บทที่ 2

วิธีวิเคราะห์สารต้องห้ามที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

การตรวจสอบสารต้องห้ามในปัจจุบันใช้วิธีการของ IOC (International Olympic Committee Medical Commission) ซึ่งใช้เทคนิค GC/MS เป็นหลัก โดยเฉพาะในขั้นตอนการตรวจยืนยัน (Confirmation) เนื่องจากเทคนิค GC/MS มีความเชื่อถือได้สูง เพราะได้ข้อมูลทั้ง retention time และ แมสสเปกตรัม มาใช้ประกอบการพิจารณา

วิธีวิเคราะห์สารต้องห้ามของ IOC มี 6 วิธีดังนี้

วิธีที่ 1

วิธีการตรวจหาสารต้องห้ามประเภทสารกระตุ้นและยาแก้ปวดที่มีฤทธิ์เสพติดมักใช้วิธี แกสโครมาโทกราฟี (GC) วิธีที่ 1 นี้ใช้ในการตรวจหาสารต้องห้ามที่สามารถระเหยได้ง่ายโดยไม่เกิดการสลายตัวจำพวก สารกระตุ้น และ ยาแก้ปวดที่มีฤทธิ์เสพติดที่ไม่ได้คอนจูเกตกับสารอื่น โดยมีหลักการ คือ ใช้เครื่องแกสโครมาโทกราฟีและใช้คอลัมน์ fused silica capillary column ที่มี stationary phase เป็น cross-linked silicone และใช้ nitrogen specific detector สำหรับบันทึกสัญญาณที่ออกมา เตรียมตัวอย่างโดย นำปัสสาวะมาสกัดด้วยด่างแก่และ Diethylether ใช้ N,N-diisopropyl-1-amino-n-dodecane (DIPA-12) เป็น internal standard ซึ่งมีประโยชน์สำหรับตรวจสอบความผิดพลาดในเชิงปริมาณที่อาจจะเกิดขึ้นได้ในขั้นตอนการสกัดปัสสาวะ และ ช่วยในการคำนวณ relative retension time ของสารที่ต้องการ

เมื่อสันนิษฐานว่าพบสารประกอบที่มี active hydrogen(s) จะนำสารที่สกัดออกมาจากปัสสาวะมาเตรียมให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์โดยเลือกอนุพันธ์ที่เหมาะสม แล้ววิเคราะห์ทั้งสารประกอบเริ่มต้นและอนุพันธ์ของมันโดย GC/MS

ในกรณีที่สันนิษฐานว่าตัวอย่างนั้นมีสารต้องห้ามจะทำการตรวจยืนยันโดยเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์โดย GC และ GC/MS จากทั้งสารมาตรฐานและสารที่สกัดได้จากปัสสาวะที่มีสารต้องห้ามซึ่งทราบแน่นอนแล้ว

สารต้องห้ามที่ตรวจโดยใช้วิธีที่ 1

A. Stimulants

Amfepramone (Diethylpropion)

Amphetaminil

Amiphenazole

Amphetamine

Benzphetamine

Caffeine

Cathine (Norpseudoephedrine)

Chlorphentermine

Clorprenaline

Clobenzorex

Cropropamide

Crotethamide

Dimethamphetamine

Ephedrine

Etafedrine

Etylamphetamine

Fencamfamine

Fenetylline

Fenproporex

Furfenorex

Mefenorex

Methoxyphenamine

Methamphetamine

Methylephedrine

Methylphenidate

Morazone

Nikethamide

Pentetrazol (cardiazole)

Phendimetrazine

Phenmetrazine

Phentermine

Phenylpropanolamine (norephedrine)

Pipradol

Prolintane

Propylhexedrine

Strychnine

B. **Narcotic Analgesics**

Alpha-prodine

Dextromoramide

Dextropropoxyphene

Dipipanone

Ethoheptazine

Methadone

Pethidine (meperidine)

C. **β-blockers**

Acebutolol

Atenolol

อุปกรณ์ และ สารเคมี

อุปกรณ์

- Vacuum rotary evaporator (Büchi, Swit.)
- Shaker (Büchler, F.R.G.)
- Centrifuge (Heraeus, F.R.G.)

สารเคมี

- 5N Potassium hydroxide
- Distilled diethylether : กลั่นจาก CaH_2 เก็บไว้ในขวดแก้วและเก็บในตู้เย็น4°ซ

- Methanolic solution of DIPA-12: 0.1 % W/V
- Anhydrous sodium sulfate : อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 300° ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

วิธีการวิเคราะห์

นำปัสสาวะ 5 มล. ใส่ในหลอดสำหรับปั่น เติม 5 N potassium hydroxide 0.5 มล. และ methanolic solution ของ N,N-diisopropyl-1-amino-n-dodecane(DIPA-12) 0.1 % W/V. 25 ไมโครลิตร เติม diethylether ที่กลั่นแล้ว 2 มล. และ anhydrous sodium sulfate 3 กรัม ปิดปากหลอดด้วยจุกแล้วใช้มือเขย่า เพื่อให้แน่ใจว่า anhydrous sodium sulfate กระจายทั่วสารละลาย แล้วจึงนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 20 นาที ใน Büchler shaker หลังจากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง Heraeus centrifuge ด้วยความเร็ว 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ (organic layer) 2 มล. ใส่ใน chromatographic vial สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีแกสโครมาโทกราฟีแล้วจึงนำไปทำการวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีโครมาโตกราฟี สำหรับปัสสาวะที่ใช้เป็นการทดสอบไร้สิ่งตัวอย่าง (Blank) นำมาทำการวิเคราะห์ด้วยขั้นตอนเช่นเดียวกันโดยใช้ ปัสสาวะที่ปราศจากสารต้องห้าม 5 มล. สำหรับวิธีการวิเคราะห์ได้แสดงไว้ในภาพที่ 1

ภาพที่ 1 ขั้นตอนการวิเคราะห์วิธีที่ 1

การตรวจยืนยัน (Confirmation)

นำสิ่งตัวอย่างที่คาดว่าจะมีสารต้องห้ามจากการตรวจวิเคราะห์ขั้นต้นแล้วนำมาทำการสกัดอีกครั้งโดยไม่ใส่ internal standard ด้วยวิธีการอย่างเดียวกันที่ได้กล่าวถึงข้างต้น นำปัสสาวะที่ผ่านการสกัดอีกครั้งมาวิเคราะห์ด้วย GC/MS นำ mass spectra จาก chromatographic peak มาเปรียบเทียบกับ mass spectra ของปัสสาวะที่ทราบว่ามีสารต้องห้ามชนิดนั้น การเปรียบเทียบขั้นนี้เป็นการเปรียบเทียบขั้นสุดท้ายที่จะใช้ยืนยันว่ามีสารต้องห้ามจากการตรวจวิเคราะห์ขั้นต้นจริง

การวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตรกราฟี

เครื่องมือที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์

- HP 5890A Gas Chromatograph (GC)
- HP 7673A Autosampler
- HP 33392A Integrator

สภาวะที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟี

- Column : HP fused silica capillary, cross-linked 5% phenyl methyl silicone(SE-54); length 17 m, internal diameter 0.2 mm, film thickness 0.33 μm
- Detector temperature : 300°ซ
- Injector temperature : 280°ซ
- Carrier gas : ฮีเลียม อัตราการไหล 1.5 มล./นาที
- Auxiliary gas : ฮีเลียม อัตราการไหล 30 มล./นาที.
- ไฮโดรเจน : 3 มล./นาที.
- อากาศ : 70 มล./นาที.
- Split ratio : 1/10
- Temperature program:
- Initial temperature : 100° ซ
- Initial time : 0 นาที.
- Rate : 20° ซ/นาที.
- Final time : 4 นาที.
- Final temperature : 300° ซ
- Total run time : 15 นาที

วิธีที่ 2

วิธีนี้ใช้สำหรับตรวจหาสารที่ระเหยได้ง่ายและมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น ยาแก้ปวดที่มีฤทธิ์เสพติด (Narcotic analgesics) และ สารกระตุ้นบางตัวที่ขับออกมาทางปัสสาวะในรูปของ Conjugated และ unconjugated นำมา hydrolyzed แล้วเตรียมให้เป็นอนุพันธ์เพื่อการตรวจหาโดยวิธี โครมาโตรกราฟี

การเตรียมตัวอย่างอาศัยการ hydrolysis ปัสสาวะด้วยกรดแล้วล้างด้วย diethylether หลังจากทำให้ส่วนน้ำที่เป็นกรดเปลี่ยนเป็นด่างอ่อนแล้วนำมาสกัดอีกครั้งด้วย diethylether ส่วนอีเธอร์ที่ได้จากการสกัดจะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นสำหรับเตรียมให้เป็นอนุพันธ์ที่ได้เลือกไว้และวิเคราะห์ด้วยวิธี chromatographic/mass spectrometric ยาเหล่านี้ตรวจขั้นต้นโดย GC/MS ในโหมด extracted ion monitoring (EIM)

β-blocker ก็สามารถที่จะวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ได้เนื่องจาก โครงสร้างทางเคมี และคุณสมบัติทาง physico-chemical ของสารกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกับยาที่วิเคราะห์โดยวิธีนี้ ดังนั้นการวิเคราะห์ยาปิดกั้นบีตาต้องอาศัยการเตรียมสารที่สกัดจากปัสสาวะให้เป็นอนุพันธ์ด้วย

การตรวจขั้นต้นของยากลุ่มนี้ได้ปรับปรุงให้ดีขึ้นและเพิ่มความจำเพาะโดยการใช้ GC/MS ในโหมด selected ion monitoring (SIM)

ในกรณีที่สันนิษฐานว่าตัวอย่างนั้นมีสารต้องห้ามจะยืนยันโดยการเปรียบเทียบ chromatographic pattern และ spectral data จากปัสสาวะที่มีสารต้องห้ามที่ทราบแน่นอน

<u>สารต้องห้ามที่ตรวจโดยวิธีที่ 2</u>

A. <u>Stimulants</u>

Cocaine

Ethamivan

B. <u>Narcotic Analgesics</u>

Anileridine

Buprenorphine

Codeine

Dihydrocodeine

Ethylmorphine

Heroin

Levorphanol

Methadone

Morphine

Nalbuphine

Pentazocine

Phenazocine

C. β-blockers

Acebutolol

Alprenolol

Labetalol

Metoprolol

Nadolol

Oxprenolol

Propranolol

Sotalol

อุปกรณ์ และ สารเคมี

อุปกรณ์

- Vacuum rotary evaporator (Büchi, Swit.)
- Shaker (Büchler, F.R.G.)
- Heating block (Liebisch, F.R.G.)
- Centrifuge (Heraeus, F.R.G.)

สารเคมี

- 6 N Hydrochloric acid
- L - Cysteine (Merck, F.R.G.)
- Anhydrous sodium sulfate : ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 300 °ซ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
- สารละลาย Borate buffer : ใช้ Boric acid 83.3 g ละลายใน สารละลาย 10 N. potassium hydroxide 500 มล.
- สารละลาย Methyl orange-acetonitrile/trifluoroacetic acid : 200 ppm สารละลาย methyl orange ในของผสมระหว่าง acetonitrile-trifluoroacetic acid (60:40 V/V)
- Distilled ether
- Acetonitrile (Merck, F.R.G.)
- Distilled methanol : กลั่นที่ 64°ซ
- MSTFA : N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (Sigma, U.S.A.)
- MBTFA : N-methyl-bis-trifluoroacetamide (Sigma, U.S.A.)
- TMS-Cl : trimethylchlorosilane(Sigma, U.S.A.)
- TFA-OH : trifluoroacetic acid (Sigma, U.S.A.)

<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

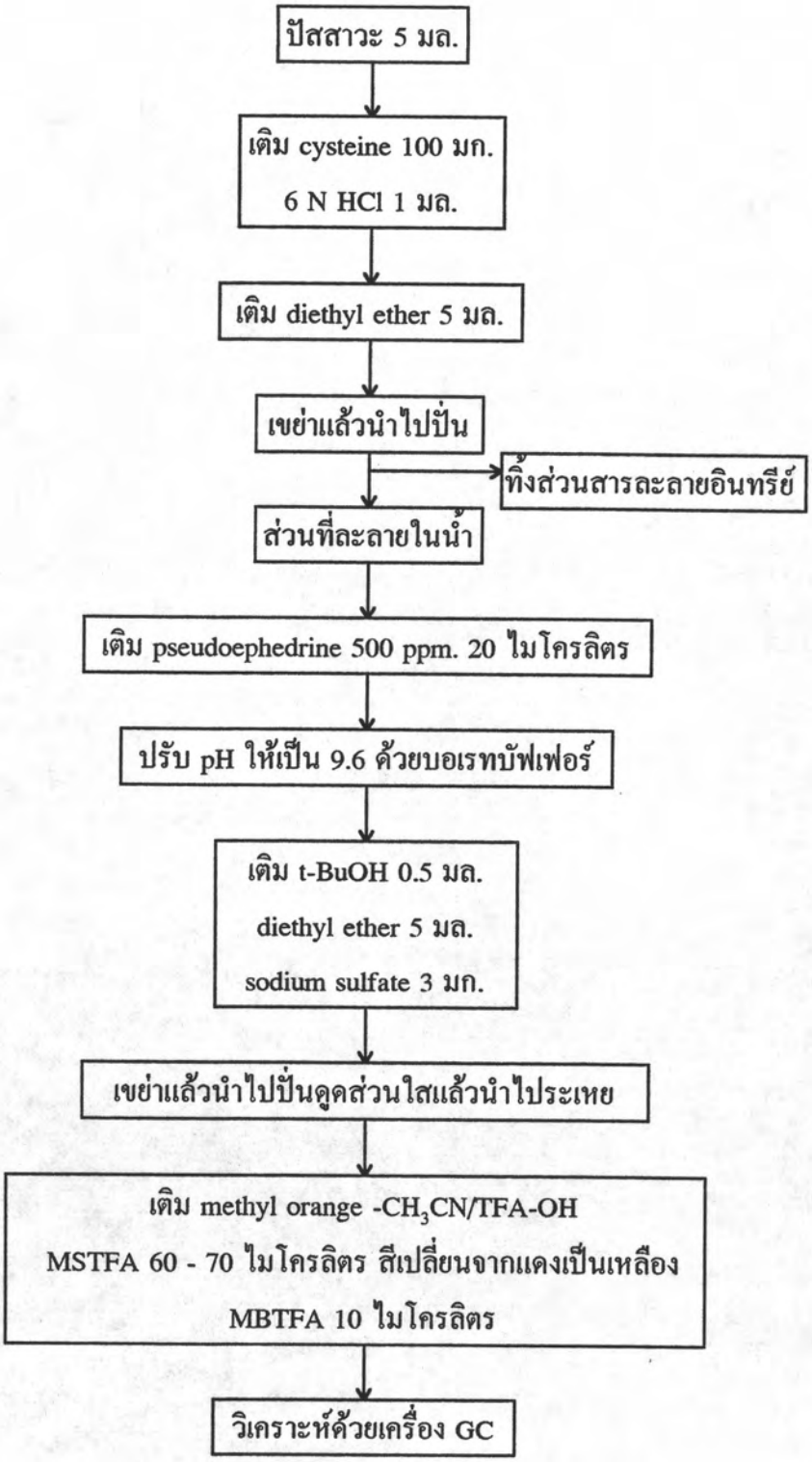
การสกัด

นำปัสสาวะ 5 มล. มาใส่ในหลอดสำหรับปั่น เติม 6 N hydrochloric acid 1 มล. และเติม L-cysteine ประมาณ 100 มก. เขย่าเบาๆ เพื่อ homoginize และให้ความร้อนแก่หลอดด้วย Liebisch block-heater ที่อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้จนเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วเติม diethylether ที่กลั่นแล้ว 5 มล. เขย่าด้วยเครื่อง Büchler shaker เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง Haeraus centrifuge ที่ความเร็ว 2500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดชั้นของอีเธอร์ทิ้ง ปรับ pH ส่วนที่เป็นน้ำให้เป็น 9.6 ด้วย สารละลาย บอเรทบัฟเฟอร์ จากนั้นเติม tert-butanol 0.5 มล. และ diethylether ที่กลั่นแล้ว 5 มล. และ anhydrous sodium sulfate 3 กรัม ปิดปากหลอดด้วยจุก เขย่าด้วยเครื่อง Büchler shaker เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง Haeraus centrifuge ที่ความเร็ว 2500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดชั้นของอีเธอร์ไปยังหลอดอื่น แล้วหยด trimethylchlorosilane (TMS-Cl) เขย่าเบา ๆ แล้วระเหยให้

แห้งโดยใช้ vacuum rotary evaporator ในขณะที่รักษาอุณหภูมิไม่ให้สูงเกิน 40 °ซ โดยแช่ใน water bath ทำเช่นเดียวกันนี้กับปัสสาวะที่ไม่มีสารต้องห้าม 5 มล.

การเตรียมอนุพันธ์

ละลาย residue ที่ได้จากการสกัดด้วย acetonitrile-trifluoroacetic acid (60:40 V/V) ซึ่งมีส่วนประกอบของ methyl orange 200 ppm. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยด N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) จนกระทั่งสีเปลี่ยนจากแดงเป็นเหลือง ให้ความร้อนแก่หลอดโดย Liebisch block-heater เป็นเวลา 5 นาที จนมีอุณหภูมิ 80 °ซ เติม N-methyl-bis-trifluoroacetamide (MBTFA) แล้วให้ความร้อนอีกครั้งให้มีอุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 10 นาที หลังการเกิดปฏิกิริยาสีของ indicator จะเปลี่ยนกลับเป็นสีแดง หยด MSTFA จนกระทั่งได้สีเหลืองที่ถาวรและเป็น silylation state นำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ต่อด้วย GC/MSD ขั้นตอนในการสกัดและเตรียมอนุพันธ์ทั้งหมดได้แสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการวิเคราะห์วิธีที่ 2

การตรวจยืนยัน (Confirmation)

นำสิ่งตัวอย่างที่คาดว่าจะมีสารต้องห้ามจากการตรวจวิเคราะห์ขั้นต้นแล้ว นำมาทำการสกัดอีกครั้งโดยไม่ใส่ internal standard ด้วยวิธีการอย่างเดียวกันที่ได้กล่าวถึงข้างต้น นำปัสสาวะที่ผ่านการสกัดอีกครั้งมาวิเคราะห์ด้วย GC/MS นำ mass spectra จาก chromatographic peak มาเปรียบเทียบกับ mass spectra ของปัสสาวะที่ทราบว่ามีสารต้องห้ามชนิดนั้น การเปรียบเทียบขั้นนี้เป็นการเปรียบเทียบขั้นสุดท้ายที่จะใช้ยืนยันว่ามีสารต้องห้ามจากการตรวจวิเคราะห์ขั้นต้นจริง

การวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตรกราฟี

เครื่องมือที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์

- HP 5890A Gas Chromatograph (GC)
- HP 5970B Mass Selective Detector MSD)
- HP 59970C MS ChemStation
- HP 7946 Disc Drive
- HP 2934A Dot Matrix Printer

สภาวะที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟี

- Column : HP fused silica capillary, cross-linked methyl silicone (SE- 30); length 17 m, internal diameter 0.2 mm, film thickness 0.33 μm
- Injector temperature : 280 °ซ
- Transfer line temperature : 280 °ซ
- Split ratio : 1/10
- Carrier gas : ฮีเลียม : อัตราการไหล 0.89 มล./นาที
- Temperature program:
- Initial temperature : 160 °ซ
- Initial time : 0 นาที.
- Rate : 20 °ซ/นาที.
- Final temperature : 300 °ซ
- Final time : 3 นาที.
- Total run time : 10 นาที

วิธีที่ 3

วิธีนี้ใช้สำหรับสารกระตุ้นที่ยากที่จะวิเคราะห์โดยวิธีที่ 1 และ วิธีที่ 2 เนื่องจากโครงสร้างทางเคมี หรือคุณสมบัติทาง physico-chemical ตัวอย่างเช่น caffeine และ pemoline วิธีการวิเคราะห์อาศัยหลักการของ solid-phase extraction และการวิเคราะห์โดย high-performance liquid chromatography การตรวจวัดใช้ diode-array detector และใช้ 7-ethyltheophyline เป็น internal standard

<u>อุปกรณ์ และ สารเคมี</u>

อุปกรณ์

- Sep-Pak cartridge rack (Waters, U.S.A.)
- Vacuum rotary evaporator (Büchi, Swit.)
- Sample clarification kit, organic (Waters, U.S.A.)

สารเคมี

- Sep-Pak C_{18} cartridge rack (Waters, U.S.A.)
- 7-Ethyltheophylline methanolic solution : 1000 ไมโครกรัม/มล.
- Diethylether : กลั่นจาก CaH_2 แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ
- Methanol : HPLC grade (Burdick & Jackson, U.S.A.)
- Acetonitrile : HPLC grade (Burdick & Jackson, U.S.A.)
- น้ำกลั่น : เตรียมโดยผ่านระบบ Milli-RO และระบบ Milli-Q
- สารละลาย, pH 6.7 - 6.8 : 0.01 M K_3PO_4 and 0.02 M KH_2PO_4 ในน้ำกลั่น

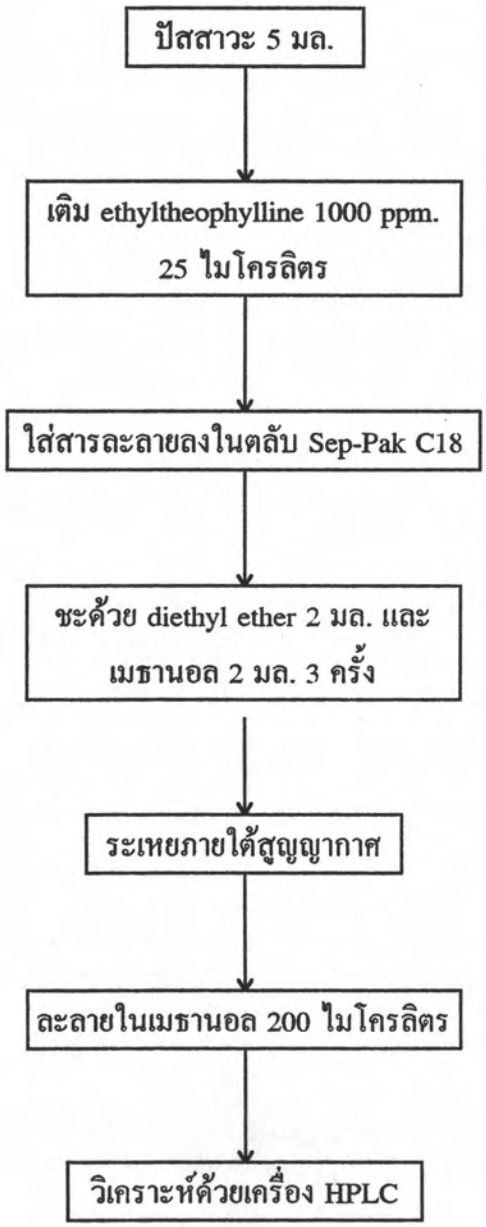
วิธีการวิเคราะห์

ล้างตลับ Sep-Pak C_{18} ด้วย เมธานอล และน้ำกลั่น ใส่ปัสสาวะ 5 มล. และ internal standard 25 ไมโครลิตร ลงในตลับ หลังจากที่ปัสสาวะถูกชะออกล้าง ด้วยน้ำกลั่นในปริมาตรเท่ากันและ n-hexane 1 มล. ชะส่วนที่จับติดกับคอลัมน์ซึ่งมีส่วนประกอบของยาด้วย diethylether 6 มล. และ เมธานอล 2 มล. ส่วนที่ได้จากการสกัดทั้งหมดจะถูกทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง vacuum rotary evaporator และ vacuum desiccator ที่มี P_2O_5 / KOH ประมาณ 10 นาที

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ละลายกาก (residue) ที่แห้งด้วยเมธานอล 200 ไมโครลิตร และกรองด้วย sample clarification kit ฉีดสารละลาย 5 ไมโครลิตร เข้าไปใน HPLC

สำหรับปัสสาวะ ที่ใช้เป็นแบลงค์ (Blank) นำมาทำการวิเคราะห์ด้วยขั้นตอนเช่นเดียวกันโดยใช้ ปัสสาวะที่ปราศจากสารต้องห้าม 5 มล. สำหรับวิธีการวิเคราะห์ได้แสดงไว้ในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการวิเคราะห์วิธีที่ 3

การวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตรกราฟี

เครื่องมือที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์

- HP 1090A High Performance Chromatograph
- DR 5 Solvent Delivery System
- HP 9000-300 Computer
- HP 9133 Disc Drive
- HP 7475 Plotter
- Think Jet Printer

สภาวะที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟี

- Column : Hypersil-ODS (100 x 4.6 mm ID, 5 μm particle)
- Oven temperature : 40°ซ
- Mobile phase : (A) phosphate buffer (B) acetonitrile

  gradient ; $96\%\ (A) \xrightarrow[4min.]{} 90\%\ (A) \xrightarrow[6min.]{} 60\%\ (A)$

  $\xrightarrow[3min.]{} 40\%(A) \xrightarrow[2min.]{} 40\%(A)$
- Flow rate : 1.0 มล./นาที.
- Detector : Diode-Array Detector(Signal, 220, 273 นาโนเมตร)

วิธีที่ 4

วิธีนี้ใช้สำหรับวิเคราะห์ว่ามีอะแนบอลิกสเตอรอยด์ในปัสสาวะหรือไม่ รูปแบบของการขับถ่ายของอะแนบอลิกสเตอรอยด์แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ free และ conjugated anabolic steroids

วิธีการนี้ประกอบด้วย การแยกขั้นต้นของสารที่ชอบไขมัน โดยคอลัมน์ Amberlite XAD-2 ตามด้วยการสกัด สเตอรอยด์อิสระที่ pH 7.0 ด้วย diethylether ในทำนองเดียวกัน ส่วนของ conjugated fraction จะถูกสกัดหลังจากการ hydrolysis ด้วยเอนไซม์ β-glucuronidase จาก Escherichia coli

สเตอรอยด์ที่สกัดออกมาจะถูกวิเคราะห์ด้วย GC/MSD ภายหลังการเตรียมให้เป็นอนุพันธ์ สารที่ใช้ในการเตรียมอนุพันธ์ของ free fraction คือ ส่วนผสมของ MSHFB/TMS-Cl/TMS-imidazole และ MBHFB เพื่อเพิ่มอนุพันธ์ของ O-TMS-N-HFB ส่วนสารที่ใช้สำหรับ conjugated fraction คือ ส่วนผสมของ MSTFA และ TMS-I ซึ่งสามารถทำให้ทั้ง free และ enolizable hydroxlyl group เป็นอนุพันธ์ของ trimethylsilyl ether

เนื่องจากอะแนบอลิกสเตอรอยด์ถูกขับออกมาในรูปของเมทาโบไลท์ของมัน ตัวยาเดิมยากที่จะตรวจพบในปัสสาวะ ยกเว้น oxandolone และ testosterone ดังนั้นการตรวจจึงอาศัย retention time และ characteristic ions ของอนุพันธ์ของเมทาโบไลท์ของสเตอรอยด์ Full mass spectra ได้มาจากการ scanning GC/MS ใช้สำหรับการพิสูจน์

อะแนบอลิกสเตอรอยด์ที่ตรวจได้โดยวิธีที่ 4

Free Fraction	Conjugated Fraction
Bolasterone	Bolasterone
Dehydrochlormethyltestosterone	Boldenone
Fluoxymesterone	Clostebol
Methandienone	Mesterolone
Oxandrolone	Methenolone
Stanozolol	Methyltestosterone
	Nandrolone
	Norethandrolone
	Oxymesterone
	Oxymetholone
	Testosterone

อุปกรณ์ และ สารเคมี

อุปกรณ์

- Vacuum rotary evaporator (Büchi, Swit.)
- Shaker (Büchler, F.R.G.)
- Heating block (Liebish, F.R.G.)
- Refrigerating circulator (Lauda, F.R.G.)
- Centrifuge (Heraeus, F.R.G.)

สารเคมี

- Amberlite XAD-2 resin, 100-200 micron (Serva, F.R.G.)
- Distilled methanol : นำ methanol 500 มล. ไปกลั่นที่อุณหภูมิ 64°ซ ทิ้ง 50 มล. แรกและเก็บ 300 มล. ถัดมา
- Phosphate buffer, pH=7.0 : ผสม 0.2 M K_2HSO_4 250 มล. กับ 0.02 M KH_2PO_4
- Distilled diethylether : กลั่นจาก CaH_2 เก็บในขวดแก้วในตู้เย็นที่ 4°ซ
- β -Glucuronidase จาก Escherichia coli (Sigma, U.S.A.)
- MSTFA : N-methyltrimethylsilyl trifluoroacetamide (Sigma, U.S.A.)
- TMS-I : Trimethyliodosilane (Sigma, U.S.A.)
- MSHFB : N-methyl-N-trimethylsilyl-heptafluorobutyramide (Macherey & Nagel, F.R.G.)
- MBHFB : N-methyl-bis-heptafluorobutyramide (Macherey & Nagel, F.R.G.)
- TMS-imidazole : N-trimethylsilyl imidazole (Sigma, U.S.A.)
- TMS-C1 : trimethylchlorosilane (Sigma, U.S.A.)

<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

การเตรียม XAD-2 Column

ใส่ลูกแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มม. ลงไปใน pasteur pipette เติม XAD-2 ที่ผ่านการล้างด้วย อะซิโตน, เมธานอล และ น้ำกลั่น จนกระทั่งมีความสูง 25 มม. ล้างครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น 2 มล. ก่อนที่จะใส่ปัสสาวะ

การแยก Steroids ออกจากปัสสาวะ

ใส่ปัสสาวะ 5 มล. ลงในคอลัมน์โดยใช้หลอดฉีดยา (2 มล. portions) และเติม stanozolol (2 ppm.) ซึ่งเป็น internal standard ลงไปพร้อมกันด้วย หลังจากนั้นทำการล้างคอลัมน์ XAD-2 ด้วยน้ำปริมาตรเท่ากัน ชะส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic) ซึ่งจับอยู่กับคอลัมน์จะประกอบด้วยทั้งส่วนที่เป็น free และ conjugated steroids ด้วยเมธานอลที่ผ่านการกลั่นแล้ว 2.5 มล. โดยแบ่งเป็นส่วนละ 0.9 มล. นำส่วนสกัดโดยเมธานอลมาทำให้แห้งด้วย vacuum rotary evaporator

การแยก Free fraction

ละลายส่วน residues อีกครั้งด้วย 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) 1 มล. และสกัดในอีเธอร์ 5 มล. หลังจากเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 5 นาทีและปั่น (2500 rpm, 5นาที) ถ่ายส่วนที่เป็นอีเธอร์ไปยังหลอดใหม่ แยกอีเธอร์ออกโดยใช้เครื่อง vacuum rotary evaporator และทำให้แห้งใน desiccator ที่มี P_2O_5 /KOH อย่างน้อย 30 นาทีก่อนนำมาเตรียมให้เป็นอนุพันธ์

การแยก Conjugated fraction

กำจัด diethylether ปริมาณเล็กน้อยที่ยังคงค้างอยู่ในส่วนที่เป็นน้ำโดยใช้ heating block จากนั้นเติม β - glucuronidase 25 ไมโครลิตร ลงในส่วนผสม ทิ้งไว้ที่ 55 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังทิ้งให้เย็นแล้วเติม K_2CO_3 internal standard (1,2-dideuterotestosterone, 20 ไมโครลิตร) และ diethylether 5 มล.

หลังจากทิ้งไว้ 30 วินาทีนำมาเขย่าด้วย vortex-mixer เติม anhydrous sodium sulfate 1 กรัม ในขณะที่เขย่าอย่างต่อเนื่อง หลังจากทิ้งเอาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาทีนำหลอดมาปั่นด้วยความเร็ว 2500 รอบต่อนาที ถ่ายส่วนอีเธอร์ ไปยังหลอดสำหรับปั่นหลอดอื่น และทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ vacuum rotary evaporator ทำให้แห้งโดยใส่ใน desiccator ที่มี P_2O_5 /KOH อย่างน้อย 30 นาทีก่อนนำไปเตรียมให้เป็นอนุพันธ์

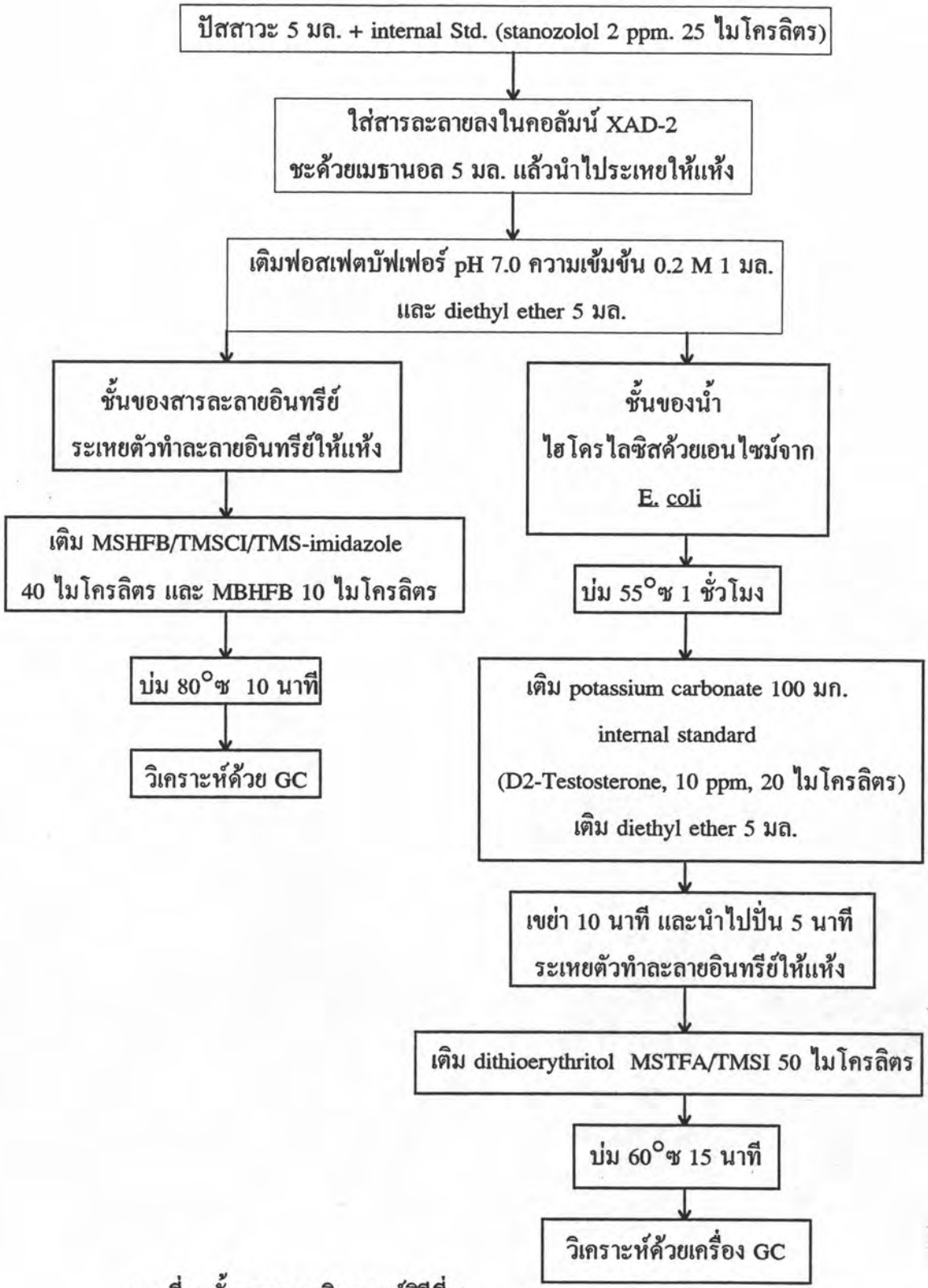
การเตรียม Free fraction ให้เป็นอนุพันธ์

เติมส่วนผสมของ MSHFB/TMS-C1/TMS-imidazole(100:5:2, v:v:v) 40 ไมโครลิตร ให้ความร้อนแก่หลอดโดยให้มีอุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม MBHFB 10 ไมโครลิตร และให้ความร้อนอีกครั้งให้มีอุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 10 นาที

การเตรียม Conjugated fraction ให้เป็นอนุพันธ์

เติมส่วนผสมของ MSTFA/TMS-I(1000:2) 50 ไมโครลิตร และ dithioerythritol 2 มก./มล. และให้ความร้อนแก่หลอดให้มีอุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการวิเคราะห์ได้แสดงไว้ในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการวิเคราะห์วิธีที่ 4

การวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทรกราฟี

เครื่องมือที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์

- HP 5890A Gas Chromatograph (GC)
- HP 5970B Mass Selective Detector MSD)
- HP 59970C MS ChemStation
- HP 7946 Disc Drive
- HP 2934A Dot Matrix Printer

สภาวะที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ free fraction ด้วยวิธีโครมาโทรกราฟี

- Column : HP fused silica capillary, cross-linked 5% phenylmethyl silicone, length 17 m, internal diameter 0.2 mm, film thickness 0.33 μm
- Injector temperature : 280 °ซ
- Transfer line temperature : 300 °ซ
- Injection mode :Splitless
- Carrier gas : ฮีเลียม อัตราการไหล 0.84 มล./นาที
- Temperature program:
- Initial temperature : 180 °ซ
- Rate : 30° ซ/นาที.
- Final temperature : 310 °ซ
- Final time : 3 นาที.
- Total run time : 10 นาที

สภาวะที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ conjugated fraction ด้วยวิธีโครมาโทรกราฟี

- Column : fused silica capillary, cross-linked methyl silicone length 17 m, internal diameter 0.2 mm, film thickness 0.33 μm
- Injector temperature : 280° ซ
- Transfer line temperature : 300° ซ
- Injection mode :Split(1:10)
- Carrier gas : ไฮโดรเจน อัตราการไหล 1.2 มล./นาที

- Temperature program:
- Initial temperature : 180 °ซ
- Initial time : 1 นาที.
- Rate : 4 °ซ/นาที.
- Final temperature : 224 °ซ
- Final time : 0 นาที.
- Rate : 15 °ซ/นาที.
- Final temperature : 300 °ซ
- Final time : 2 นาที.

วิธีที่ 5

วิธีนี้ใช้สำหรับการวิเคราะห์การมียาขับปัสสาวะในปัสสาวะ วิธีวิเคราะห์อาศัยหลักการของ Solid-phase extraction โดยใช้ตลับ Sep-Pak C_{18} สารที่สกัดออกมาจากปัสสาวะจะถูกวิเคราะห์โดย high performance liquid chromatograph โดยใช้ diode-array detector

ข้อมูลที่ใช้ในการตรวจหายาขับปัสสาวะมี retension time และ UV spectrum ของสารเปรียบเทียบกับปัสสาวะที่ทราบแน่ว่ามียาขับปัสสาวะ ยืนยันการตรวจยาขับปัสสาวะโดยการเตรียมให้เป็นอนุพันธ์แล้ววิเคราะห์โดย GC/MS

<u>ยาขับปัสสาวะที่ตรวจโดยวิธีที่ 5</u>

Acetazolamide

Amiloride

Benzthiazide

Bendroflumethiazide

Bumetanide

Canrenone

Chlorthalidone

Dichlorphenamide

Ethacrynic acid

Furosemide

Hydrochlorothiazide

Spironolactone

Triamterene

<u>อุปกรณ์ และ สารเคมี</u>

อุปกรณ์

- Sep-Pak cartridge rack (Waters, U.S.A.)
- Vacuum rotary evaporator (Büchi, Swit.)
- Sample clarification kit, organic (Waters, U.S.A.)

สารเคมี

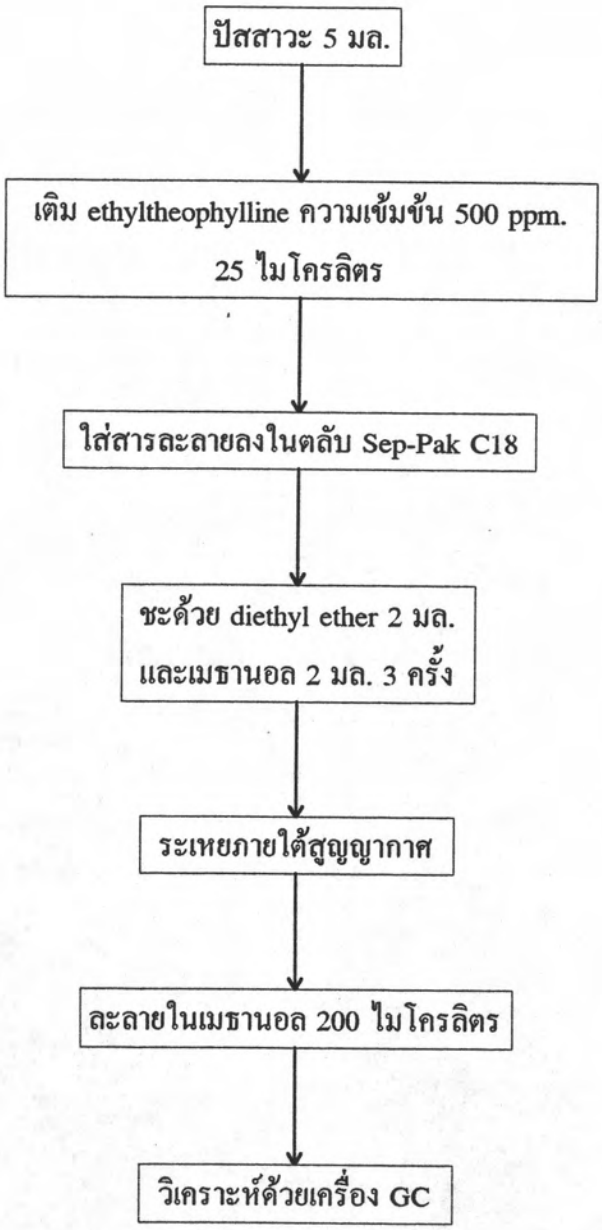
- Sep-Pak C_{18} cartridge rack (Waters, U.S.A.)
- 7-Ethyltheophylline methanolic solution : 1000 ไมโครกรัม/มล.
- Diethylether : กลั่นจาก CaH_2 แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ
- Methanol : HPLC grade (Burdick & Jackson, U.S.A.)
- Acetonitrile : HPLC grade (Burdick & Jackson, U.S.A.)
- น้ำกลั่น : เตรียมโดยผ่านระบบ Milli-RO และระบบ Milli-Q
- สารละลายบัฟเฟอร์, pH 6.7 - 6.8 : 0.01 M K_3PO_4 และ 0.02 M KH_2PO_4 ในน้ำกลั่น
- Methyl iodide (Sigma, U.S.A.)

วิธีการวิเคราะห์

ล้างตลับ Sep-Pak C_{18} ด้วยเมธานอลและน้ำกลั่น ใส่ปัสสาวะ 5 มล. และ internal standard 25 ไมโครลิตร ลงใน ตลับ หลังจากที่ปัสสาวะถูกชะออกล้าง ด้วยน้ำกลั่นในปริมาตรเท่ากัน และ n-hexane 1 มล. ชะส่วนที่จับติดกับคอลัมน์ซึ่งประกอบด้วยยาขับปัสสาวะ ด้วย diethylether 6 มล. และ เมธานอล 2 มล. ส่วนที่ได้จากการสกัดทั้งหมดจะถูกทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง vacuum rotary evaporator และ vacuum desiccator ที่มี P_2O_5 / KOH ประมาณ 10 นาที

ละลายกาก (residue) ที่ทำให้แห้งแล้วแห้งด้วย เมธานอล 200 ไมโครลิตร และกรองด้วย sample clarification kit ฉีดสารละลาย 5 ไมโครลิตร เข้าไปใน HPLC

สำหรับปัสสาวะ ที่ใช้เป็นแบลงค์ (Blank) นำมาทำการวิเคราะห์ด้วยขั้นตอนเช่นเดียวกันโดยใช้ ปัสสาวะที่ปราศจากสารต้องห้าม 5 มล. สำหรับวิธีการวิเคราะห์ได้แสดงไว้ในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการวิเคราะห์วิธีที่ 5

การตรวจยืนยัน

ละลายสิ่งตัวอย่างที่ผ่านการสกัด, ระเหยและทำให้แห้ง ในอะซิโตน 200 ไมโครลิตร เติม methyl iodide 200 ไมโครลิตร และ potassium carbonate 100 มก. นำไปให้ความร้อนในขวดที่ปิดมิดชิดที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำโครมาโทแกรมของสารที่เป็นอนุพันธ์มาเปรียบเทียบกับ authentic standard

<u>การวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตรกราฟี</u>

เครื่องมือที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์

- HP 1090A High Performance Chromatograph
- DR 5 Solvent Delivery System
- Auto-Sampler and Auto-Injector
- Diode-Array Detector
- HP 9000-300 Computer
- HP 9133 Disc Drive
- HP 7475 Plotter
- Think Jet Printer

สภาวะที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟี

- Column : Hypersil-ODS (100 x 4.6 mm ID, 5 μm particle)
- Oven temperature : 40 °ซ
- Mobile phase : (A) phosphate buffer (B) acetonitrile

  gradient ; 96% (A) $\xrightarrow[4\text{min.}]{}$ 90% (A) $\xrightarrow[6\text{min.}]{}$ 60% (A)
  $\xrightarrow[3\text{min.}]{}$ 40%(A) $\xrightarrow[2\text{min.}]{}$ 40%(A)
- Flow rate : 1.0 มล./นาที.
- Detector : Diode-Array Detector(Signal, 220, 273 นาโนเมตร)

วิธีที่ 6 Fluorescence polarization ImmunoAssay (TDX System)

นอกจากการวิเคราะห์สารต้องห้ามโดยใช้แกสโครมาโทกราฟี และ/หรือ แกสโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี แล้วยังมี Fluorescence Polarization Immuno Assay (TDX System of Abbot Laboratories, Chicago, U.S.A.) ปัจจุบันมีวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ amphetamines, opiates, cocaine metabolites, phencyclidine, cannabinoids, barbiturates และ benzodiazepines

ระบบ TDX เป็นวิธี homogeneous competitive immunoassay system ที่ใช้ Fluorescence Polarization ImmunoAssay (FPIA) ระบบนี้มีความสามารถในการวิเคราะห์ยารักษาโรค, ฮอร์โมน, สารเคมีที่มีความสำคัญทางคลินิค, โปรตีน ในน้ำเหลืองหรือในปัสสาวะ

<u>หลักการของการวิเคราะห์โดยวิธี TDX (competitive FPIA) มีดังนี้</u>

หลอด ทังสเตนฮาโลเจนที่อยู่ในระบบปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่นต่าง ๆ ออกมาโดยเกิดจัดเรียงเป็นที่ว่างแบบสุ่ม เมื่อผ่าน interference filter จะให้แสงที่มีความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร ผ่านเท่านั้น จึงเป็นแสงสีเดี่ยวสีน้ำเงิน หลังจากที่แสงสีน้ำเงินผ่าน light-crystal polarizer เกิดเป็นแสงที่มีระนาบเดี่ยว แสงสีน้ำเงินที่มีระนาบเดี่ยวนี้จะไปกระตุ้น fluorophore ให้อยู่ในสภาวะเร้าหลังจากผ่านของผสมที่เกิดปฏิกิริยาที่มี แอนติบอดี และ แอนติเจน ที่อยู่ในตัวอย่าง และ แอนติเจน ที่ถูกติดฉลากด้วย fluorescein หลังจากการเกิดสภาวะเร้า fluorophore กลับสู่ steady state และปล่อยแสงสีเขียวที่มีความยาวคลื่น 525-550 นาโนเมตรออกมา

ในส่วนผสมที่ทำปฏิกิริยาถ้า fluorescein-antigen complex (tracer) จับกับแอนติบอดี ที่มีโมเลกุลใหญ่และไม่หมุนอย่างอิสระ การโพลาไลซ์ของแสงสีเขียวที่ปล่อยออกมาจะคงเหมือนกับระนาบของแสงสีน้ำเงินที่เกิดจากการเร้า ในทางกลับกันถ้าสารประกอบของ fluorescein-antigen หมุนได้อย่างอิสระเพราะโมเลกุลของ fluorescein-antigen ซึ่งมีขนาดเล็กไม่จับกับ แอนติบอดี แสงสีเขียวที่ปล่อยออกมาจะมีระนาบแตกต่างจากแสงสีน้ำเงินที่ได้จากการเร้า และสูญเสียการโพลาไลซ์ไป

ดังนั้นถ้าตัวอย่างมีแอนติเจนความเข้มข้นต่ำ ๆ จะมีผลให้มีแอนติบอดีที่จับกับ tracer ในปฏิกิริยาจนส่วนผสมถึงจุดสมดุลย์ของการเกิดปฏิกิริยาแบบแย่งจับมีความเข้มข้น

T 18200450

เพิ่มขึ้น ทำให้การโพลาไลซ์สูงขึ้น ในทางกลับกันหากตัวอย่างมีแอนติเจนความเข้มข้นสูง ๆ จะเกิดการโพลาไลซ์ต่ำ

ความสัมพันธ์ที่แน่นอนระหว่างการโพลาไลซ์ และ ความเข้มข้นของยาในตัวอย่าง การวัดความเข้มข้นของยาในตัวอย่างทำได้โดยการวัดอัตราการโพลาไลซ์ ของตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นของยา แล้วนำผลมาเปรียบเทียบกัน

<u>อุปกรณ์และสารเคมี</u>

เครื่องที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นเครื่องตั้งโต๊ะขนาดเล็กที่ต่ออยู่กับเครื่องพิมพ์, จอสำหรับแสดงผล, ปุ่มที่ใช้ในการควบคุมและสำหรับเข้าถึงส่วนต่าง ๆ ส่วนประกอบภายในเครื่องประกอบด้วย ส่วนสำหรับดูดน้ำยา, ส่วนที่เกี่ยวข้องกับแสง และ ตัวตรวจจับ เครื่องวิเคราะห์ชุดนี้มีโปรแกรมที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์รุ่นที่ 10 สูงกว่าด้วย

ระบบนี้ต้องการน้ำยา และ ส่วนประกอบต่าง ๆ สำหรับการวิเคราะห์ ดังต่อไปนี้

น้ำยา

- น้ำยาสำหรับ Calibrate เครื่อง 6 ขวด
- Control 3 ขวด ระดับ สูง, กลาง และต่ำ
- buffer สำหรับเจือจาง : 0.1 M phosphate buffer ที่มีน้ำยารักษาสภาพโปรตีน และ 0.1% NaN_3 เป็น preservative
- ชุดน้ำยา : ชุดน้ำยาสำหรับ S-T-P มี 3 ขวด และน้ำยาสำหรับ W-S-T-P มี 4 ขวด และขวดน้ำยามีการติดบาร์โคต (bar code)

ส่วนประกอบ

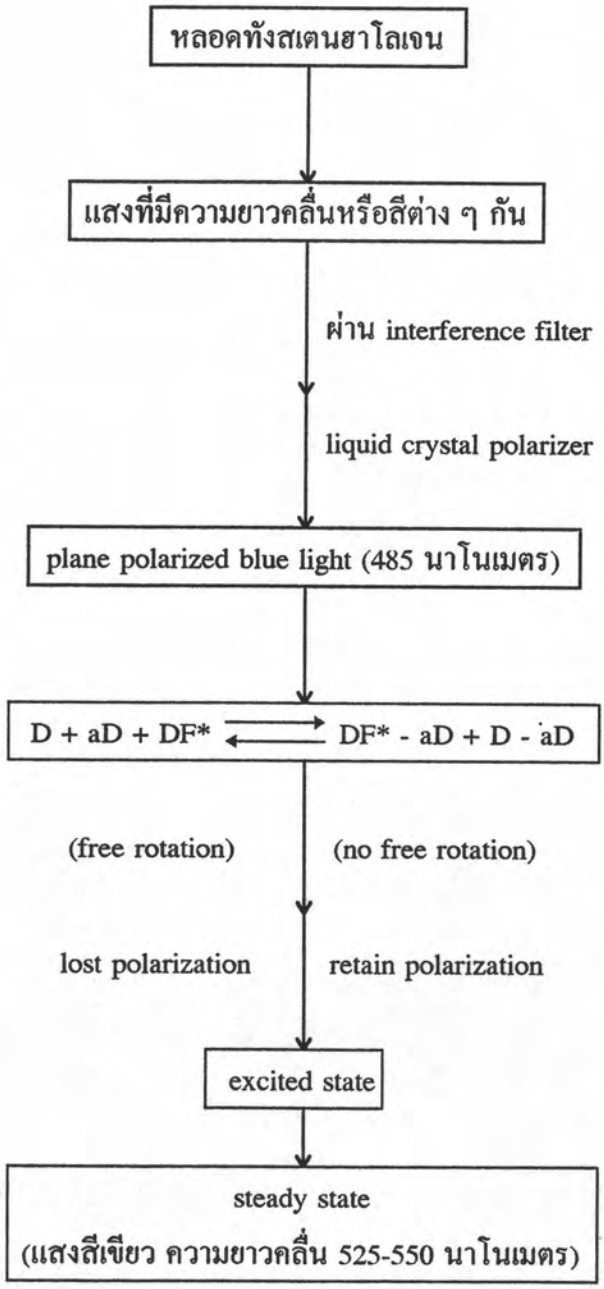
- ถาดสำหรับใส่ตัวอย่าง ซึ่งใส่ได้ 20 ตัวอย่างและ cuvette
- Cuvettes
- หลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง และใส่ตัวอย่างก่อนเจือจาง

วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์สามารถใส่ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ได้มากถึงครั้งละ 20 ตัวอย่าง และใส่ cuvette ลงในถาด pipette ตัวอย่างลงในแต่ละหลุมที่ใส่ตัวอย่าง แล้วใส่ถาดเข้าไปในเครื่องวิเคราะห์ หลังจากเปิดน้ำยาแล้วใส่ลงในเครื่องวิเคราะห์, ปิดประตู, กดปุ่ม run เพื่อเริ่มการวิเคราะห์

ระหว่างขั้นตอนเริ่มต้น, เครื่องวิเคราะห์จะเริ่มทดสอบการทำงาน, ตรวจสอบ bar code, นับจำนวน cuvette, น้ำยา และตัวอย่าง จากนั้นตัวอย่างจะผ่านขั้นตอนการ pipette และผสม ระหว่างกระบวนการจะทำการวัด background เพื่อแก้ค่าการเกิด fluorescence ของตัวอย่าง และมีการล้างหัวสำหรับดูดบ่อย ๆ เพื่อป้องกันการดูดตัวอย่างมากเกินไป

หลังจากสิ้นสุดการบ่ม ขั้นสุดท้ายแล้วจึงทำการวัด fluorescence polarization และคำนวณความเข้มข้นของยาโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน และพิมพ์รายงานผลการวิเคราะห์ โดยปกติการวิเคราะห์จะต้องการตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร สำหรับการวิเคราะห์ หลักการของการวิเคราะห์ได้แสดงไว้ในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 หลักการของวิธี Competitive FPIA (Homogeneous assay)

ผลและคุณสมบัติของการวิเคราะห์

เครื่องจะเก็บกราฟมาตรฐานที่ใช้สาร 6 ความเข้มข้น ซึ่งสามารถใช้การได้เป็นเวลานานถึง 2 สัปดาห์ การเกิดโพลาไลซ์ ของสารตัวอย่างถูกเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณความเข้มข้นของยาในตัวอย่าง ถึงแม้ว่าข้อมูลจากการวิเคราะห์จะเป็นผลเชิงปริมาณ แต่ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นเพียงกึ่งปริมาณเท่านั้นเพราะว่าผลจากการวิเคราะห์เป็นผลรวมจากยา และ เมทาบอไลท์ของยานั้น ซึ่งผลที่เกิดจากปฏิกิริยามีความสัมพันธ์โดยสามารถคาดการณ์ได้กับ cross-reactivity ของการวิเคราะห์

Threshold

threshold ของการวิเคราะห์ยาต้องห้ามกำหนดโดยความเข้มข้นซึ่งจะแสดงถึงการพบหรือไม่พบยา หรือ metabolite ของมันในปัสสาวะ การวิเคราะห์ยาต้องห้ามแต่ละชนิดจะมีค่าต่ำสุดที่อนุญาติให้พบได้เฉพาะแต่ละชนิด (MAT) การเปลี่ยนค่า threshold จะขึ้นอยู่กับความต้องการของแต่ละห้องปฏิบัติการความไวของแต่ละวิธี และ cross-reactivity data

ความไว (Sensitivity)

ความไวบ่งบอกถึงความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่จะแตกต่างกันตั้งแต่ระดับความเชื่อมั่น 0 ถึง 95 % MAT จะต้องสูงกว่าความไวในการวิเคราะห์มากกว่า 2 เท่าขึ้นไป

Control

การควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์ จะใช้ชุดของ control ที่มี 3 ขวด ระดับตั้งแต่ ต่ำ, กลาง และสูง

Specificity

วิธีการตรวจวิเคราะห์ parent drug และ major metabolites ภายในกลุ่มของยาที่มีความเกี่ยวข้องกันทางเคมี (31)

ได้มีการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกัน (cross-reactivities) ของสารต่าง ๆ พร้อมทั้งเมทาบอไลท์ของสารบางชนิดดังแสดงในตารางที่ 2 - 8

ตารางที่ 2 % cross-reactivity ของ แอมเฟตามีน และ เมทแอมเฟตามีน

AMPHETAMINE/METHAMPHETAMINE

Test Compound	%Cross-Reactivity
d-Amphetamine	96.7
l-Amphetamine	83.3
pOH-Amphetamine	100.0
d-Methamphetamine	123.3
l-Methamphetamine	N.D.
d,l-Methamphetamine	103.3
d,l-Amphetamine*	100.0

---

* Assay Calibrator

N.D. = None detected. concentration less than the sensitivity of the assay.

ตารางที่ 3 %cross-reactivity ของยากลุ่มบาบิทูเรท

BARBITURATES

Test Compound	%Cross-Reactivity
Allobarbital	30.8
Alphenal	107.5
Amobarbital	157.5
Aprobabital	45.0
Barbital	N.D.
Barbituric Acid	N.D.
1,3-Dimethylbabituic Acid	N.D.
p-(Hydroxyphenyl)-Barbituric Acid	65.0
Brallobarbital	95.0
Butabarbital	80.0
Butalbital	102.5
Butobarbital	157.5
Cyclopentobarbital	132.5
Hexobarbital	N.D.
Pentobarbital	100.0
Phenobarbital	120.0
Secobarbital*	100.0
Talbutal	92.5

---

* Assay Calibrator

N.D. = None detected. concentration less than the sensitivity of the assay.

ตารางที่ 4 %cross-reactivity ของยากลุ่ม เบนโซไดอะซีพีนส์

BENZODIAZEPINES

Test Compound	%Cross-Reactivity
Alprazolam	116.5
Bromazepam	47.3
Chlordiazepoxide	22.4
Clonazepam	47.3
Demoxepam	33.3
N-Desalkylflurazepam	59.2
Diazepam	144.1
Flunitrazepam	70.1
Flurazepam	75.0
1-N-Hydroxyethyl- Flurazepam	89.8
Lorazepam	45.5
Medazepam	98.8
Nitrazepam	89.1
Nordiazepam*	100.0
Norchlordiazepoxide	58.6
Oxazepam	92.4
Prazepam	118.6
Termazepam	98.9
Triazolam	82.7

---

* Assay Calibrator

N.D. = None detected. concentration less than the sensitivity of the assay.

ตารางที่ 5 %cross-reactivity ของยากลุ่มคานาบินอยส์

CANNABINOIDS

Test-Compound	%Cross-Reactivity
11-nor-Δ^8-Tetrahydrocanna-binol-9-carboxylic acid*	100.0
11-nor-Δ^9-Tetrahydrocanna-binol-9-carboxylic acid	90.0
11-OH-Δ^9-Tetrahydrocan- nabinol	49.6
8-β-OH-Δ^9-Tetrahydrocan-nabinol	61.9
8-β-- diOH-Δ^9-Tetrahydrocannabinol	69.5
Cannabidiol	N.D.
Cannabinol	24.3

ตารางที่ 6 %cross-reactivity ของโคเคนและเมทาบอไลท์

COCAINE METABOLITE

Test Compound	%Cross-Reactivity
Benzoylecgonine*	100.0
Cocaine	1.4
Ecgonine Methyl Ester	0.16
Ecgonine	2.0

---

* Assay Calibrator

N.D. = None detected. concentration less than the sensitivity of the assay.

ตารางที่ 7 %cross-reactivity ของสารจำพวกฝิ่น

OPIATES

Test Compound	%Cross-Reactivity
Codeine	117.5
Diacetylmorphine	60.0
Dihydrocodeine	61.0
Ethylmorphine	76.5
Hydrocodone	64.2
Hydromorphone	76.0
Levorphanol	73.0
Morphine*	100.0
Morphine-3-β-D-Glucuronide	44.5
N-Normorphine	4.1
N-Norcodeine	6.7
Oxycodone	23.5
Oxymorphone	17.5
Thebaine (dimethylmorphine)	51.0

ตารางที่ 8 %cross-reactivity ของสารจำพวก เฟนซัยคลิดีน

PHENCYCLIDINE

Test Compound	%Cross-Reactivity
Phencyclidine*	100.00
4-Hydroxypiperidine PCP	45.95

---

* Assay Calibrator

N.D. = None detected. concentration less than the sensitivity of the assay.

นอกจากวิธีวิเคราะห์สารต้องห้ามของ IOC แล้วยังมีผู้พัฒนาเทคนิคในการวิเคราะห์สารต้องห้ามวิธีอื่น ๆ ดังนี้

การวิเคราะห์ฮอร์โมน HCG

การวิเคราะห์ฮอร์โมน HCG มักใช้วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยอาศัยหลักปฏิกิริยาของ แอนติเจน และ แอนติบอดี (6) ในปี ค.ศ. 1960 Wide & Gemzell ชาวสวีเดน เป็นผู้ริเริ่มใช้วิธีทดสอบที่เรียกว่า Hemagglutination Inhibition assay (7) เพื่อตรวจหา HCG โดยใช้เม็ดเลือดแดงแกะ มาเคลือบด้วย HCG แล้วเอามาทำปฏิกิริยากับ HCG - Antiserum วิธีนี้สามารถตรวจ HCG ปริมาณน้อยที่สุด (Sensitivity) ได้เพียง 700 - 1000 IU ต่อปัสสาวะ 1 ลิตร ในปีเดียวกันนี้เอง Mackean ได้ทดลองใช้วิธี Gel Precipitation (Ring test) และพบว่าสามารถตรวจหา HCG ได้อย่างน้อยที่สุด 16 IU ต่อน้ำเหลือง 1 มล.

ในปี ค.ศ. 1960 - 1961 Brody & Carlstrom ได้ใช้วิธี Complement Fixation Assay ซึ่งสามารถตรวจ Serum HCG ได้ปริมาณน้อยที่สุดได้ 750 MIU (milli international unit) ต่อน้ำเหลือง 1 มล. (1 IU = 1000 MIU) ซึ่งนับว่าเป็นที่ไวพอสมควรในขณะนั้นแต่อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวค่อนข้างจะยุ่งยาก ใช้เวลาในการวเคราะห์นาน และผู้ทำจะต้องมีความชำนาญพอสมควร มิฉะนั้นแล้วจะทำให้ผลที่ได้จากการตรวจผิดพลาดไปจึงไม่เป็นที่นิยมเท่าที่ควรในระยะเวลาใกล้เคียงกันนี้เองในปี ค.ศ.1965 Little ได้พยายามดัดแปลงวิธีของ Wide & Gemzell โดยใช้ Latex particles (ลักษณะเป็นผงสีขาว ๆ) มาแทนเม็ดเลือดแดงแกะ ซึ่งในระยะต่อมาก็มีการวิวัฒนาการให้สะดวกในการใช้มากขึ้น นั่นคือนำมาทำเป็นการตรวจสอบบนสไลด์

ในปี ค.ศ. 1965 Wilde, ORR & Bagsaew ได้ค้นพบวิธี Radioimmunoassay (RIA) โดยใช้สารกัมมันตภาพรังสีไอโอดีน (Radioisotope Iodine, I^{131} & I^{125}) มาช่วย ในการวิเคราะห์ซึ่งสามารถตรวจ HCG ได้ปริมาณต่ำถึง 3 MIU ต่อ Serum 1 มล. แต่การวิเคราะห์ใช้เวลานานหลายวัน ต่อมาในปี ค.ศ. 1972 Goldstein และคณะได้พยายามร่นเวลาการวิเคราะห์ลงมาเหลือ 5 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามวิธีนี้มี cross reaction กับ Lutinizing Hormone (LH) ทั้งนี้เพราะ HCG & LH มี Biological & Immunological reaction เหมือนกันทุกประการในช่วงระยะเวลาใกล้เคียงกันนี้เอง Vaitukaitis และคณะได้พบวิธี Radioimmuno-assay กับ LH แต่ก็ใช้เวลาในการวิเคราะห์ถึง 36 - 72 ชั่วโมง ในระยะเวลาต่อมาได้พยายามลดเวลาของการวิเคราะห์ลงเหลือ 2 ชั่วโมงแต่ปรากฏว่าการทำเช่นนี้ทำให้เกิดผลเสียในเรื่อง

ความไว, ความแม่นยำ และ ความจำเพาะ กล่าวคืออาจจะเกิดความผิดพลาดได้ถึง 50% ฉะนั้น วิธีนี้จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้

ในปี ค.ศ. 1974 Sexena & Landesman ได้ค้นพบ Radioreceptorassay (RRA) (8,9) ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับ RIA ทุกประการ เพียงแต่ใช้ receptor membrane ซึ่งทำมาจาก Corpus luteum ของวัวที่ตั้งครรภ์มาทำแทน HCG-Antibody และใช้สารกัมมันตภาพรังสี I^{125} ร่วมด้วยเช่นกัน วิธีนี้สามารถวิเคราะห์โดยใช้เวลาเพียง 1 ชั่งโมงเท่านั้น

อย่างไรก็ตามทั้งวิธี Radioimmunoassay และ Radioreceptorassay ต้องใช้วัสดุและเครื่องมือที่มีราคาแพง เช่น Gamma Counter ฉะนั้นจึงไม่สามารถแพร่หลายไปมากเท่าที่ควร การวิเคราะห์วิธี Immunoassay ดังกล่าวแล้วมีความแตกต่างกันในหัวข้อต่าง ๆ ดังสรุปในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 วิวัฒนาการของการตรวจหา Human Chorionic Gonadotropin โดยวิธี Immunoassay ที่คำนวณหาปริมาณได้ และแสดงการเปรียบเทียบกันในรายละเอียดของแต่ละวิธี

METHOD	YEAR	INVESTIGATOR	DAY OF DETECTION AFTER OVULATION	PERFORMANCE TIME	SENSITIVITY IN 1ML OF SERUM	SPECIFICITY %	SPECIMEN
Hemagglutination inhibition	1960	WIDE: GEMZELL		2 MIN.	0.1-20 IU 700-1000 IU/L Urine		
Gel Precipitation (Precipitin or Ring Test)	1960	MACKEAN	25	2 HRS.	16 IU	90	URINE BLOOD
Complement Fixation	1960-1	BRODY& CARLSTROM			100-750 MIU		
Latex Agglutination Inhibition	1962	LITTLE			0.1-20 IU		
Radioimmunoassay (RIA)	1965	WILDE.ORR& BAGSANE	7-9	24-72 HRS.	3-60 MIU		BLOOD
RIA of HCG BATA subunit	1972	VAITUKAITIS ET AL			3 MIU		
Radioreceptorassay	1974	SEKENA & LANDESMAN	5-8	1 HOUR	3 MIU	99	BLOOD URINE

HEMAGGLUTINATION INHIBITION ASSAY OF HCG

Hemagglutination Inhibition Assay (HIA) ของ HCG ที่กล่าว ต่อไปนี้ ใช้หลักของ Wide & Gemzell (1960 - 1961) และของ Mishell และคณะ (1963 - 1966) แล้วนำมาดัดแปลงเพื่อให้เกิดความเหมาะสม หลักของ HIA ก็คือเมื่อเอาเม็ดเลือดแดงแกะมาเคลือบด้วย HCG แล้วเอามาทำปฏิกิริยา HCG-Antiserum จะเกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงแกะนั้น ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า "Agglutination" และจะเห็นเป็นสีชมพูอ่อนสม่ำเสมอกระจายไปทั่ว ซึ่งเรียกว่า "MAT" ถ้านำเอา HCG มาทำปฏิกิริยากับ HCG-Antiserum ก่อน HCG-Antiserum จะถูก Inactivated ด้วย HCG จนหมด เลยทำให้ HCG-Antiserum นั้นหมดฤทธิ์ที่จะไปทำปฏิกิริยากับ HCG ที่ถูกเคลือบอยู่บนเม็ดเลือดแดงแกะ จึงทำให้เม็ดเลือดแดงแกะที่ถูกเคลือบด้วย HCG ก็จะไม่จับกลุ่มกัน (No agglutination) หรือเกิดการยับยั้ง (Inhibition) การ Agglutination ฉะนั้นจึงเรียกการวิเคราะห์แบบนี้ว่า Hemagglutination Inhibition Assay เมื่อเม็ดเลือดแดงแกะนั้นถูกตั้งทิ้งไว้นาน ๆ ก็จะตกตะกอนเป็นรูปวงแหวนซึ่งสภาพนี้เรียกว่า "Ring"

LATEX AGGLUTINATION INHIBITION ASSAY OF HCG

วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้หลักการเดียวกับ Hemagglutination Inhibition Assay of HCG ต่างกันตรงที่ใช้ Latex particles แทนเม็ดเลือดแดงแกะ และเป็นการเชิงคุณภาพ (Qualitative assay)

หลักการของตรวจสอบบนสไลด์ (slide test) ก็คือ เอา HCG มาเคลือบให้ติดกับ Latex particles ซึ่งเป็นผงสีขาว ๆ ก็จะได้ HCG-Coated latex particles ซึ่งถือว่าเป็น antigen และถ้าผสมกับ HCG-antiserum (Anti - HCG) (ได้มาจากการ Immunization ในสัตว์ทดลอง) ซึ่งถือว่าเป็น antibody ก็จะเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มกันที่เรียกว่า Agglutination ซึ่งจะเห็นลักษณะเป็นเม็ดทรายหยาบ ๆ บน Slide แต่ถ้าเอา HCG-Antibody มาผสมกับปัสสาวะซึ่งมี HCG อยู่ก็จะทำปฏิกิริยากัน ทำให้ HCG-Antibody นั้นหมดฤทธิ์ไป (Inactivated HCG-Antibody) ฉะนั้นเมื่อเอา HCG-Coated latex particle ใส่ลงไปใน HCG บน Latex particles ก็จะไม่ทำปฏิกิริยากับ แอนติบอดี นั้น นั่นคือ HCG ที่อยู่ในปัสสาวะนั้นจะไป ยับยั้ง (Inhibition) ไม่ให้เกิดปฏิกิริยา Agglutination ฉะนั้น Latex particles ซึ่งมี HCG ติดอยู่นั้นก็จะไม่จับกลุ่มกันเป็นเม็ดทรายดังกล่าว (No agglutination) แต่จะลอยตัวเป็น Suspension อยู่อย่างเดิม

RADIORECEPTORASSAY OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN

วิธีนี้ถือว่าเป็นวิธีการวิเคราะห์แบบใหม่สุดของ HCG ซึ่งค้นพบโดย Landesman & Saxena ในปี ค.ศ. 1974 โดยอาศัยหลักการคล้ายคลึงกับ Radioimmunoassay แต่ใช้ Receptor membrane ซึ่งทำมาจาก Corpus luteum ของวัวที่กำลังตั้งครรภ์ในระยะ 3 เดือนแรก มาทำหน้าที่แทน HCG-Antiserum และใช้สารกัมมันตภาพรังสี I^{125} มาร่วมด้วย กล่าวคือเมื่อนำ HCG-I^{125} (Hot HCG) จำนวนจำกัด และ HCG (Cold HCG) ซึ่งอาจจะมีอยู่ในน้ำเหลืองของผู้ป่วยหรือใน Standard ที่ทราบจำนวน HCG (reference control) ไปผสมกับ Receptor membrane แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที ก็จะเกิดการแข่งขัน (competition) การจับตัว (binding) ระหว่าง HCG - I^{125} และ HCG กับเมมเบรนนั้น ถ้ามี HCG อยู่น้อยก็จะจับตัวกับเมมเบรนได้น้อยจึงทำให้ HCG - I^{125} มาจับอยู่บนเมมเบรน ได้มาก เมื่อนำเอาเมมเบรนไปใส่ใน Gamma counter วัดดูก็จะได้จำนวน Count per minute (CPM) มาก ในทางตรงกันข้าม ถ้ามี HCG อยู่มาก ก็จะไปจับตัวบนเมมเบรนมาก ฉะนั้น HCG - I^{125} ก็จะจับอยู่น้อย และเมื่อไปวัดดูก็จะได้ค่า CPM น้อย

Radioreceptorassay นี้ สามารถวิเคราะห์เสร็จและทราบผลภายใน 1 ชั่วโมง สามารถตรวจ HCG ใน น้ำเหลือง ได้ต่ำถึง 3 Milli-International Units ต่อ น้ำเหลือง 1 มล. อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังมี Cross reaction กับ Luteinizing hormone (LH) แต่ไม่มี Cross reaction กับฮอร์โมนชนิดอื่น อาทิ Prolactin, follicle Stimulating hormone (FSH), human placental lactrogen (HPL), Thyroid stimulating hormone (TSH), Human growth hormone (HGH), ATCH

Radioimmunoassay (RIA)

การตรวจวัดปริมาณฮอร์โมน hCG ในเลือดหรือในปัสสาวะโดยวิธี RIA นี้มีความไวมากกว่าการตรวจสอบบนสไลด์ 100-200 เท่า และสามารถตรวจวัดปริมาณ hCG ในระดับที่ต่ำถึง 1 mIU/มล. (10)

ENZYME IMMUNOASSAY (EIA) TECHNIQUE (11)

วิธี EIA นี้ใช้เอนไซม์ในการติดฉลากแทนกัมมันตรังสี ทำให้ราคาถูกลงและกำจัดของเสียได้ง่ายขึ้น

IMMUNORADIOMETRIC ASSAY (IRMA)

การวิเคราะห์ hCG โดยวิธีนี้จะใช้ monoclonal antibody 2 ตัว คือต่อ α หรือ β subunit หรือใช้ผสมกันระหว่าง hCG ทั้งโมเลกุล และ β subunit ซึ่ง แอนติบอดี 2 ตัวนี้จะจำเพาะต่อส่วนของโมเลกุลต่างกัน แอนติบอดี ตัวแรกจะถูกเคลือบอยู่บนเม็ดพลาสติก และแอนติบอดีตัวที่ 2 (soluble antibody) จะถูกติดฉลากด้วย I^{125} เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา แอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ จะเป็นในรูปแซนวิช หลังจากนำไปล้างเอาแอนติบอดี ที่มีกัมมันตรังสีที่ไม่ได้จับกับแอนติเจนออกแล้ว นำไปวัดปริมาณกัมมันตรังสี ปริมาณของรังสีที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ hCG วิธีนี้มีความไวถึง 1.5 mIU/มล. และมีช่วงที่เป็นเส้นตรง ถึง 400 mIU/มล. มี cross - reactivity กับ LH ต่ำกว่า 1%

นอกจากวิธีต่าง ๆ เหล่านี้แล้ว ยังสามารถวิเคราะห์ hCG โดยใช้วิธี Bioassay อีกด้วย เช่น การนำสิ่งตัวอย่างไปใส่ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีปฏิกิริยากับ hCG แล้วดูปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น เช่น เซลล์ของ รังไข่ หรือ ฉีดเข้าไปในตัวสัตว์แล้วสังเกตดูการตกไข่ก็ได้ หรืออาจใช้เทคนิคทาง Cytology ในการวิเคราะห์ก็ได้ การวิเคราะห์ด้วยวิธี Bioassay นี้ไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และผลของการวิเคราะห์ไม่แน่นอน (12)

CORTICOTROPIN (ACTH) AND RELATED PEPTIDES (β-LPH, ENDORPHINS AND ENKEPHALINS)

ACTH สามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น Bioassay, radioimmunoassay และ receptorassay แต่วิธีที่เหมาะสมที่สุด (method of choice) สำหรับการวิเคราะห์ ACTH คือ Radioimmuno assay (RIA) หลักการวิเคราะห์โดยวิธี RIA คือ นำสิ่งตัวอย่างมาบ่มกับ ACTH ที่ติดฉลากด้วยกัมมันตรังสี (I^{125} - ACTH) และ แอนติบอดี (Anti ACTH) เมื่อเกิดเป็น แอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์ แล้ว นำมาแยก bound และ free tracer ออกจากกันโดยใช้ วิธีวิเคราะห์ที่ใช้แอนติบอดี 2 ชนิด เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วนำไปปั่นให้ตกตะกอนแล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง gamma scintillation counters สามารถเปรียบเทียบหาปริมาณของ ACTH ได้จาก กราฟมาตรฐานที่วิเคราะห์ไปพร้อม ๆ กัน

GROWTH HORMONE

การวิเคราะห์ GROWTH HORMONE ทั้งในเลือดและในปัสสาวะ นิยมใช้วิธี (method of choice) radioimmunoassay (RIA) โดยการนำสิ่งตัวอย่างมาบ่มกับ I^{125} - labeled growth hormone และ Anti-GH หลังจากนั้นจึงแยกส่วน ฟรีแอนติเจน และแอนติเจนแอนติบอดีคอมเพล็กซ์ โดยใช้ แอนติบอดีตัวที่ 2 แล้วนำไปวัด radioactivity ของ bound fraction แล้วเปรียบเทียบหาปริมาณจากกราฟมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไปพร้อมกัน การวิเคราะห์ Growth hormone ยังสามารถวิเคราะห์ด้วย biological assay แต่ไม่เป็นที่นิยม เพราะใช้เวลาวิเคราะห์นาน และได้ผลไม่แน่นอน

ERYTHROPOIETIN (EPO)

การวิเคราะห์ฮอร์โมน Erythropoietin นิยมใช้วิธี radioimmunoassay (RIA) และ enzyme immuno assay (EIA) เช่นเดียวกับฮอร์โมนตัวอื่น ๆ

Homogeneous enzyme immunoassay

(Enzyme Multiplied Immunoassay Technique, EMIT)

ในปี 1972 Rubenstein และคณะ (13) ได้พัฒนาเทคนิคซึ่งมีข้อดีเหนือ ELISA คือไม่ต้องมีขั้นตอนการแยกซึ่งทำให้สามารถวิเคราะห์ผลได้รวดเร็ว อย่างเช่นในกรณีที่ใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ EMIT จะสามารถหาค่าของสารในหนึ่งตัวอย่างได้ในเวลาน้อยกว่า 1 นาที

หลักการของวิธีนี้คือ แฮบเทน (hapten, ซึ่งอาจเป็นยา, ฮอร์โมน, เมทาบอไลท์ต่าง ๆ หรือสารที่ต้องการวิเคราะห์) จะถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์ เช่น lysozyme หรือ MDH (malate dehydrogenase) หรือ G-6-PD (glucose - 6 - phosphate dehydrogenase) โดยที่เอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีอยู่ แต่ถ้าแฮบเทนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี แล้วแอคติวิตีของเอนไซม์ใน hapten enzyme complex จะถูกยับยั้ง โดยยังไม่ทราบกลไกที่แน่นอน แต่เข้าใจว่าการที่ แอนติบอดี เข้าไปจับกับ แฮบเทน อาจมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ (steric hindrance) ทำให้บริเวณเร่ง (catalytic site) ของเอนไซม์ไม่สามารถจับสับสเตรทได้

ถ้าเอนไซม์ทั้งในรูปที่จับกับ แอนติบอดี (Ab - Hapten - E) กับรูปที่ไม่ได้จับกับแอนติบอดี (hapten - E) ยังคงมีแอคติวิตีอยู่ จะต้องมีขั้นตอนการแยก เพื่อที่จะทำการทดสอบ

ต่อไปได้ จึงเรียก heterogeneous แต่ถ้าแอคติวิตีของเอนไซม์หายไปในรูปที่จับกับแอนติบอดีก็ไม่จำเป็นต้องแยกเอนไซม์ในทั้งสองรูปนี้ออกจากกัน เพราะ "สัญญาณ" จะได้จากเอนไซม์ในรูปเดียวเท่านั้นคือ hapten - E ฉะนั้นจึงเรียกเทคนิคนี้ว่า homogeneous enzyme immunoassay

ในการทดสอบ จะมีสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ กับ hapten-enzyme complex และ แอนติบอดี ที่จำเพาะต่อ แฮบเทน ถ้าในสารตัวอย่างมี แฮบเทน แฮบเทน นั้นจะแข่งขันกับ แฮบเทน ใน hapten-enzyme complex เพื่อจับกับ แอนติบอดี ที่มีปริมาณจำกัด ถ้าในสารตัวอย่างมี แฮบเทน มากก็จะแย่งจับกับ แอนติบอดี ได้มากทำให้ hapten-enzyme complex ที่จะไปจับกับ แอนติบอดี มีจำนวนน้อยลง ดังนั้น เอนไซม์ใน hapten-enzyme complex ก็ยังคงมีแอคติวิตีอยู่ เอนไซม์นี้จึงสามารถสลายสับสเตรทที่เติมลงไปภายหลัง ทำให้เกิดสีซึ่งนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงได้

ตัวอย่างของการใช้ homogeneous enzyme immunoassay วิเคราะห์หาปริมาณยาและฮอร์โมนในเลือด

ยาเสพติด	Morphine
	Amphetamine
	Barbiturate
	Opiate
	Benzodiazepines
	Phencyclidine
	Propoxyphene
	Cocaine
	Methadone
ยารักษาโรคหัวใจ	Digoxin
	Propranolol
	Quinidine
ยากล่อมประสาท	Amitryptyline
	Nortryptyline
	Imipramine

ฮอร์โมน	Estriol
	T_3
	T_4
	Cortisol
ยารักษามะเร็ง	Methotrexate
ยาปฏิชีวนะ	Gentamicin
	Tobramycin
	Netilmicin

วิธีอื่น ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ สารต้องห้าม

Amphetamine และ Methamphetamine

วิธีวิเคราะห์ที่มีขั้นตอนไม่ซับซ้อนและไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ

- สกัดปัสสาวะ ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ระเหยตัวทำละลายออกไป นำกากมาหาปริมาณแอมเฟตามีน ด้วยวิธี Thin-layer chromatography

วิธีวิเคราะห์ที่มีขั้นตอนไม่ซับซ้อนและแต่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ

- สกัดปัสสาวะด้วยสารละลายอินทรีย์ แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC ใช้คอลัมน์ 10% Apiezon - 10% KOH และ ยืนยันโดยนำ Amphetamine มาทำปฏิกิริยากับ trichloroacetyl chloride ได้เป็น Amphetamine N - trichloroacetamide derivatives แล้วนำไปแยกโดย column 3% OV - 17 (14)

วิธีวิเคราะห์ที่มีขั้นตอนซับซ้อนและและต้องใช้เครื่องมือพิเศษ

ใช้ electron - capture detector (ECD) แทน flame ionization detector (FID) สามารถใช้สิ่งตัวอย่างมาวิเคราะห์ได้โดยตรง และยังมีวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunoassay) เช่น EMIT อีกด้วย

Theophylline and Caffeine

- นำสิ่งตัวอย่างมาสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ แล้วนำกาก (residue) มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องแกสโครมาโทกราฟี

มีสารรบกวนการวิเคราะห์วิธีนี้ คือ Lidocane (15)

วิธีที่ใช้ตรวจวัด Serum theophylline วิธีแรกคือ Ultraviolet spectrophotometry โดยสกัดด้วย Chloroform และ isopropanol

1. UV Spectrophotometry

สกัด theophylline แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างกัน 2 ค่า (16)

2. GC (FID)

สกัด theophylline แล้วทำเป็น derivative แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย GC

3. HPLC

สกัด theophylline และวิเคราะห์โดย reversed phase chromatography

4. EMIT

แอนติบอดี ที่จับกับ enzyme - hapten จะยับยั้ง catalytic reactivity แย่งกับ analyte ในสิ่งตัวอย่างซึ่งจะต่อต้านการ Inhibition

5. RIA

Radiolabeled hapten จะแย่งจับ antibody binding sites กับสิ่งตัวอย่าง

6. SLFIA

Unbound drug - fluorogenic substrate จะถูกเปลี่ยนเป็น fluorescent product ด้วยเอนไซม์

7. FPIA

เป็น Competitive binding with fluorescence polarization โดย Bound labeled drug จะมีการ polarized fluorescence มากกว่า free drug ซึ่งปริมาณ fluorescence จะแปรผกผันกับปริมาณยาที่ไม่ label

8. Ames test strip

เป็น competitive binding with enzymatic procedure โดยแอนติบอดีที่จับอยู่กับยาที่ถูกติดฉลากด้วย prosthetic group จะยับยั้ง glucose oxidase activity ซึ่งจะแย่งกับ endogenous drug ซึ่งสามารถ activate enzyme ได้ จะเป็น colorimetric reaction (17)

9. Syntex test strip

เป็น Immunochromatography โดยที่ยา และ ยาที่ถูกติดฉลากด้วยเอนไซม์จะเคลื่อนที่ผ่าน strip และจับกับแอนติบอดีความยาวของการเคลื่อนที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของ theophylline

Methadone

วิธีวิเคราะห์ที่มีขั้นตอนไม่ซับซ้อนและไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ

นำสิ่งตัวอย่างมาทำการสกัดในสภาวะที่เป็นด่าง ด้วย n - hexane และ subsequent back - extraction ใน ceric sulfate - sulfuric acid และ สกัดในสภาวะที่เป็นกรด แล้ว reflux ด้วย n - heptane แล้ว oxidize methadone ไปเป็น benzophenone มีการดูดกลืนแสงที่ higher UV molar absorbance Benzophenone สามารถนำไปวิเคราะห์โดย Gas liquid chromatography ได้ ส่วน underivertized drug และ เมทาบอไลท์ สามารถนำมาสกัด และนำสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์โดย GC

วิธีวิเคราะห์ที่มีขั้นตอนซับซ้อนและและต้องใช้เครื่องมือพิเศษ

ใช้หลักการของภูมิคุ้มกันวิทยา (immunoassay) เช่น EMIT สามารถวิเคราะห์สิ่งตังอย่างได้โดยตรง

Methylphenidate และ Ritalinic

สกัด Methylphenidate จากปัสสาวะ แล้วหาปริมาณโดย GC principle metabolite ของ methylphenidate คือ ritalinic acid จะถูก methylate เป็น methylphenidate ซึ่งสามารถหาปริมาณได้ด้วยวิธีเดียวกัน

Morphine

วิธีวิเคราะห์ที่มีขั้นตอนไม่ซับซ้อนและไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ

สกัดมอร์ฟีน (Morphine) จากสิ่งตัวอย่างด้วย mixed organic solvent ซึ่งจะทำให้ pH เป็น 8.5 - 9.0 สารที่สกัดได้จะถูกทำให้แห้ง เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไป ปรับ pH ให้เป็น 9 - 10 โดยเติมน้ำกลั่น และ NH_4OH เข้มข้น แล้วนำเข้า autoclave เราสามารถวัดปริมาณ morphine fluorophore โดยวิธี Spectrophotofluorometry

วิธีวิเคราะห์ที่มีขั้นตอนซับซ้อนและและต้องใช้เครื่องมือพิเศษ

หาปริมาณมอร์ฟีน (morphine) ที่สกัดออกมา โดยวิธี GC มอร์ฟีน เป็น เมทาบอไลท์ ของ เฮโรอีน และ โคเดอีน จะถูกขับออกมาในปัสสาวะในรูปของ glucoronides ซึ่งละลายน้ำได้ดีมากและสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ได้ยากมาก ดังนั้นเราจึงสามารถสกัด unconjugated opiates (free morphine และ codeine) ได้ง่าย ยาที่ถูกขับออกมาจากร่างกายจะอยู่ในรูป glucoronides มากกว่า 90% มีเพียงส่วนเดียวเท่านั้นที่จะขับออกมาในรูป free form

การ Hydrolysis ด้วย acid catalysis จะกำจัด glucoronides group ออกไป แล้วสกัด unconjugated opiates ด้วย organic solvents Morphines และ Codeine เป็น amphoteric compound สามารถสกัดออกมาได้ที่ pH 9 Opiates เป็นสารโมเลกุลใหญ่จึงวิเคราะห์โดย GC ยาก จึงต้องเปลี่ยน Morphine และ Codeine เป็น acetate derivatives โดยทำปฏิกิริยากับ acetic anhydride ใน pyridine ทำให้สามารถวิเคราะห์โดย GC ได้ง่ายโดยใช้ column 3% OV - 25 และ 3% Poly - A 103 การใช้ column 2 ชนิดเพื่อกำจัด false positives และ ใช้ nalorphine เป็น internal standard เพื่อกำจัดผลลบเทียม (false negatives) และทำให้ได้ผลที่แม่นยำมาก

วิธีวิเคราะห์ที่มีขั้นตอนซับซ้อนและและต้องใช้เครื่องมือพิเศษ

ใช้หลักการของ immunoassay เช่น EMIT สามารถวิเคราะห์ได้จากสิ่งตัวอย่างโดยตรง

Barbiturates

บาบิทูเรท ถูกจัดอยู่ในประเภทยานอนหลับ ออกฤทธิ์เป็นยาระงับประสาท หรือ analgesics (painkillers) การตรวจหาบาบิทูเรทมีทั้ง Qualitative และ Quantitative

- Qualitative method

1. Extraction and colorimetric reaction

สกัดบาบิทูเรทจากกรดอ่อน และทำให้เป็นสารประกอบ กับ Hg^{2+} ทำปฏิกิริยากับ diphenylthiocarbazone เกิดเป็นสารสีส้ม แต่วิธีนี้ไม่จำเพาะกับบาบิทูเรท

2. Extraction and Ultraviolet Spectroscopy

สกัดบาบิทูเรท ให้ปราศจากสารประกอบอื่น ๆ ที่สามารถดูดกลืนแสง UV นำสารที่สกัดได้มาหาปริมาณโดย UV spectrum

3. Ultraviolet difference spectroscopy

เหมือนวิธีที่ 2 แต่นำเอาบาบิทูเรท ที่สกัดได้แบ่งเป็น 2 ส่วน นำมาหาปริมาณดูความแตกต่างระหว่าง Spectra ที่ pH > 13 และที่ pH 10.5

4. TLC

นำบาบิทูเรทที่สกัดได้มาทำ TLC ดูค่า R_f และการทำปฏิกิริยากับสี จะบอกได้ว่าเป็น บาบิทูเรท

5. GC

นำบาบิทูเรทที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วย GC แล้วเปรียบเทียบค่า retention time จะสามารถทราบได้ว่ามี บาบิทูเรท หรือไม่

6. GC/MS

เหมือนวิธีที่ 5 แต่ใช้ MS detector

7. EMIT

Competitive binding assay ใช้ Antibody ซึ่งมี Specificity กว้างสามารถทำปฏิกิริยากับ barbiturates ได้หลายตัว

Quantitative method

1. Ultraviolet spectroscopy

บาบิทูเรทที่สกัดได้จะมีปริมาณการดูดกลืนแสงแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของยา

2. Differential ultraviolet spectroscopy

นำบาบิทูเรทที่สกัดได้มาวัดการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกันระหว่าง ที่ pH > 13 และ pH 10.5 วิธีนี้ จำเพาะกว่าวิธีที่ 1

3. GC

บาบิทูเรทที่สกัดได้จะถูกทำให้เป็น alkylated derivatives เช่น dimethylphenobarbital แล้วดู Retention time

4. HPLC

นำบาบิทูเรทที่สกัดได้มาวิเคราะห์โดย HPLC และหาปริมาณโดย ดัชนีหักเห หรือ ค่าการดูดกลืนแสง

Cannabinolds

สารที่เป็น psychoactive ที่สำคัญคือ Δ^9 - tetrahydrocannabinol (Δ^9 - THC) ซึ่งจะถูก metabolize เป็น 11 - nor - Δ^9 - tetrahydrocannabinol - 9 - carboxylic acid (Δ^9 - THC - COOH) และถูกขับออกมาในปัสสาวะในรูปอิสระ และ conjugated form การวิเคราะห์ส่วนใหญ่จะใช้ปัสสาวะ โดยตรวจหาเมทาบอไลท์ของ Δ^9 - THC - COOH

การตรวจวัด Δ^9 - THC - COOH ต้องใช้วิธี Screening และ Confirmation method ซึ่งมักใช้วิธี GC/MS หรือใช้ 5' - d3 - 11 - nor - Δ^9 - tetrahydrocannabinol - 9 - carboxylic acid เป็น internal standard ส่วนวิธีอื่นที่ใช้ตรวจหา และ ยืนยัน คือ homogeneous enzyme immunoassay (EMIT), RIA, TLC, GC, และ HPLC

การพัฒนาการตรวจสอบยาขับปัสสาวะ

นอกจากวิธีที่กล่าวมานี้แล้วยังมีการใช้ HPLC ในการตรวจหาและยืนยันด้วย GC/MS อีกด้วย

การพัฒนาการตรวจสอบอะแนบอลิกสเตอรอยด์ในปัสสาวะ

● ได้มีผู้ทำการพัฒนาการวิเคราะห์อะแนบอลิกสเตอรอยด์ในทางเภสัชวิทยาด้วยวิธีทางโครมาโทรกราฟี (18)

●พัฒนาการวิเคราะห์อะแนบอลิคสเตอรอยด์ โดยใช้ short - column GC/MS โดยไม่ต้องเตรียมอนุพันธ์ (เป็นวิทยานิพนธ์) (19,20)

●วิเคราะห์อะแนบอลิกสเตอรอยด์โดยใช้เทคนิค Gas - Chromatographic Mass-Spectrometric (21,22,23) และเทคนิค GC/MS with Selected Ion Monitoring (24) และมีผู้

●วิเคราะห์ 19 - Nortestosterone Phenylpropionate ในปัสสาวะของม้าซึ่งเป็นอะแนบอลิกสเตอรอยด์ตัวหนึ่งโดยใช้เทคนิค Gas - Chromatographic Mass- Spectrometric (25) และพัฒนาการวิเคราะห์ Testosterone Phenylpropionate ในปัสสาวะของม้า โดยใช้เทคนิค Gas - Chromatographic Mass- Spectrometric (26) และ

●ตรวจหาอะแนบอลิกสเตอรอยด์ โดยใช้วิธี Coulometric (27) และมีผู้พัฒนาการวิเคราะห์อะแนบอลิกสเตอรอยด์โดยใช้เทคนิค Isocratic Reversed Phase HPLC on Silica (28) และเทคนิค Liquid - Chromatography with Identity Confirmation by Mass - Spectrometry or Infrared Spectrophotometry (29)

●พัฒนาการวิเคราะห์ 17 - Hydroxy Anabolic - Steroids โดยใช้เทคนิค Liquid - Chromatographic และ Spectral - Analysis (24) และมีการพัฒนาการวิเคราะห์อะแนบอลิกสเตอรอยด์ โดยวิธี Liquid - Chromatography แล้วตรวจยืนยันด้วย Mass - Spectrometry หรือ Infrared Spectrophotometry (30) และใช้เทคนิค High Performance Liquid - Chromatography เพื่อวิเคราะห์หาอะแนบอลิกสเตอรอยด์ในเนื้อเยื่อ (31)

●พัฒนาการตรวจหาอะแนบอลิกสเตอรอยด์ 19 - Nor - Testosterone โดยใช้เทคนิค GC - Sim -MS (32)

●หาผลของ Biological Matrix กับอัตราส่วนของ Testosterone และ Epitestosterone โดยใช้ Gas - Chromatography Mass - Spectometry (33) และมีผู้ใช้เทคนิค Electron Capture Negative Ionization Mass Spectrometry กับ Steroids และสารที่เป็น Electrophilic คล้าย ๆ กัน (34) และมีผู้พัฒนาเทคนิค Reverse Phase HPLC สำหรับใช้วิเคราะห์ยาที่เป็น ด่าง, กลาง และ กรด โดยทำให้เป็นอนุพันธ์ของซิลิกา (Silica) ซึ่งสามารถวิเคราะห์อะแนบอลิกสเตอรอยด์ได้ด้วย (35)

การพัฒนาการวิเคราะห์สารปิดกั้นบีตา

นอกจากวิธีที่กล่าวมานี้ยังมีผู้วิเคราะห์ยาปิดกั้นบีตาโดยใช้ High Performance Liquid - Chromatography อีกด้วย (36)

Propranolol

- Propranolol จะถูกสกัดในอีเธอร์ และสกัดซ้ำใน กรดเจือจาง ทำให้เป็น alkaline แล้วสกัดด้วยอีเธอร์แล้วนำมาสกัดซ้ำอีกในกรดเจือจาง หาปริมาณของ Propranolol โดยวัดการดูดกลืน UV ของ acid extract ที่ 288.5 นาโนเมตร