บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐานกลุ่มแอมเฟตามีนเชิงคุณภาพ

การวิเคราะห์สารมาตรฐานกลุ่มแอมเฟตามีนเชิงคุณภาพนี้มีจุดประสงค์หลัก เพื่อหา internal standard ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์แอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนเชิงปริมาณ จากการศึกษาตามวิธีในข้อ 3.5.1 หน้า 14 ได้ผลดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 และรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่า ฟีนิลโปรปาโนลามีน แอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีน แยกออกจากกันได้ชัดเจน แต่เอฟีดรีน และเมทแอมเฟตามีน มีค่า retention time ใกล้เคียงกับ แอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน ตามลำดับ โดยที่การศึกษาในตอนต่อ ๆ ไป จะเน้นหนักในการวิเคราะห์ปริมาณของแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน จึงเลือกใช้ ไทรามีน เป็น internal standard

4.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของ อุณหภูมิ และ เวลาต่อการเตรียมอนุพันธ์ ไตรฟลูโอโรอะเซตามีดของแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีน

ผลการศึกษาเพื่อเลือกอุณหภูมิ และ เวลา ที่เหมาะสมในการเตรียมอนุพันธ์ของแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีน ซึ่งเป็น internal standard กับ ไตรฟลูโอโรอะซีติคแอนไฮไดรด์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 และ 60 นาที เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 และ 30 นาที ตามวิธีในข้อ 3.5.2 หน้า 15 แสดงไว้ในรูปที่ 4 เห็นได้ว่า ความสูงของพีคเมื่อเตรียมอนุพันธ์ของพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 และ 30 นาที สูงกว่าเมื่อเตรียมอนุพันธ์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนความสูงของพีคของแอมเฟตามีน เมื่อเตรียมอนุพันธ์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 และ 30 นาที ต่ำกว่าพีคเมื่อใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เล็กน้อย ในการเตรียมอนุพันธ์ระหว่าง แอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน กับไตรฟลูโอโรอะซีติค แอนไฮไดรด์ จึงเลือกใช้สภาวะที่

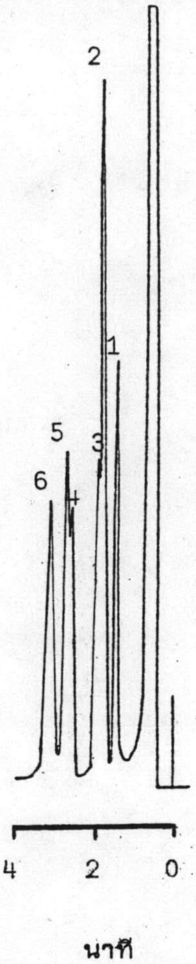
ตารางที่ 1 ค่า retention time ของสารมาตรฐานกลุ่มแอมเฟตามีน

สารมาตรฐาน	retention time (นาที)
ฟีนิลโปรปาโนลามีน	1.4
แอมเฟตามีน	1.7
เอฟฟีดรีน	1.8
พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน	2.5
เมทแอมเฟตามีน	2.7
ไทรามีน	3.0

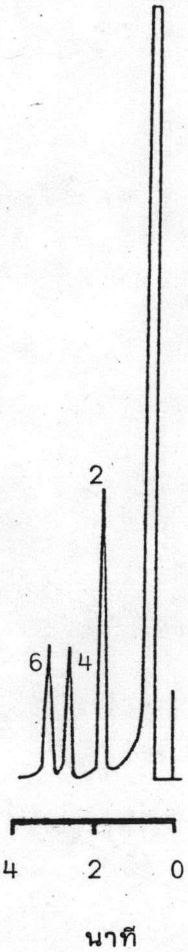
คอลัมน์	1500 x 4 มิลลิเมตร 3% OV-17 บน Gas Chrom Q, 100 - 120 mesh		
ดีเทคเตอร์	FID		
อุณหภูมิ	อินเจคเตอร์	250	องศาเซลเซียส
	คอลัมน์	175	องศาเซลเซียส
	ดีเทคเตอร์	250	องศาเซลเซียส
แก๊สตัวพา	ไนโตรเจน อัตราเร็ว 40 มิลลิลิตร ต่อนาที		

<u>รูปที่ 3</u> โครมาโตแกรมการวิเคราะห์อนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามิดของสารมาตรฐานกลุ่มแอมเฟตามีน

ก. เมื่อใช้สารมาตรฐาน 6 ชนิด



ข. เมื่อใช้สารมาตรฐาน 3 ชนิด



คอลัมน์	1500 X 4 มิลลิเมตร 3 % OV-17 บน Gas Chrom Q 100-120 mesh
ดีเทคเตอร์	FID
อุณหภูมิ	อินเจคเตอร์ 250 องศาเซลเซียส
	คอลัมน์ 175 องศาเซลเซียส
	ดีเทคเตอร์ 250 องศาเซลเซียส
แก๊สตัวพา	ไนโตรเจน อัตราเร็ว 40 มิลลิลิตรต่อนาที
สารที่ตรวจพบ	1. ฟีนิลโปรปาโนลามีน 2. แอมเฟตามีน
	3. เอฟิดรีน 4. พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน
	5. เมทแอมเฟตามีน 6. ไทรามีน

อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4.3 กราฟมาตรฐานของแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีน

จากการสร้างกราฟมาตรฐานของแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีน ดังรายละเอียดในข้อ 3.5.6.1 หน้า 16 โดยใช้สารละลายแอมเฟตามีน พาราไฮ-ดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีนมาตรฐาน 10-40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลดังแสดงไว้ในรูปที่ 5 กราฟนี้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสูงของพีคของสารทั้งสาม กับความเข้มข้นของสารนั้นในเอทิลอะซีเตท และใช้กราฟนี้เป็นมาตรฐานในการหาเปอร์เซ็นต์รีคอบ-เวอรีของการสกัดสาร จากปัสสาวะและซีรัม และใช้ศึกษาผลของขั้นตอนการทำกลูคิวโรไนด์ไฮโดรไลซีสต่อการวิเคราะห์ปริมาณแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วย

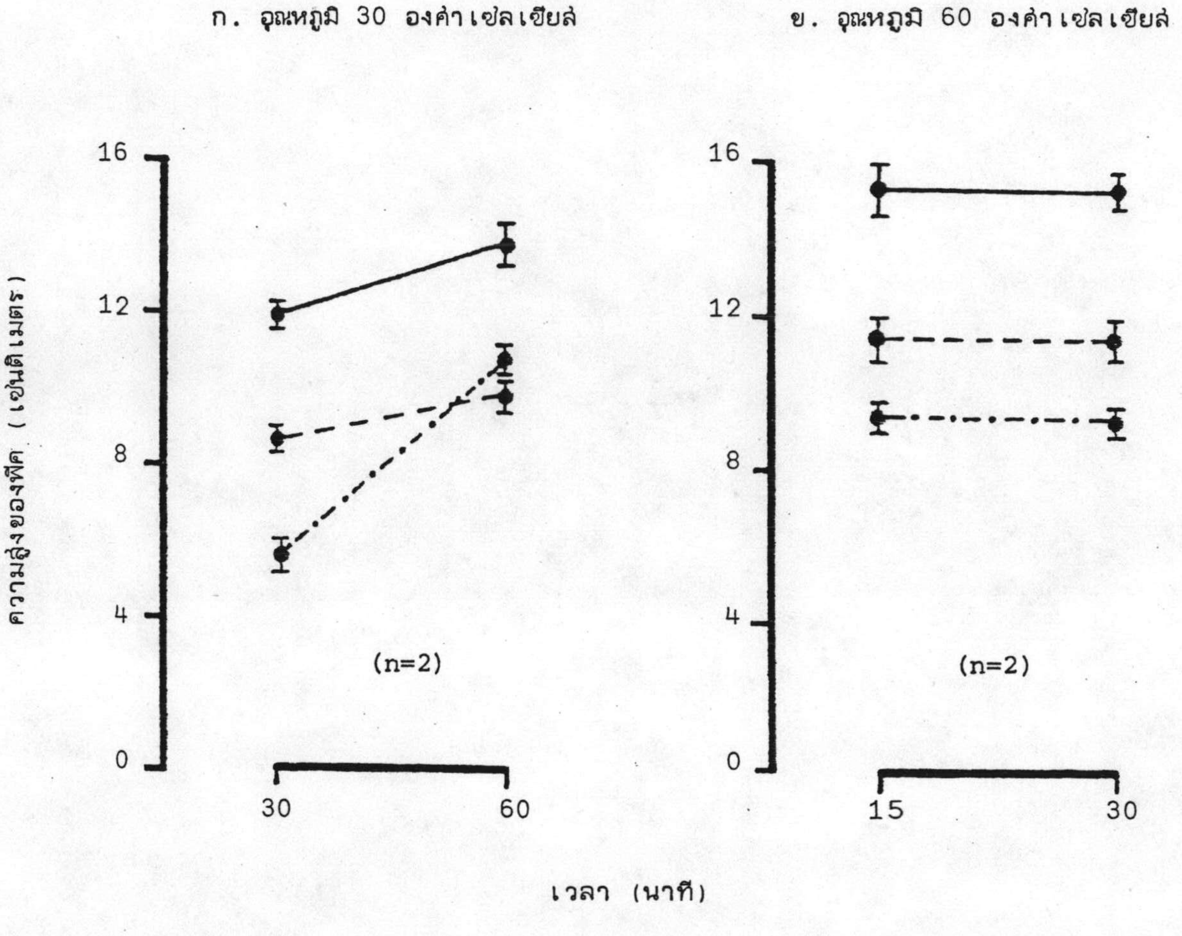
4.4 ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรีของการสกัด แอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟ-ตามีนและ ไทรามีน จากปัสสาวะ

ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรีของการสกัดแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟ-ตามีน และไทรามีน จากปัสสาวะ ตามวิธีในข้อ 3.5.6.2 หน้า 17 แสดงไว้ในตารางที่ 2 ปรากฏว่าเปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรีของการสกัดแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีนจากปัสสาวะอยู่ระหว่าง 81.3 - 89.8, 90.7 - 103.2 และ 68.0 - 79.8 % ตามลำดับ

4.5 ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรีของการสกัด แอมเฟตามีน และไทรามีน จากซีรัม

ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรีของการสกัด แอมเฟตามีน และไทรามีน จากซีรัม ตามวิธีในข้อ 3.5.6.3 หน้า 17 แสดงไว้ในตารางที่ 3 ปรากฏว่าเปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรีของการสกัด แอมเฟตามีน และไทรามีนจากซีรัมอยู่ระหว่าง 97.4 - 108.6 และ 55.6 - 61.2 % ตามลำดับ

รูปที่ 4 อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาต่อการเตรียมอนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามีด



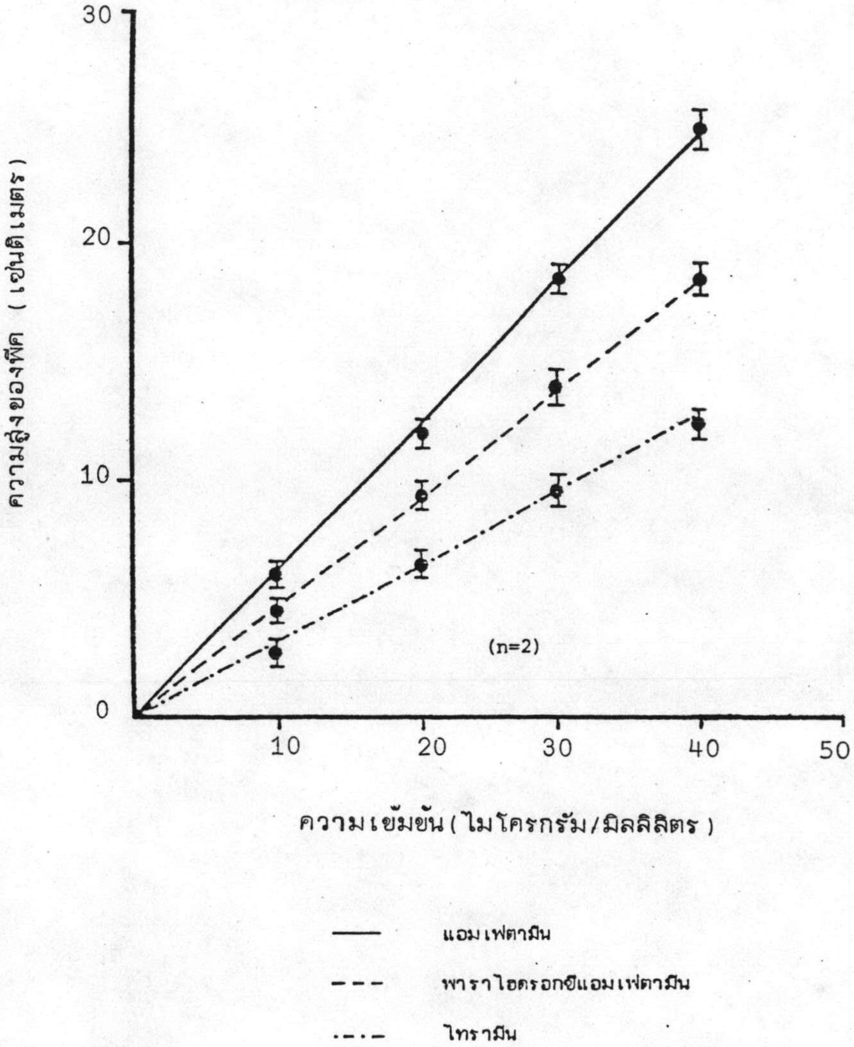
วิธีทำ สารละลายแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และ ไทรามีนมาตรฐาน (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 5-10 ไมโครกรัม ระเหยให้แห้ง แล้วเติมเอทิลอะซีเตทและไตรฟลูโอโรอะซีติคแอนไฮไดรด์ อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 หรือ 60 องศาเซลเซียส นาน 15-60 นาที วิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี ใช้สภาวะเช่นเดียวกับที่แสดงไว้ในรูปที่ 3

-·-·- แอมเฟตามีน

—— พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน

- - - - ไทรามีน

<u>รูปที่5</u> กราฟมาตรฐานของแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และ ไทรามีน



<u>วิธีทำ</u> สารละลายแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และ ไทรามีนมาตรฐาน ในเอทิลอะซีเตท 10-40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมอนุพันธ์กับไตรฟลูโอโรอะซีติคแอนไฮไดรด์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที วิเคราะห์อนุพันธ์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

คอลัมน์	1500 X 4 มิลลิเมตร 3% OV-17 บน Gas Chrom Q 100-120 mesh
ดีเทคเตอร์	FID
อุณหภูมิ	อินเจคเตอร์ 250 องศาเซลเซียส
	คอลัมน์ 175 องศาเซลเซียส
	ดีเทคเตอร์ 250 องศาเซลเซียส
แก๊สตัวพา	ไนโตรเจน อัตราเร็ว 40 มิลลิลิตรต่อนาที

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรีของการสกัดแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีน จากปัสสาวะ

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	n	เปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรี
แอมเฟตามีน	10	3	84.7 ± 3.4
	20	4	87.3 ± 2.5
พาราไฮดรอกซี-แอมเฟตามีน	10	3	97.0 ± 6.2
	20	4	95.5 ± 4.8
ไทรามีน	10	3	73.9 ± 5.9
	20	4	75.5 ± 2.0

วิธีทำ สารละลายแอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และไทรามีนมาตรฐานในปัสสาวะ 10 - 20 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท เตรียมอนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามีด และวิเคราะห์อนุพันธ์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี ใช้สภาวะเช่นเดียวกับที่แสดงไว้ในรูปที่ 5

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรีของการสกัดแอมเฟตามีน และไทรามีน จากซีรัม

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	n	เปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรี
แอมเฟตามีน	10	3	104.0 $\pm$ 4.6
	20	3	101.0 $\pm$ 3.6
ไทรามีน	10	3	58.4 $\pm$ 2.8
	20	3	57.7 $\pm$ 2.1

วิธีทำ สารละลายแอมเฟตามีน และไทรามีนมาตรฐานในซีรัม 10 - 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท เตรียมอนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามีด และวิเคราะห์ อนุพันธ์ โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี ใช้สภาวะเช่นเดียวกับที่แสดงไว้ในรูปที่ 5

4.6 <u>ผลการศึกษาอิทธิพลของขั้นตอนการทำ กลูคิวโรไนด์ ไฮโดรไลซิส ต่อการวิเคราะห์ปริมาณแอมเฟตามีน และ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะ</u>

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนที่เติมลงในปัสสาวะ ที่ไฮโดรไลซ์ทิ้งไว้แล้วนำไปสกัด เปรียบเทียบกับปริมาณที่วิเคราะห์ได้จากการเติมสารมาตรฐานลงในปัสสาวะ แล้วไฮโดรไลซ์ทันทีก่อนการสกัด ผลการศึกษาตามวิธีในข้อ 3.5.7 หน้า 17 ปรากฏว่าปริมาณแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะทั้งสองกรณี ไม่แตกต่างกันดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 คือ แอมเฟตามีน และ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะที่วิเคราะห์ได้ เท่ากับ 9.5 และ 9.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การวิเคราะห์แอมเฟตามีน และ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนมาตรฐานในปัสสาวะสุนัขปรกติในการศึกษาต่อ ๆ มา จึงไฮโดรไลซ์ปัสสาวะสุนัขปรกติเตรียมไว้ก่อน เมื่อต้องการใช้ก็เติมสารมาตรฐาน แล้วจึงนำไปวิเคราะห์

<u>ตารางที่ 4</u> ผลการวิเคราะห์ปริมาณแอมเฟตามีน และ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนที่เติมลงในปัสสาวะ

สารมาตรฐาน	ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ในปัสสาวะที่ไฮโดรไลซ์ทิ้งไว้ (n=4)	ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ในปัสสาวะที่ไฮโดรไลซ์ทันทีก่อนการวิเคราะห์ (n=4)
แอมเฟตามีน	9.5 ± 0.4	9.5 ± 0.7
พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน	9.4 ± 0.9	9.4 ± 1.0

<u>วิธีทำ</u> สารละลายแอมเฟตามีน และ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน มาตรฐาน 10 ไมโครกรัม เติมปัสสาวะสุนัขปรกติ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปไฮโดรไลซ์ตามวิธีในข้อ 3.5.3 หน้า 15 หรือ เติมปัสสาวะสุนัขปรกติที่ผ่านการไฮโดรไลซ์แล้ว 1.5 มิลลิลิตร สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท เตรียมอนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามีดและวิเคราะห์อนุพันธ์ โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี ใช้สภาวะเช่นเดียวกับที่แสดงไว้ในรูปที่ 5

I15476595

4.7 กราฟมาตรฐานของแอมเฟตามีนในซีรัม

จากการสร้างกราฟมาตรฐานของแอมเฟตามีนในซีรัม ดังรายละเอียดในข้อ 3.5.8 หน้า 18 โดยใช้สารละลายแอมเฟตามีนมาตรฐาน 1-8 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ได้ผลดังแสดงไว้ในรูปที่ 6 กราฟนี้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความสูงของพีค ต่อไทรามีน กับความเข้มข้นของแอมเฟตามีนในซีรัม และใช้กราฟนี้เป็นมาตรฐานในการหาปริมาณแอมเฟตามีนในซีรัมของสุนัขที่ศึกษา

4.8 กราฟมาตรฐานของแอมเฟตามีน และ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะ

จากการสร้างกราฟมาตรฐานของแอมเฟตามีน และ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะ ดังรายละเอียดในข้อ 3.5.9 หน้า 18 โดยใช้สารละลายแอมเฟตามีน และ พารา-ไฮดรอกซีแอมเฟตามีนมาตรฐาน 2-20 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ได้ผลดังแสดงไว้ในรูปที่ 7 กราฟนี้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนความสูงของพีคของแอมเฟตามีน หรือ พาราไฮดรอก-ซีแอมเฟตามีน ต่อไทรามีน กับความเข้มข้นของสารทั้งสองในปัสสาวะ และใช้กราฟนี้เป็นมาตรฐานในการหาปริมาณแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะของสุนัขที่ศึกษา

4.9 ผลการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมเฟตามีนในซีรัม

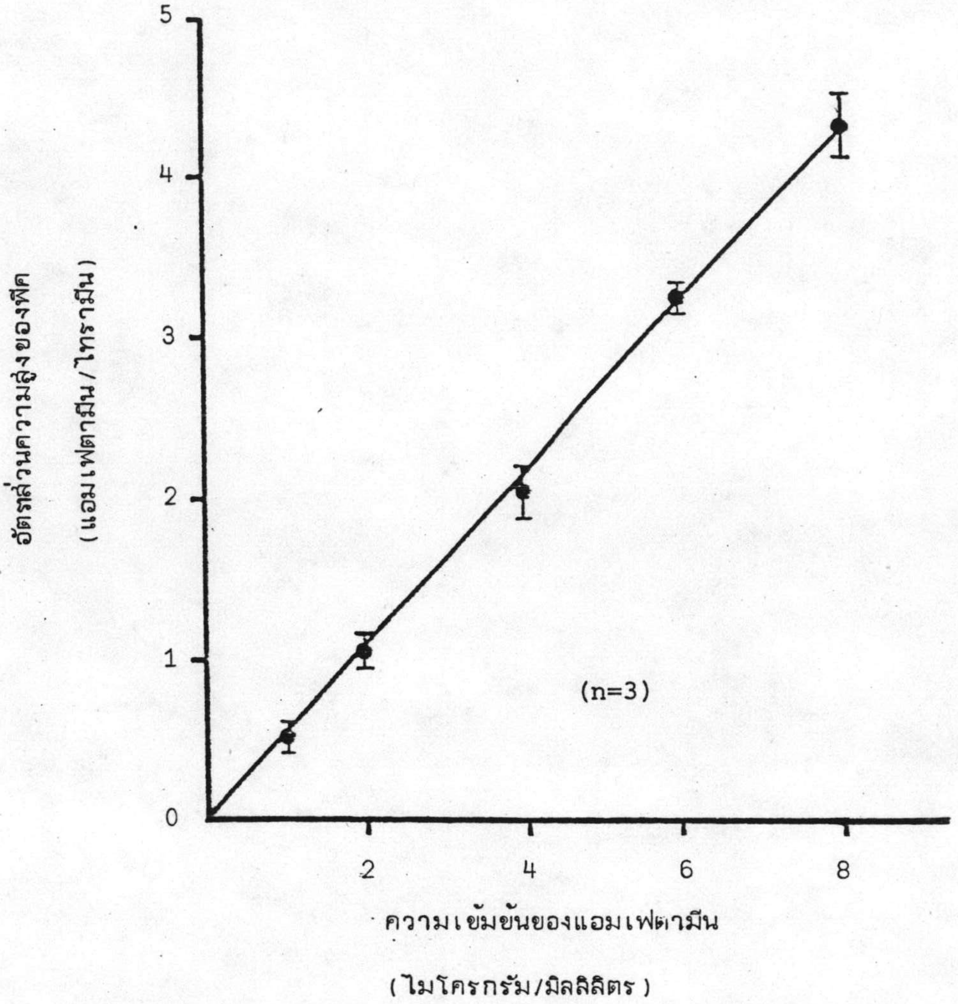
4.9.1 ความไว

จากการศึกษาความไวของวิธีวิเคราะห์แอมเฟตามีนในซีรัม ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี ตามการทดลองในข้อ 3.5.10.1 หน้า 19 โดยทำการทดลองซ้ำกัน 4 ครั้ง ปรากฏว่าความไวของการวัดปริมาณแอมเฟตามีนในซีรัม โดยวิธีนี้เท่ากับ 0.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.9.2 ความแม่นยำ

ความแม่นยำของวิธีวัด แสดงถึงความสามารถในการวัดปริมาณของสารในตัวอย่างเดียวกัน ในการทดลองแต่ละครั้งว่าได้ค่าใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยมากน้อยเพียงใด ซึ่งความแม่นยำของวิธีวัดได้จากการคำนวณหาค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน จากตารางที่ 5 เห็นได้ว่าความแม่นยำของการวิเคราะห์แอมเฟตามีนในซีรัมในการทดลองเดียวกัน มีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเป็น 4.57, 6.49 และ 3.57 ส่วนความแม่นยำในระหว่างการ

<u>รูปที่ 6</u> กราฟมาตรฐานของแอมเฟตามีนในซีรัม



<u>วิธีทำ</u> สารละลายแอมเฟตามีนมาตรฐานในน้ำ (0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)1-8ไมโครกรัม

สารละลายไทรามีนมาตรฐานในน้ำ (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)5 ไมโครกรัม

(INTERNAL STANDARD)

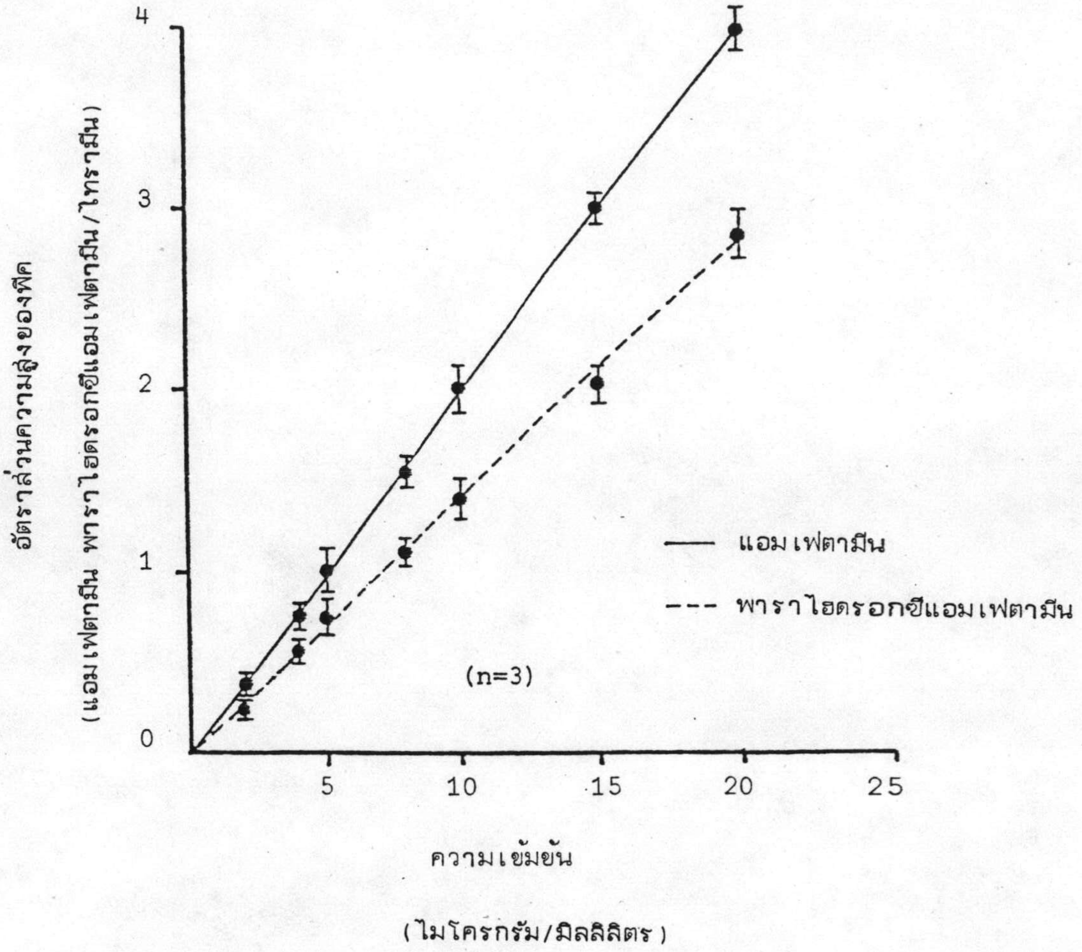
ปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วยซีรัม

สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท และ เตรียมอนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามิด

วิเคราะห์อนุพันธ์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

คอลัมน์	1500 X 4 มิลลิเมตร 3% OV-17 บน Gas Chrom Q 100-120 mesh
ดีเทคเตอร์	FID
อุณหภูมิ	อินเจคเตอร์ 250 องศาเซลเซียส
	คอลัมน์ 175 องศาเซลเซียส
	ดีเทคเตอร์ 250 องศาเซลเซียส
แก๊สตัวพา	ไนโตรเจน อัตราเร็ว 40 มิลลิลิตรต่อนาที

<u>รูปที่ 7</u> กราฟมาตรฐานของแอมเฟตามีน และ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน ในปัสสาวะ



<u>วิธีทำ</u> สารละลายแอมเฟตามีน และ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนมาตรฐานในน้ำ (0.4 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 2-20 ไมโครกรัม

สารละลายไทรามีนมาตรฐานในน้ำ (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครกรัม (INTERNAL STANDARD)

ปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตรด้วยปัสสาวะ

สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท และ เตรียมอนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามิด

วิเคราะห์อนุพันธ์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

คอลัมน์	1500 X 4 มิลลิเมตร 3% OV-17 บน Gas Chrom Q 100-120 mesh
ดีเทคเตอร์	FID
อุณหภูมิ	อินเจคเตอร์ 250 องศาเซลเซียส
	คอลัมน์ 175 องศาเซลเซียส
	ดีเทคเตอร์ 250 องศาเซลเซียส
แก๊สตัวพา	ไนโตรเจน อัตราเร็ว 40 มิลลิลิตรต่อนาที

ทดลอง มีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนเป็น 8.29, 7.90 และ 6.62 ที่ความเข้มข้นของแอมเฟตามีนในซีรัม 2, 4 และ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4.9.3 ความถูกต้อง

ความถูกต้องของวิธีวัด แสดงถึงการวัดปริมาณของสารในตัวอย่างว่าได้ค่าใกล้เคียงกับที่มีอยู่จริงเพียงใดซึ่งความถูกต้องของวิธีแสดงด้วยเปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรีดังตารางที่ 6 ได้ค่าเปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรีของการวิเคราะห์ปริมาณแอมเฟตามีนในซีรัมเท่ากับ 93.2 และ 107.5 % ที่ระดับความเข้มข้น 3.70 และ 8.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ความแม่นยำของการวัดปริมาณแอมเฟตามีนในซีรัมด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

ความเข้มข้นของแอมเฟตามีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	การทดลองเดียวกัน			ระหว่างการทดลอง		
	$\bar{X} \pm$ SD (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	n	%CV	$\bar{X} \pm$ SD (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	n	% CV
2	1.97 ± 0.09	3	4.57	2.05 ± 0.17	10	8.29
4	3.70 ± 0.24	3	6.49	4.05 ± 0.32	10	7.90
8	8.40 ± 0.30	3	3.57	8.16 ± 0.54	10	6.62

ตารางที่ 6 ความถูกต้องของการวัดปริมาณแอมเฟตามีนในซีรัมด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

ความเข้มข้นของแอมเฟตามีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	แอมเฟตามีนที่เติม (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	แอมเฟตามีนที่วัดได้ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	n	% รีคอบเวอรี
1.97	2	3.70	3	93.2
	6	8.57	3	107.5

4.10 ผลการทดสอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอก-ซีแอมเฟตามีน ในปัสสาวะ

4.10.1 ความไว

จากการศึกษาความไวของวิธีวิเคราะห์แอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟ-ตามีนในปัสสาวะ ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี ตามการทดลองในข้อ 3.5.11.1 หน้า 20 โดยทำการทดลองซ้ำกัน 4 ครั้ง ปรากฏว่า ความไวของวิธีวิเคราะห์ แอมเฟตามีน เท่ากับ 0.97 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความไวของวิธีวิเคราะห์ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน เท่ากับ 2.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.10.2 ความแม่นยำ

จากตารางที่ 7 และ 8 เห็นได้ว่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ปริมาณแอมเฟ-ตามีน 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดลองเดียวกัน และในระหว่างการทดลอง มีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เป็น 3.01, 5.22 และ 4.44 และ 6.31, 5.14 และ 6.57 ตามลำดับ ส่วนความแม่นยำของการวิเคราะห์ปริมาณพาราไฮดรอกซีแอมเฟ-ตามีน 5, 10 และ 20 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ในการทดลองเดียวกัน และในระหว่างการทดลอง มีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เป็น 4.28, 3.04 และ 3.15,และ 6.31, 5.81 และ 7.21 ตามลำดับ

4.10.3 ความถูกต้อง

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน ในปัสสาวะ แสดงด้วยเปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรี ดังตารางที่ 9 และ 10 ได้ค่าเปอร์เซ็นต์รีคอบ-เวอรีของการวิเคราะห์แอมเฟตามีน เท่ากับ 103.9 และ 99.8 % ที่ระดับความเข้มข้น 10.72 และ 20.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรีของการวิเคราะห์ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนเท่ากับ 94.0 และ 102.4 % ที่ระดับความเข้มข้น 9.53 และ 20.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 7 ความแม่นยำของการวัดปริมาณแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

ความเข้มข้นของแอมเฟตามีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	การทดลองเดียวกัน			ระหว่างการทดลอง		
	$\bar{X} \pm SD$ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	n	%CV	$\bar{X} \pm SD$ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	n	%CV
5	5.32 ± 0.16	3	3.01	5.23 ± 0.33	10	6.31
10	10.72 ± 0.56	3	5.22	10.50 ± 0.54	10	5.14
20	20.27 ± 0.90	3	4.44	19.94 ± 1.31	10	6.57

ตารางที่ 8 ความแม่นยำของการวัดปริมาณพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยวิธีแก๊ส-โครมาโตกราฟี

ความเข้มข้นของพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	การทดลองเดียวกัน			ระหว่างการทดลอง		
	$\bar{X}$ + SD (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	n	%CV	$\bar{X} \pm SD$ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	n	%CV
5	5.14 ± 0.22	3	4.28	5.07 ± 0.32	10	6.31
10	9.54 ± 0.29	3	3.04	9.98 ± 0.58	10	5.81
20	20.62 ± 0.65	3	3.15	19.27 ± 1.39	10	7.21

ตารางที่ 9 ความถูกต้องของการวัดปริมาณแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

ความเข้มข้นของแอมเฟตามีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	แอมเฟตามีนที่เติม (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	แอมเฟตามีนที่วัดได้ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	n	% รีคอบเวอรี
5.32	5	10.72	3	103.9
	15	20.27	3	99.8

ตารางที่ 10 ความถูกต้องของการวัดปริมาณ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

ความเข้มข้นของพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	พาราไฮดรอกซี-แอมเฟตามีนที่เติม (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	พาไฮดรอกซี-แอมเฟตามีนที่วัดได้ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	n	% รีคอบเวอรี
5.14	5	9.53	3	94.0
	15	20.62	3	102.4

4.11 ผลการศึกษาความสามารถในการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของกรดอิพพิวริค

ผลการศึกษาความสามารถในการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของกรดอิพพิวริค กับอะซีติค แอนไฮไดรด์ พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ และไพริดีน ตามวิธีในข้อ 3.6.1 หน้า 22 แสดงไว้ในรูปที่ 8 ปรากฏว่า ความยาวคลื่นที่ให้ค่า Absorbance สูงสุด คือ 450 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอิพพิวริคต่อไป จึงใช้ความยาวคลื่น 450 นาโน-เมตร ในการอ่านค่า Absorbance ของสารประกอบเชิงซ้อนของกรดอิพพิวริค

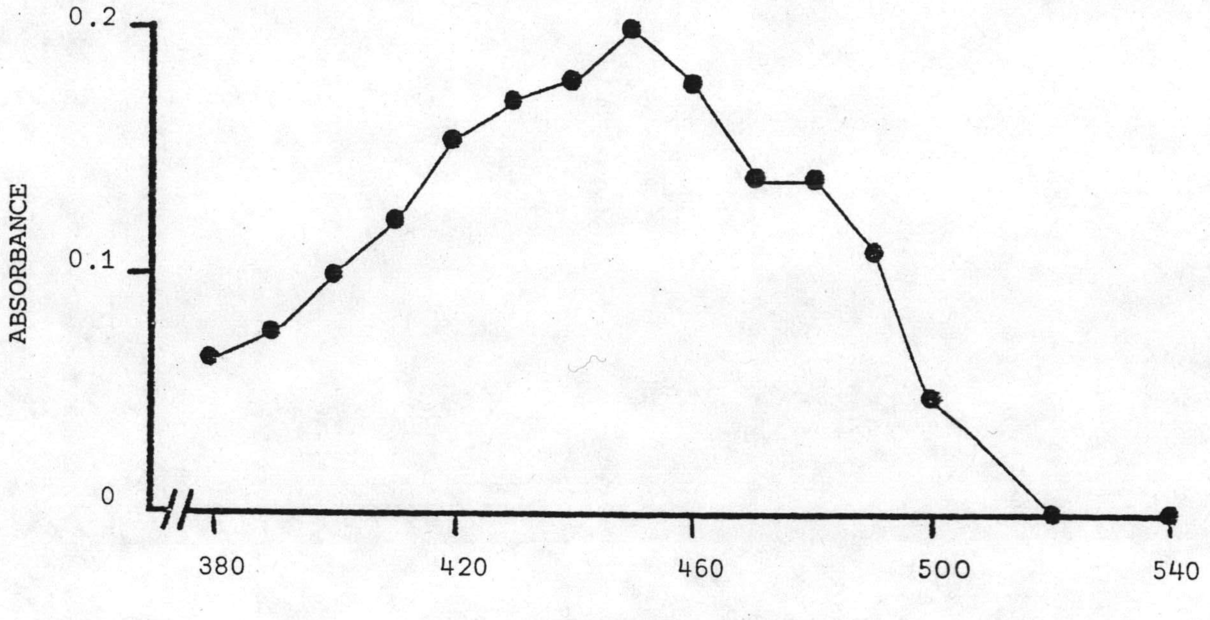
4.12 ผลการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ และเวลาต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของกรดอิพพิวริค

ผลการศึกษาเพื่อเลือกอุณหภูมิ และ เวลาที่เหมาะสมในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของกรดอิพพิวริค กับ อะซีติคแอนไฮไดรด์ พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ และไพริดีน ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) เปรียบเทียบกับ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาต่าง ๆ ตามวิธีในข้อ 3.6.2 หน้า 22 แสดงไว้ในรูปที่ 9 เห็นได้ว่า ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สารละลายมีค่า Absorbance สูงสุด เมื่อทำปฏิกิริยานาน 30 นาที และค่า Absorbance ลดลงเรื่อย ๆ เมื่อทำปฏิกิริยานานขึ้น ส่วนการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง สารละลายมีค่า Absorbance สูงสุด เมื่อทำปฏิกิริยา นาน 1 ชั่วโมง และคงที่เช่นนี้ประมาณ 30 นาที จึงค่อย ๆ ลดลง การวิเคราะห์ปริมาณกรดอิพพิวริคต่อไป จึงใช้กรดอิพพิวริคทำปฏิกิริยากับอะซีติคแอนไฮไดรด์ และ พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ 0.5 % ในไพริดีน ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง

4.13 กราฟมาตรฐานของกรดอิพพิวริค

จากการสร้างกราฟมาตรฐานของกรดอิพพิวริค ดังรายละเอียดในข้อ 3.6.5 หน้า 23 โดยวัด Absorbance ของสารละลายที่มีกรดอิพพิวริค 1 - 20 ไมโครกรัมต่อหลอดทดลอง ได้ผลดังแสดงไว้ในรูปที่ 10 กราฟนี้เป็นการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Absorbance ของสารละลายกับปริมาณกรดอิพพิวริค และใช้กราฟนี้เป็นมาตรฐานในการหาปริมาณกรดอิพพิวริค ในปัสสาวะของสุนัขที่ศึกษา

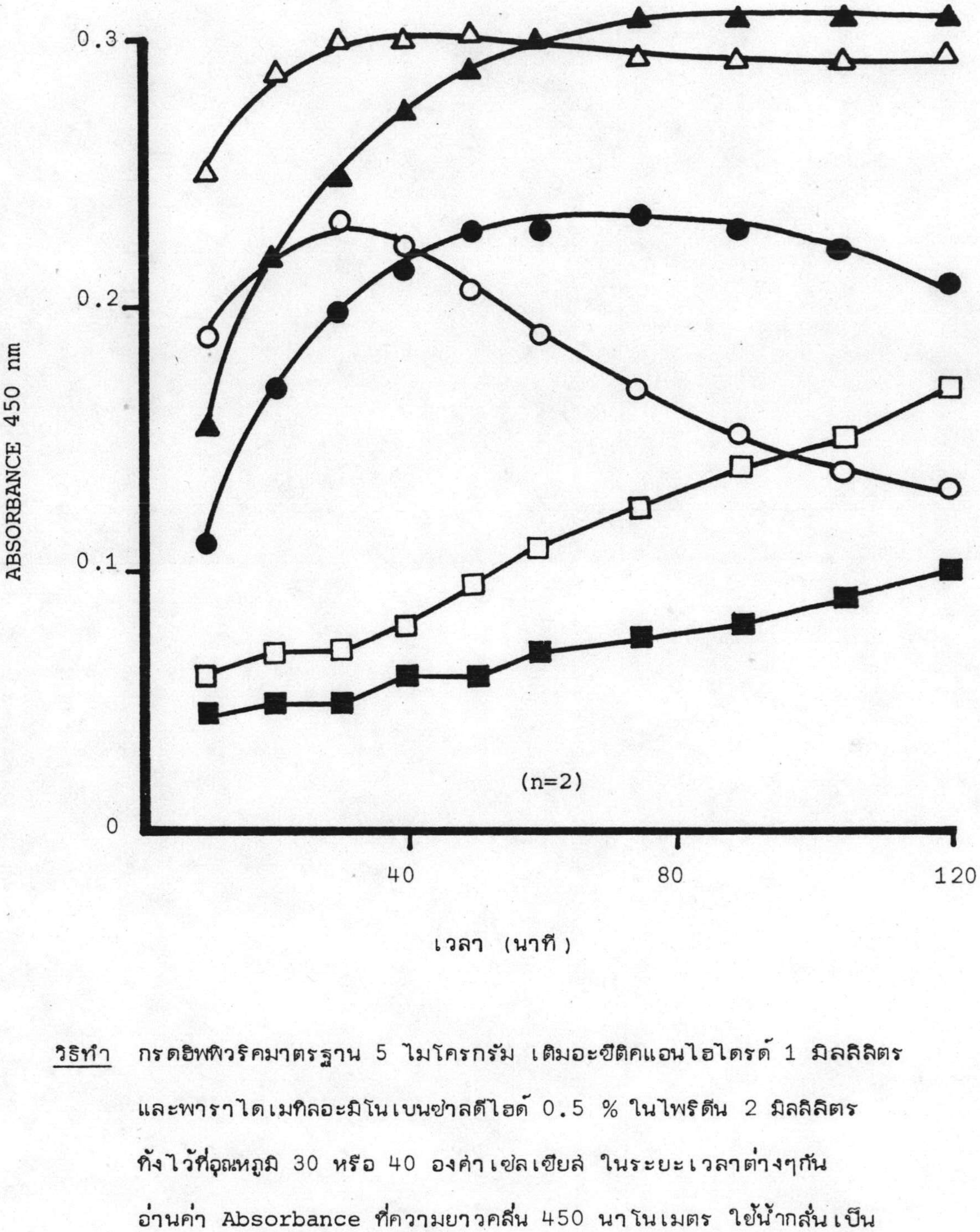
รูปที่ 8 การดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของกรดอิพพิวริค



วิธีทำ กรดอิพพิวริคมาตรฐาน 5ไมโครกรัม

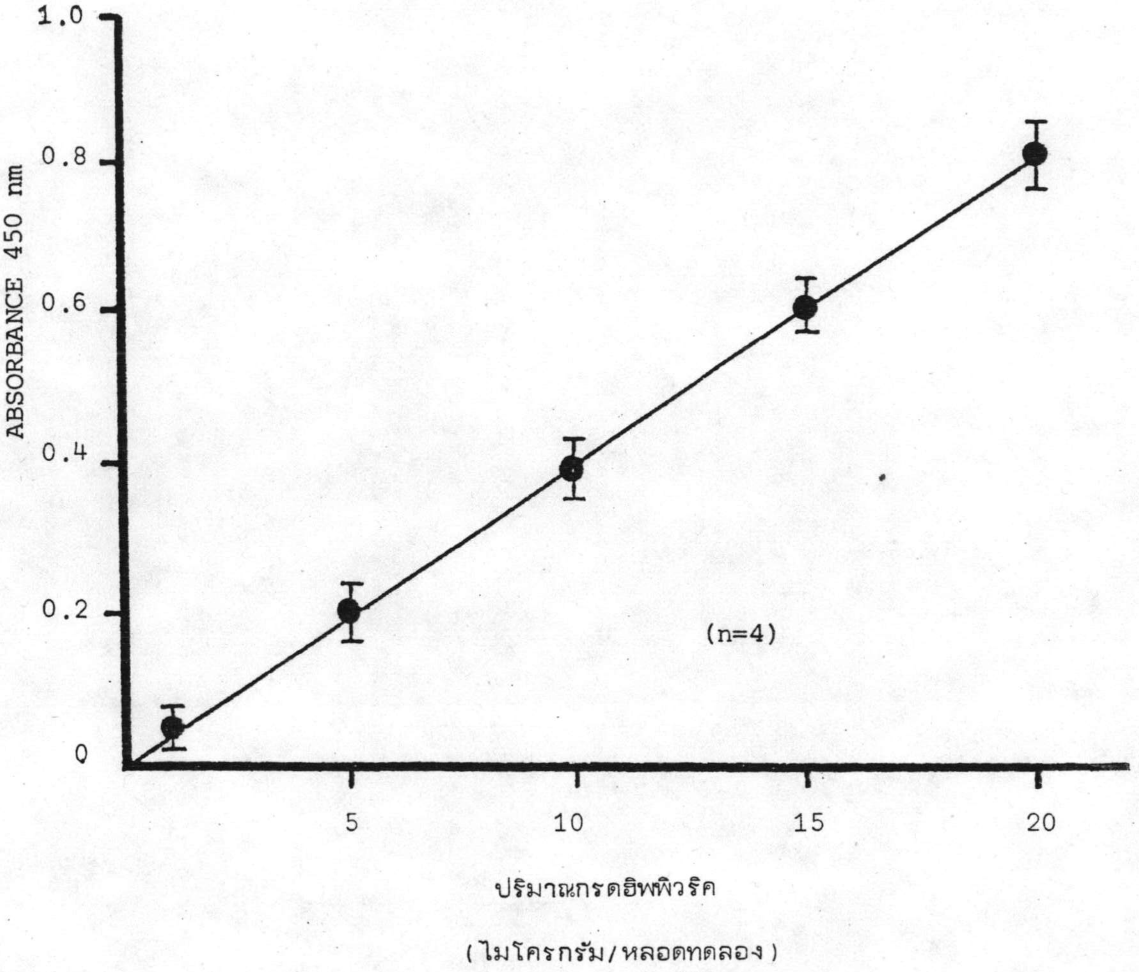
เติมอะซีติคแอนไฮไดรด์ 1 มิลลิลิตร และ พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ 0.5 % ในไพริดีน 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง อ่านค่า Absorbance ของสารละลายโดยใช้สารละลายอะซีติคแอนไฮไดรด์ พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์และไพริดีนเป็น blank

<u>รูปที่ 9</u> อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาต่อการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของกรดอิพพิวริค



<u>วิธีทำ</u> กรดอิพพิวริคมาตรฐาน 5 ไมโครกรัม เติมอะซีติคแอนไฮไดรด์ 1 มิลลิลิตร และพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ 0.5 % ในไพริดีน 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 หรือ 40 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาต่างๆกัน อ่านค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็น blank เปรียบเทียบกับสารละลายอะซีติคแอนไฮไดรด์ พาราไดเมทิล-อะมิโนเบนซาลดีไฮด์และไพริดีนที่ทำการทดลองในสภาวะเดียวกัน

รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานของกรดฮิพพิวริค



วิธีทำ กรดฮิพพิวริคมาตรฐาน 1-20 ไมโครกรัม

เติมอะซีติคแอนไฮไดรด์ 1 มิลลิลิตร และ พาราไดเมทิลอะมิโน-

เบนซาลดีไฮด์ 0.5% ในไพริดีน 2 มิลลิลิตร

ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

อ่านค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

ใช้สารละลายอะซีติคแอนไฮไดรด์ พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์

และไพริดีนเป็น blank

4.14 ผลการทดลอบความเชื่อถือได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดฮิพพิวริค

4.14.1 ความไว

จากการศึกษาความไวของวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดฮิพพิวริค ด้วยสเปคโตรโฟโตเมทรี ตามการทดลองในข้อ 3.6.6.1 หน้า 23 โดยทำการทดลองซ้ำกัน 5 ครั้ง ปรากฏว่า ความไวของการวัดปริมาณกรดฮิพพิวริค โดยวิธีนี้ เท่ากับ 1.07 ไมโครกรัมต่อหลอดทดลอง

4.14.2 ความแม่นยำ

จากตารางที่ 11 เห็นได้ว่า ความแม่นยำของการวิเคราะห์กรดฮิพพิวริค 5 , 10, และ 20 ไมโครกรัม ในการทดลองเดียวกัน มีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เป็น 4.24, 4.88 และ 3.93 ตามลำดับ ส่วนความแม่นยำในระหว่างการทดลอง มีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน เป็น 4.27, 5.18 และ 5.50 ตามลำดับ

4.14.3 ความถูกต้อง

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดฮิพพิวริคในปัสสาวะ แสดงด้วยเปอร์-เซ็นต์รีคอบเวอรี ดังตารางที่ 12 ได้ค่า เปอร์เซ็นต์รีคอบเวอรีของการวิเคราะห์กรดฮิพพิวริค อยู่ระหว่าง 101.4 - 116.7 %

4.14.4 ความจำเพาะ

เมื่อนำยูเรีย และกรดเบนโซอิค อย่างละ 50 และ 100 ไมโครกรัม ทำปฏิกิริยากับอะซีติคแอนไฮไดรด์ พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์และไพริดีน ตามการทดลองในข้อ 3.6.6.4 หน้า 24 ปรากฏว่า ยูเรีย และกรดเบนโซอิค ไม่ให้สีจากปฏิกิริยานี้ คือ มีค่า Absorbance เท่ากับ 0

4.15 กราฟมาตรฐานของครีเอตินีน

จากการสร้างกราฟมาตรฐานของครีเอตินีน ดังรายละเอียดในข้อ 3.7.1 หน้า 24 โดยวัด Absorbance ของสารละลายที่มีครีเอตินีน 20-80 ไมโครกรัมต่อหลอดทดลอง ได้ผลดังแสดงไว้ในรูปที่ 11 กราฟนี้เป็นการแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า Absorbance ของสารละลายกับปริมาณครีเอตินีน และใช้กราฟนี้เป็นมาตรฐานในการหาปริมาณครีเอตินีนในปัสสาวะของสุนัขที่ศึกษา

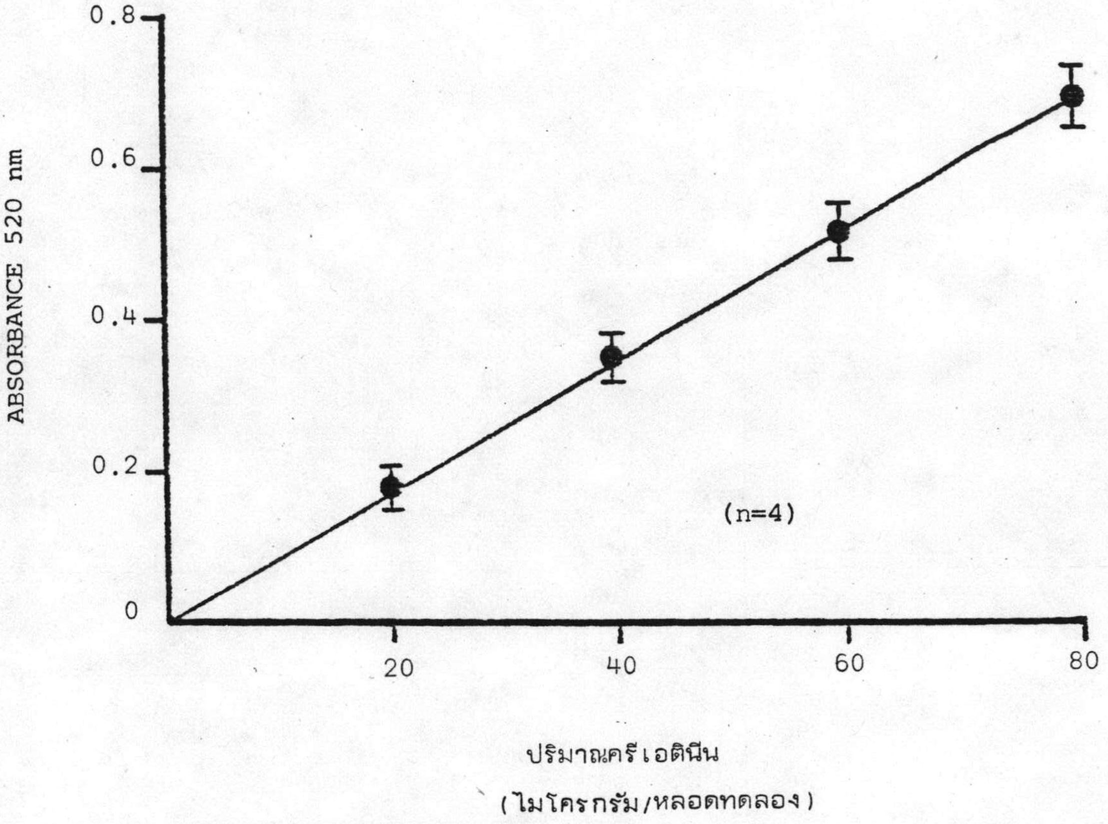
ตารางที่ 11 ความแม่นยำของการวัดปริมาณกรดอิพพิวริคด้วยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี

ปริมาณกรดอิพพิวริค (ไมโครกรัม)	การทดลองเดียวกัน			ระหว่างการทดลอง		
	$\bar{X} \pm SD$ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	n	% CV	$\bar{X} \pm SD$ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	n	% CV
5	1.65 ± 0.07	10	4.24	1.64 ± 0.07	10	4.27
10	3.69 ± 0.18	10	4.88	3.28 ± 0.17	10	5.18
20	7.13 ± 0.28	10	3.93	6.72 ± 0.37	10	5.50

ตารางที่ 12 ความถูกต้องของการวัดปริมาณกรดอิพพิวริคด้วยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรี

ปริมาณกรดอิพพิวริคที่เติม ในปัสสาวะ 0.1 มิลลิลิตร (ไมโครกรัม)	ปริมาณกรดอิพพิวริคที่วัดได้ ในปัสสาวะ 0.1 มิลลิลิตร (ไมโครกรัม)	n	% รีคอบเวอรี
-	52.5	2	-
10	63.4	2	101.4
50	112.5	2	109.8
100	178.0	2	116.7

<u>รูปที่ 11</u> กราฟมาตรฐานของครีเอตินีน



<u>วิธีทำ</u> สารละลายครีเอตินีนมาตรฐานในน้ำ(0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 20-80 ไมโครกรัม เติมสารละลายอัลคาไลน์พิเครท 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 4 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ 20 นาที อ่านค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ใช้สารละลายอัลคาไลน์พิเครทเป็น blank

4.16 ผลการศึกษาอิทธิพลของเอทานอลต่อเมตาบอลิสึมของแอมเฟตามีนในสุนัข

ศึกษาโดยวัดปริมาณแอมเฟตามีนในซีรัม แอมเฟตามีน พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน และกรดฮิพพิวริคในปัสสาวะของสุนัข เมื่อได้รับแอมเฟตามีนซัลเฟต เปรียบเทียบกับ เมื่อได้รับเอทานอล ก่อนฉีดแอมเฟตามีนซัลเฟต ตามรายละเอียดในข้อ 3.8 และ 3.9 หน้า 25 และ 26

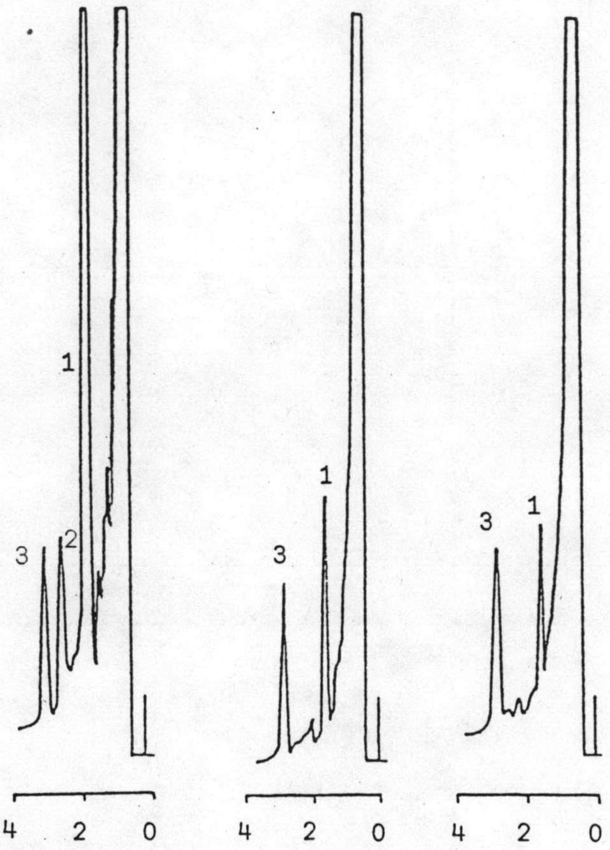
ผลการวิเคราะห์ซีรัม และปัสสาวะ สุนัข หลังจากได้รับแอมเฟตามีนซัลเฟต โดยการสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท เตรียมอนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามิด และวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี โดยใช้คอลัมน์ 3 % OV-17 ตามวิธีในข้อ 3.5.12 หน้า 21 ปรากฏว่าพบสารที่มี retention time ตรงกับ retention time ของแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน (รูปที่ 12) ส่วนการวิเคราะห์ซีรัมและปัสสาวะสุนัขก่อนได้รับแอมเฟตามีนซัลเฟตไม่พบสารใด ๆ (รูปที่ 13) แสดงว่ามีแอมเฟตามีน และ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในซีรัมและปัสสาวะของสุนัขที่นำมาศึกษา อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์ผู้วิจัยได้ใช้วิธีเตรียมอนุพันธ์ที่ต่างออกไปคือ อนุพันธ์เฮปตาฟลูโอโรบิวไทรามีด และวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ชนิดเดียวกัน คือ 3 % OV-17 และวิเคราะห์แบบไม่เตรียมอนุพันธ์ โดยใช้คอลัมน์ 10 % Apiezon L + 10 % KOH ตามรายละเอียดในข้อ 3.5.13 และ 3.5.14 หน้า 21 และพบสารที่มี retention time ตรงกับ retention time ของแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน ซึ่งได้แสดงค่า retention time ไว้ในตารางที่ 13

ผลการวัดปริมาณแอมเฟตามีนในซีรัมของ สุนัขช่วง 6 ชั่วโมง หลังจากได้รับแอมเฟตามีน และแอมเฟตามีน กับเอทานอล แสดงไว้ในรูปที่ 14 และผลการคำนวณค่าครึ่งชีวิตของแอมเฟตามีน แสดงไว้ในตารางที่ 14 ปรากฏว่าปริมาณแอมเฟตามีนในซีรัม เมื่อสุนัขได้รับเอทานอลร่วมด้วย สูงกว่าเมื่อได้รับแอมเฟตามีนอย่างเดียว และมีครึ่งชีวิตของแอมเฟตามีนยาวกว่า คือ ครึ่งชีวิตของแอมเฟตามีนในทั้งสองกรณี มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.7 และ 3.8 ชั่วโมง ตามลำดับ

ผลการวัดปริมาณแอมเฟตามีน และ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะสุนัขเมื่อได้รับแอมเฟตามีนอย่างเดียว เปรียบเทียบกับเมื่อได้รับแอมเฟตามีนกับเอทานอล แสดงไว้ในรูปที่ 15 จะเห็นได้ว่า เมื่อได้รับเอทานอลร่วมด้วย ระดับพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะช่วง 8 ชั่วโมงแรกของสุนัขลดลงจนตรวจไม่พบ (สุนัขตัวที่ 1 และ 4) หรือ พบในปริมาณที่ต่ำกว่า เมื่อได้รับแอมเฟตามีนอย่างเดียว (สุนัขตัวที่ 2) แต่เมื่อเก็บปัสสาวะต่อไปอีก

รูปที่ 12 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์อนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามิดของแอมเฟตามีน และพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะและซีรัมของสุนัข

ก. ปัสสาวะ ข. ปัสสาวะเจือจาง * ค. ซีรัม



นาที

วิธีทำ ปัสสาวะหรือซีรัม 1 มิลลิลิตร

เติมสารละลายไทรามีน (INTERNAL STANDARD)

สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทและเตรียมอนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามิด

วิเคราะห์อนุพันธ์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

คอลัมน์ 1500X 4 มิลลิเมตร 3% OV-17 บน Gas Chrom Q 100-120 mesh

ดีเทคเตอร์ FID

อุณหภูมิ อินเจคเตอร์ 250 องศาเซลเซียส

คอลัมน์ 175 องศาเซลเซียส

ดีเทคเตอร์ 250 องศาเซลเซียส

แก๊สตัวพา ไนโตรเจน อัตราเร็ว 40 มิลลิลิตรต่อนาที

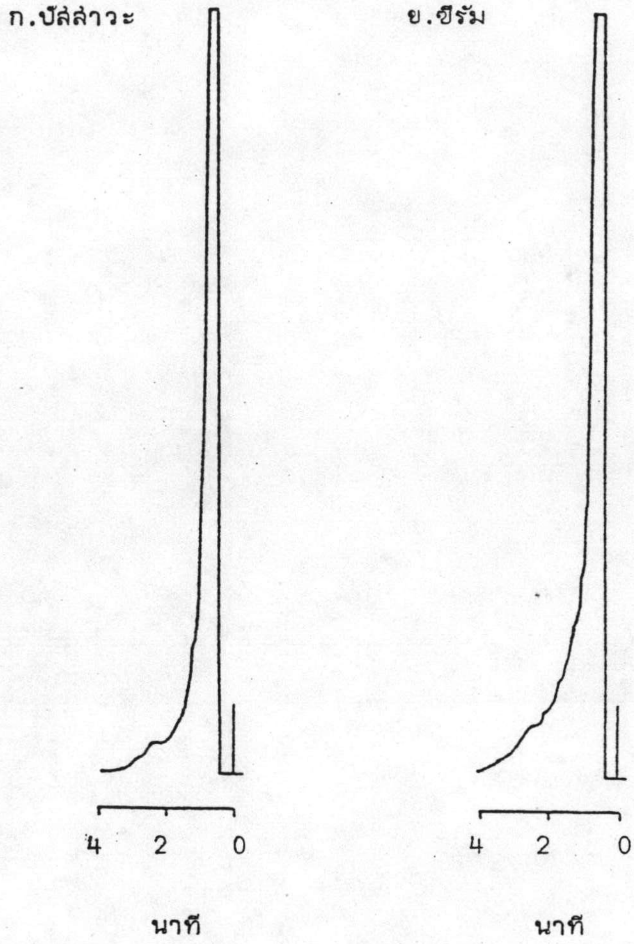
สารที่ตรวจพบ 1. แอมเฟตามีน

2. พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน

3. ไทรามีน

*การวิเคราะห์ปัสสาวะที่มีปริมาณแอมเฟตามีนสูงมาก ใช้วิธีนำปัสสาวะมาเจือจางด้วยปัสสาวะของสุนัขตัวนั้นก่อนได้รับแอมเฟตามีนซัลเฟตแล้วจึงวิเคราะห์หาปริมาณต่อไป

<u>รูปที่ 13</u> โครมาโตแกรมการวิเคราะห์ปัสสาวะและซีรัมของสุนัขก่อนได้รับแอมเฟตามีนซัลเฟต



<u>วิธีทำ</u> ปัสสาวะหรือซีรัม 1 มิลลิลิตร

สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทและเตรียมอนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามิด

วิเคราะห์อนุพันธ์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี

คอลัมน์	1500X 4 มิลลิเมตร 3% OV-17 บน Gas Chrom Q 100-120 mesh	
ดีเทคเตอร์	FID	
อุณหภูมิ	อินเจคเตอร์	250 องศาเซลเซียส
	คอลัมน์	175 องศาเซลเซียส
	ดีเทคเตอร์	250 องศาเซลเซียส
แก๊สตัวพา	ไนโตรเจน อัตราเร็ว 40 มิลลิลิตรต่อนาที	

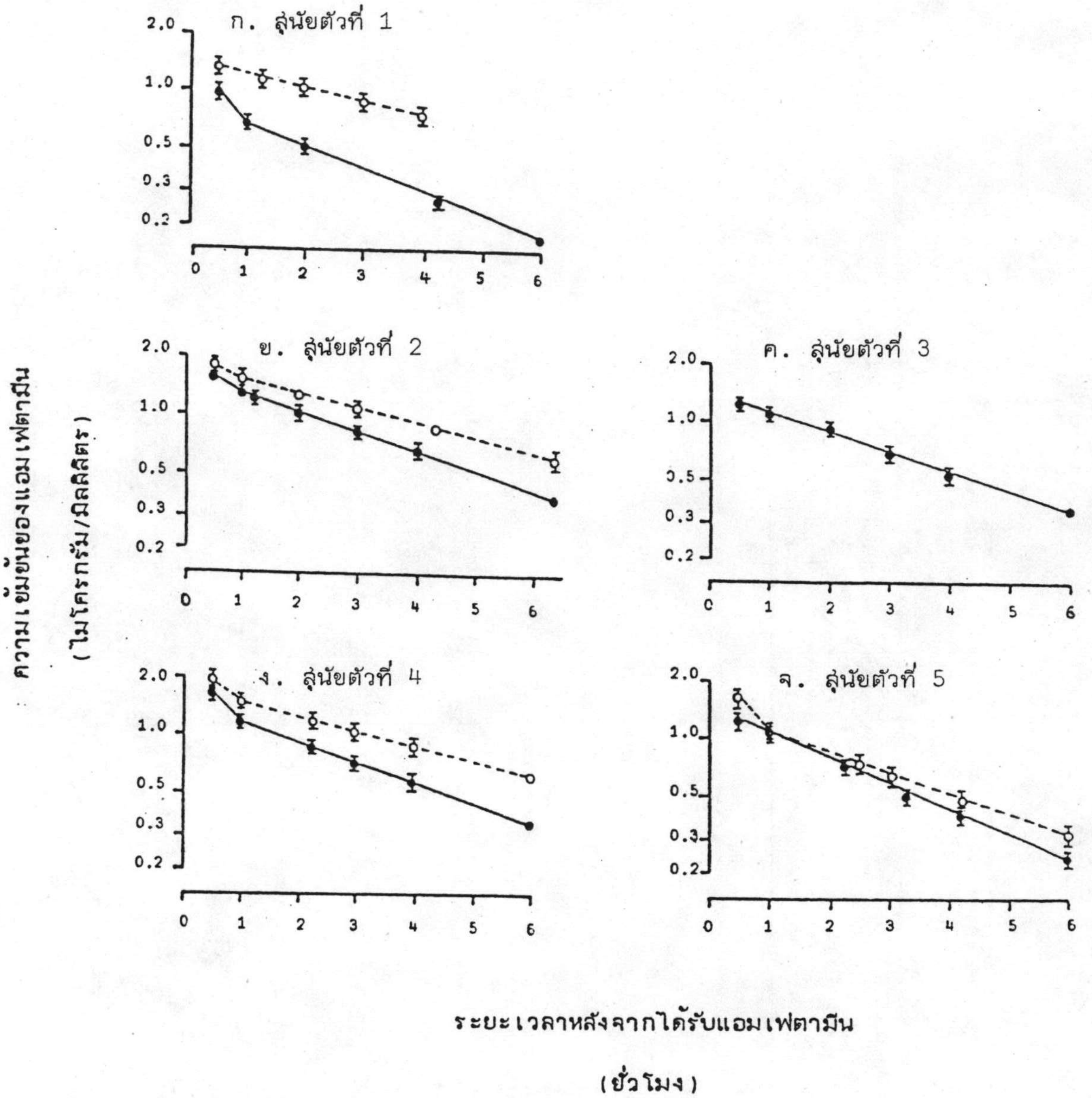
ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์แอมเฟตามีน และ พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะเชิงคุณภาพ

อนุพันธ์และคอลัมน์ที่ใช้	สารมาตรฐาน	retention time (นาที)
ไตรฟลูโอโรอะเซตามีด	แอมเฟตามีน	1.7
(3 % OV-17)	พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน	2.5
	ไทรามีน (internal standard)	3.0
เอปตาฟลูโอโรบิวไทรามีด	แอมเฟตามีน	1.4
(3 % OV-17)	พาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีน	2.0
	ไทรามีน (internal standard)	2.4
—	แอมเฟตามีน	2.7
(10 % Apiezon L + 10 % KOH)	เบนซีลอามีน (internal standard)	1.7

วิธีทำ ปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร

เติมสารละลายไทรามีน หรือ เบนซีลอามีน (internal standard) สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท และวิเคราะห์โดยเตรียมอนุพันธ์ กับ ไตรฟลูโอโรอะซีติคแอนไฮไดรด์ หรือ เอปตาฟลูโอโรบิวไทริคแอนไฮไดรด์ หรือวิเคราะห์ในรูปเบสอิสระ โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี และใช้สภาวะเช่นเดียวกับที่แสดงไว้ในรูปที่ 13 เปรียบเทียบค่า retention time กับ retention time ของสารมาตรฐาน

รูปที่ 14 ความเข้มข้นของแอมเฟตามีนในซีรัมสุนัข*



* สุนัขได้รับการฉีดแอมเฟตามีนซัลเฟต 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมทางช่องท้อง และ 1 เดือนต่อมา นำมาฉีด เอทานอล 1กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมทางช่องท้อง ก่อนฉีดแอมเฟตามีนซัลเฟต 15 นาที

วิเคราะห์ปริมาณแอมเฟตามีนด้วยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟีในรูปอนุพันธ์ไตรฟลูโอโรอะเซตามิด ดังรายละเอียดที่แสดงไว้ในรูปที่ 12

ยาที่สุนัขได้รับ ●——● แอมเฟตามีน

o---o แอมเฟตามีน + เอทานอล

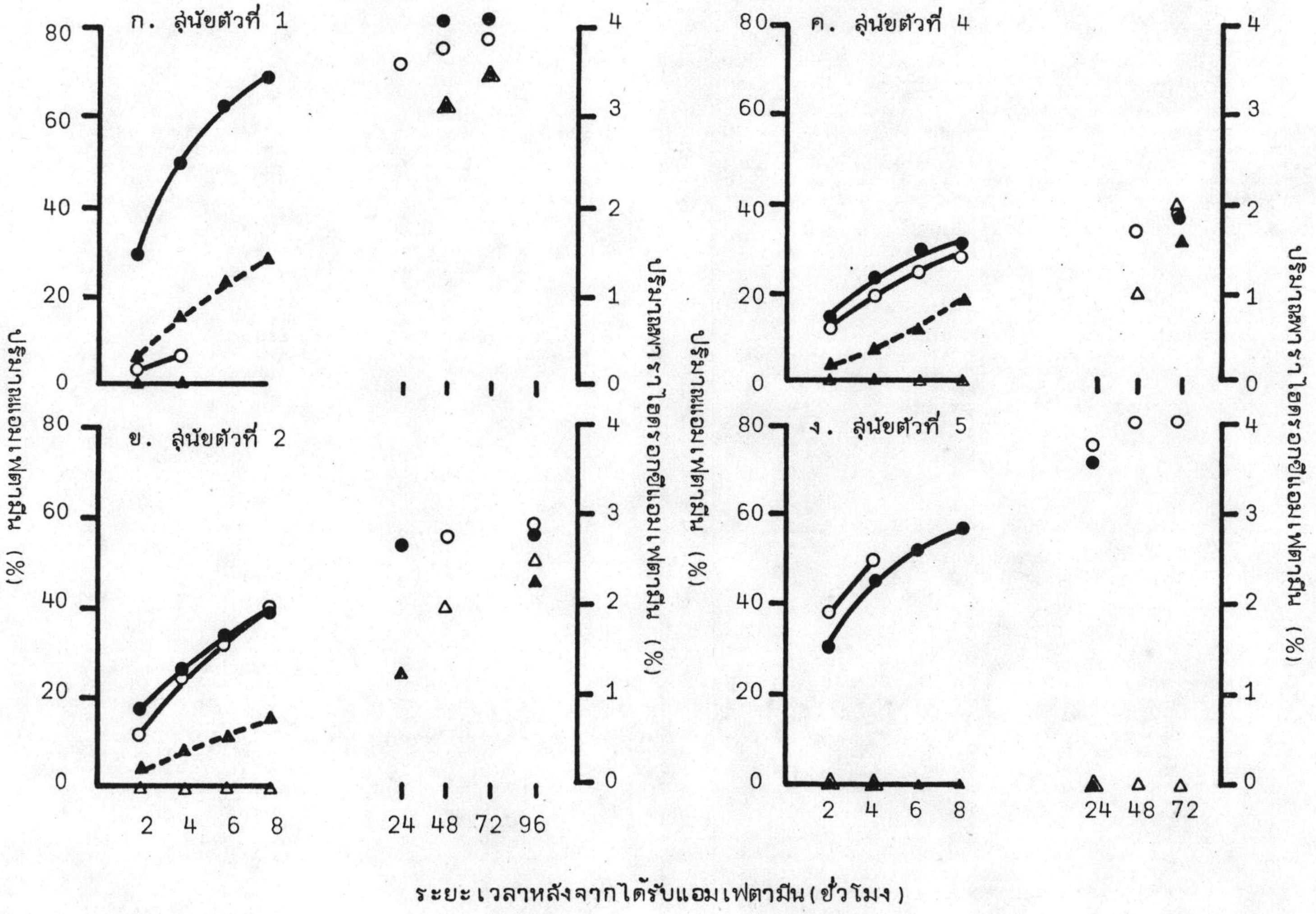
ตารางที่ 14 ครึ่งชีวิตของแอมเฟตามีนในซีรัม หลังจากได้รับแอมเฟตามีน และแอมเฟตามีนกับเอทานอล *

ลูหนูตัวที่	ครึ่งชีวิตของแอมเฟตามีนในซีรัม (ชั่วโมง)	
	แอมเฟตามีน	แอมเฟตามีน + เอทานอล
1	2.6	4.0
2	3.0	4.3
3	2.9	-
4	2.9	4.2
5	2.2	2.8
$\bar{X} \pm S.D.$	2.7 ± 0.3	3.8 ± 0.7**

* รายละเอียดดังแสดงไว้ในรูปที่ 14

** การทดสอบทางสถิติใช้การทดสอบค่าทีแบบจับคู่ (pair t-test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % , $p < 0.05$

รูปที่ 15 ปริมาณแอมเฟตามีนและพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะสุนัขหลังจากได้รับแอมเฟตามีน และแอมเฟตามีนกับเอทานอล



1-4 วัน ปรากฏว่าปริมาณพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะทั้งสองกรณีไม่แตกต่างกัน ส่วนสุนัขตัวที่ 5 วิเคราะห์ไม่พบพาราไฮดรอกซีแอมเฟตามีนในปัสสาวะ ทั้งเมื่อได้รับแอมเฟตามีนและได้รับแอมเฟตามีนกับเอทานอล ผลการวิเคราะห์ปัสสาวะสุนัขตัวที่ 3 ไม่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 15 เนื่องจากสุนัขตายในระหว่างการศึกษาเมตาบอลิสม์ของแอมเฟตามีน จึงไม่มีผลแสดงอิทธิพลของเอทานอลต่อเมตาบอลิสม์ของแอมเฟตามีนในสุนัขตัวนี้

เมื่อพิจารณาระดับแอมเฟตามีนในปัสสาวะสุนัข เมื่อได้รับแอมเฟตามีน และแอมเฟตามีน กับเอทานอล (รูปที่ 15) จะเห็นว่าระดับแอมเฟตามีนไม่แตกต่างกัน ยกเว้นสุนัขตัวที่ 1 ที่ระดับแอมเฟตามีนในปัสสาวะช่วง 4 ชั่วโมง ในกรณีที่ได้รับเอทานอล ลดลงประมาณ 10 เท่า แต่เมื่อเก็บปัสสาวะต่อไปอีก 3 วัน ปรากฏว่าปริมาณแอมเฟตามีนที่ขับถ่ายออกมาทั้งหมด เมื่อได้รับแอมเฟตามีน และ แอมเฟตามีนกับเอทานอลไม่แตกต่างกัน

ผลการเปรียบเทียบ pH ของปัสสาวะช่วง 4 และ 8 ชั่วโมง จากสุนัขที่ได้รับแอมเฟตามีนอย่างเดียว และได้รับแอมเฟตามีนกับเอทานอล ปรากฏว่าไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 15)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดฮิพพิวริคในปัสสาวะ สุนัข โดยคำนวณเป็นสัดส่วนของกรดฮิพพิวริค ต่อ ครีเอตินีน ในปัสสาวะ เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนกรดฮิพพิวริค ในปัสสาวะสุนัขหลังจากได้รับแอมเฟตามีน และแอมเฟตามีนกับเอทานอล ปรากฏว่า ปัสสาวะช่วง 4 และ 8 ชั่วโมงจากสุนัขที่ได้รับแอมเฟตามีนอย่างเดียว มีสัดส่วนของกรดฮิพพิวริคต่อครีเอตินีนสูงกว่า (ตารางที่ 16) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปัสสาวะก่อนและหลังได้รับยาของทั้งสองกรณี ปรากฏว่าสัดส่วนของกรดฮิพพิวริค ต่อครีเอตินีน ในปัสสาวะก่อนและหลังได้รับแอมเฟตามีน หรือแอมเฟตามีนกับเอทานอลไม่แตกต่างกัน

ตารางที่15 pH และปริมาตรของปัสสาวะสุนัขช่วง 4 และ 8 ชั่วโมง หลังจากได้รับแอมเฟตามีน และแอมเฟตามีนกับเอทานอล *

สุนัขตัวที่	แอมเฟตามีน				แอมเฟตามีน + เอทานอล			
	pH		ปริมาตร (มิลลิลิตร)		pH		ปริมาตร (มิลลิลิตร)	
	4	8	4	8	4	8	4	8
	(ชั่วโมง)				(ชั่วโมง)			
1	5.9	6.0	67.0	170.0	6.7	-	28	-
2	6.0	6.1	54.0	130.0	5.9	6.0	66	106
3	6.0	5.9	49.0	74.5	-	-	-	-
4	6.6	6.8	64.0	147.0	7.1	6.9	42	75
5	5.6	5.9	61.0	94.0	6.1	-	45	-
$\bar{X} \pm$ S.D.	6.0 ± 0.4	6.1 ± 0.4	59.0 ± 7.4	123.1 ± 38.8	6.4 ± 0.6	6.4 ± 0.6	45.2 ± 15.7	90.5 ± 21.9

* รายละเอียดดังแสดงไว้ในรูปที่ 14

ตารางที่ 16 สัดส่วนของกรดฮิพพิวริคต่อครีเอตินีนในปัสสาวะ สุนัขในระยะเวลาต่าง ๆ หลังจากได้รับแอมเฟตามีน และแอมเฟตามีนกับเอทานอล *

สุนัขตัวที่	กรดฮิพพิวริคต่อครีเอตินีน (มิลลิกรัม/มิลลิกรัม)							
	แอมเฟตามีน				แอมเฟตามีน + เอทานอล			
	0	4	8	24-96	0	4	8	24-96
	(ชั่วโมง)				(ชั่วโมง)			
1	0.062	0.057	0.052	0.094	0.025	0.028	-	0.050
2	0.050	0.068	0.065	0.048	0.056	0.053	0.052	0.059
4	0.113	0.066	0.059	0.119	0.040	0.047	0.049	0.031
5	0.088	0.071	0.072	0.106	0.057	0.027	-	0.044
$\bar{X} \pm$ S.D.	0.078 ± 0.028	0.066 ± 0.006	0.062 ± 0.008	0.092 ± 0.031	0.040 ± 0.020	0.039 ± 0.013	0.050 ± 0.002	0.041 ± 0.012

* รายละเอียดดังแสดงไว้ในรูปที่ 14