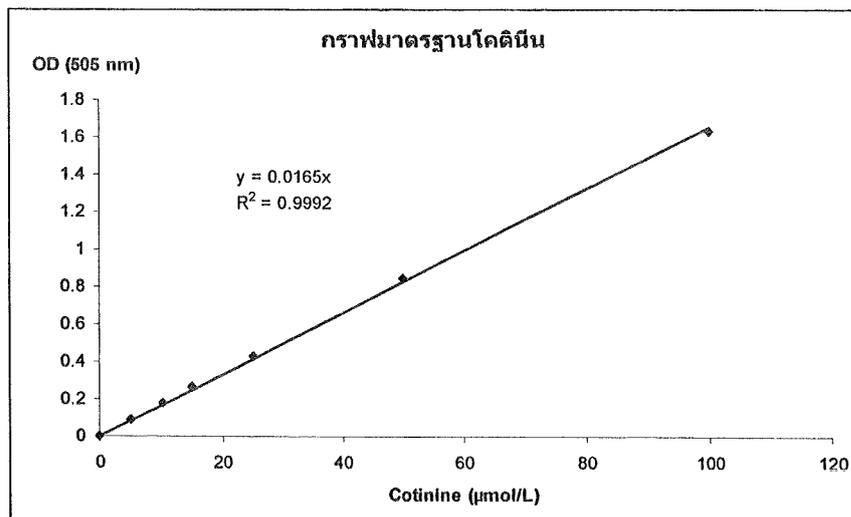
รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานของโคตินีนมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ของน้ำยาผสม (Sensitivity) เท่ากับ $0.25 \mu\text{mol/L}$



4.2.5 ผลการศึกษาค่าความเป็นเส้นตรงของการตรวจวัดโคตินีน (Linearity)

การศึกษาค่าความเป็นเส้นตรงโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 5, 10, 15, 25, 50, 100 และ $200 \mu\text{mol/L}$ และตรวจวัดตามวิธี DBA นำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน และความเข้มข้นมากที่สุดที่ยังอยู่บนเส้นตรงของกราฟมาตรฐานถือว่าเป็นค่าความเป็นเส้นตรง จากผลการศึกษาพบว่า มีค่าเท่ากับ $100 \mu\text{mol/L}$ ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ ดังแสดงในรูปที่ 13 และภาคผนวก ก

รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานโคตินีนมีค่าความเป็นเส้นตรงของน้ำยาผสม (Linearity) เท่ากับ $100 \mu\text{mol/L}$

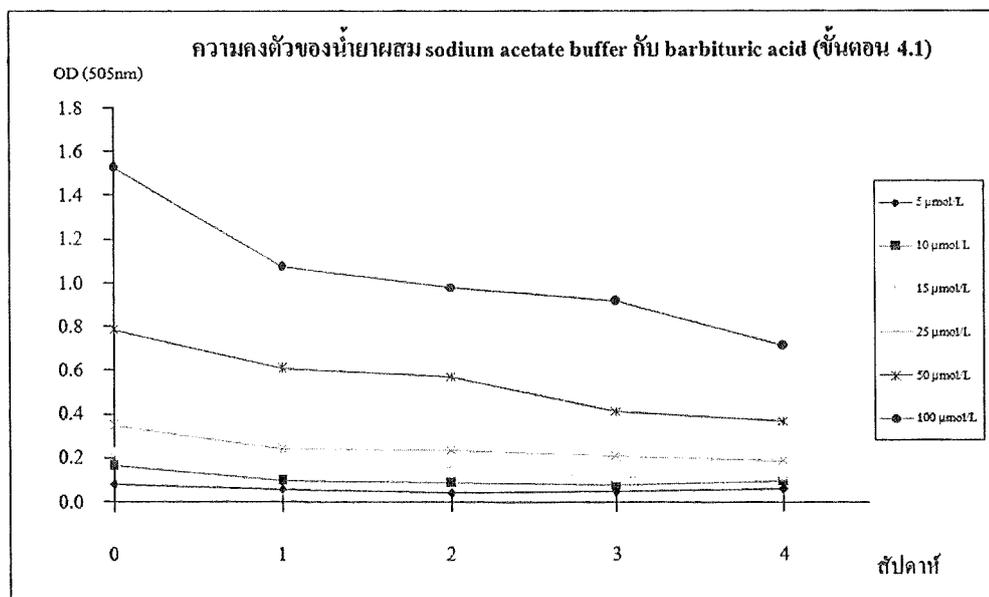


4.2.6 ผลการทดสอบความคงตัวของสารมาตรฐานและน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวัด (Stability)

การทดสอบความคงตัวของน้ำยาผสมระหว่าง barbituric acid กับ sodium acetate buffer (mixture 4) ในการศึกษา โดยตรวจวัดสารละลายมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 5, 10, 15, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ ซึ่งตรวจวัดตามวิธีในข้อ 4.5.1.4.1 ตรวจวัดทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และ 4.5.1.4.2 ตรวจวัดทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 5 สัปดาห์ โดยน้ำยาและสารละลายมาตรฐาน เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°C

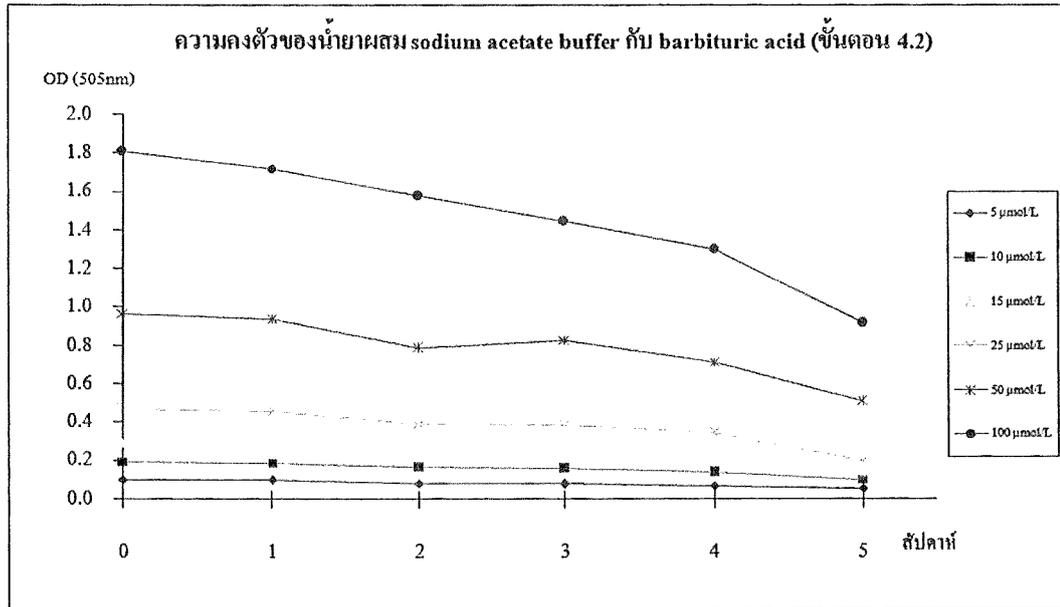
ผลการศึกษาพบว่าขั้นตอน 4.5.1.4.1 ตรวจเป็นเวลา 4 สัปดาห์เมื่อเวลาผ่านไปมากขึ้นทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง โดยเฉพาะในช่วงความเข้มข้นสูง (50-100 $\mu\text{mol/L}$) พบความเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงมาก คือมีค่าลดลงมากโดยสังเกตได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 และช่วงความเข้มข้น 5, 10, 15, 25 $\mu\text{mol/L}$ พบความเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงน้อย ดังแสดงในตารางที่ 9 และ รูปที่ 14

รูปที่ 14 ผลการทดสอบความคงตัวของน้ำยาผสม sodium acetate buffer กับ barbituric acid ขั้นตอนทดสอบคือ Standard + mixture + KCN + chloramine-T (ขั้นตอน 4.1) เมื่อน้ำยาผสมไว้ที่ 4°C ตรวจวัดทุกสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ส่วนขั้นตอน 4.5.1.4.2 ตรวจเป็นเวลา 5 สัปดาห์เมื่อเวลาผ่านไปมากขึ้นทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง โดยเฉพาะในช่วงความเข้มข้นสูง (50-100 $\mu\text{mol/L}$) พบความเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงมาก คือมีค่าลดลงมากโดยสังเกตได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 และช่วงความเข้มข้น 5, 10, 15, 25 $\mu\text{mol/L}$ พบความเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงน้อย ดังแสดงในตารางที่ 9 และ รูปที่ 15

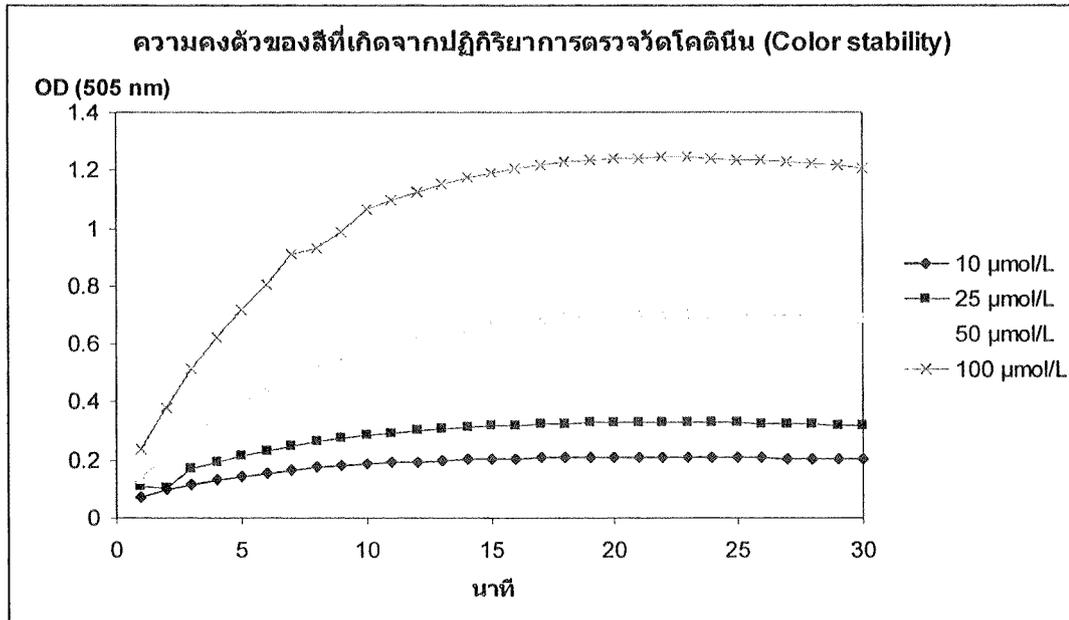
รูปที่ 15 ผลการทดสอบความคงตัวของน้ำยาผสม sodium acetate buffer กับ barbituric acid ขั้นตอนทดสอบคือ Standard + KCN + mixture + chloramine-T (ขั้นตอน 4.2) เมื่อทิ้งน้ำยาผสมไว้ที่ 4°C ตรวจวัดทุกสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 สัปดาห์



4.5.2.7 ผลการทดสอบความคงตัวของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาการตรวจวัดโคตินีนของน้ำยาผสม (Color Stability)

การทดสอบความคงตัวของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาการตรวจวัด โดยตรวจวัดสารมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 µmol/L ตามวิธี 4.5.1.4.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงทุกนาที่นับตั้งแต่เติมน้ำยาดิวสไต (Chloramine-T) เป็นเวลา 30 นาที จากการศึกษพบว่าที่ความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 µmol/L ค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปแต่พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 19-24, 22, 22-24 และ 22-23 นาที ตามลำดับ ดังแสดงผลในรูปที่ 16 และภาคผนวก รู

รูปที่ 16 ผลการทดสอบความคงตัวของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาการตรวจวัดโคตินีนของน้ำยาผสม (Color Stability)



ผลการศึกษาคุณสมบัติของน้ำยาที่ยุบรวม ได้ศึกษาตามผลการศึกษาในข้อ 4.2

ผลการศึกษาความแม่นยำการตรวจวัดโคตินีนหลังการพัฒนาชุดทดสอบพบว่า มีความแม่นยำแบบ within-run โดยมีค่า %CV 6-10 มีค่าความถูกต้อง (accuracy) เท่ากับ 100% ขีดจำกัดการตรวจวัดเท่ากับ 1.75 µmol/L มีความไวของการทดสอบ (sensitivity) 0.25 µmol/L และค่าความเป็นเส้นตรงเท่ากับ 100 µmol/L น้ำยาผสมมีความคงตัว 1 เดือน

4.5 ผลการศึกษาเปรียบเทียบชุดตรวจโคตินีนที่ปรับปรุงขึ้นเทียบกับชุดตรวจ COT one step test device

ผลการตรวจโคตินีนในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 50 ราย ด้วยวิธี COT และวิธีที่พัฒนาขึ้นพบว่า COT ให้ผลบวก 9 ราย ส่วนวิธีที่พัฒนาขึ้นให้ผลบวก 8 ราย เมื่อนำมาคำนวณความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าการทำนายผลบวก (positive predictive value) และค่าการทำนายผลลบ (negative predictive value) พบว่ามีค่าเท่ากับ 100%, 98%, 89% และ 100% ตามลำดับ ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ผลการคำนวณหาความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวก และค่าการทำนายผลลบ
ของวิธีที่พัฒนาขึ้นและวิธี COT

		วิธีที่พัฒนา		รวม
		+	-	
COT	+	8	1	9
	-	0	41	41
	รวม	8	42	50

