การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลท์ต่างๆ ในปัสสาวะโดยเทคนิคลิควิดโครมาโทรกราฟฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี/แมสสเปคโตรเมตรี

โดย
นางสาวกรรณิกาญจน์ ศิขิวัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลท์ต่างๆ ในปัสสาวะโดยเทคนิคลิควิดโครมาโทรกราฟฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี/แมสสเปคโตรเมตรี

โดย
นางสาวกรรณิกาญจน์ ศิขิวัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

QUANTITATIVE ANALYSIS OF AMPHETAMINES, KETAMINE AND THEIR METABOLITES IN URINE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS)

By

MISS Kannikan SIKIWAT

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (FORENSIC SCIENCE)

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2018

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลท์ต่างๆ ในปัสสาวะโดยเทคนิคลิควิดโครมาโทรกราฟฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี/แมสสเปคโตรเมตรี
โดย	กรรณิกาญจน์ ศิขิวัฒน์
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	อาจารย์ ดร. ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(อาจารย์ ดร. ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยุภาพร สมีน้อย)

58312304 : นิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : แอมเฟตามีน เคตามีน ปัสสาวะ

นางสาว กรรณิกาญจน์ ศิขิวัฒน์: การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลท์ต่างๆ ในปัสสาวะโดยเทคนิคลิควิดโครมาโทรกราฟฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี/ แมสสเปคโตรเมตรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อาจารย์ ดร. ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี

ปัจจุบันสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เช่น ยาบ้า ยาอี ยาเลิฟ รวมทั้งเคตามีน และเฟนเทอร์มีน ถือเป็นกลุ่มยาและสารเสพติดที่มักนิยมกันในประเทศไทย สำหรับด้านนิติวิทยาศาสตร์การตรวจพิสูจน์หาปริมาณยาและสารเสพติดในปัสสาวะมีความสำคัญมาก เนื่องจากผลการตรวจพิสูจน์สามารถนำมาประกอบการพิจารณาคดีของผู้กระทำความผิด และสามารถประกอบการหาสาเหตุการเสียชีวิตได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาและสารเสพติดจำนวน 8 ชนิด ในปัสสาวะโดยอาศัยเทคนิคลิควิดโครมาโทรกราฟฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี/แมสสเปคโตรเมตรี (LC-MS/MS) การวิเคราะห์ใช้ตัวอย่างปัสสาวะ 100 ไมโครลิตร ผ่านกระบวนการสกัดด้วยตัวทำละลาย ระเหยแห้ง และละลายกลับด้วย mobile phase แล้ววิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS สำหรับการแยกทาง Chromatographic อาศัยคอลัมน์ Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 mm × 100 mm, 2.7µm particle size และการวิเคราะห์สำหรับ Mass spectrometric อาศัย electrospray ionization แบบ positive-ion และโหมด multiple reaction monitoring (MRM) ด้วยการใช้ collision energy ที่เหมาะสมกับสารแต่ละชนิด การศึกษาสามารถหาปริมาณยาและสารเสพติดได้ในช่วง 50-1500 ng/mL เทคนิคนี้มีผลการวิเคราะห์ตามพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ มีค่า LOD คือ 2 5 10 และ 15ng/mL LLOQ คือ 50 ng/mL ความเป็นเส้นตรง (r^2) มีค่ามากกว่า 0.99 ในสารทุกๆชนิด สำหรับค่า within-precision และ between-precision (%RSD) คือ 1.5 ถึง 19.4 และ 1.1 ถึง 9.5ตามลำดับ ไม่มีผลของการปนเปื้อนข้ามตัวอย่าง เมทริกซ์ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ ยกเว้น Nor-ketamine และ Phentermine ที่ความเข้มข้นต่ำๆ นอกจากนี้ยาและสารเสพติดมีความเสถียรที่อุณหภูมิห้องตั้งแต่ต้นถึง 30 ชั่วโมง การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์นี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับตัวอย่างปัสสาวะได้จริง จากตัวอย่างทดสอบทั้งหมด 28 ตัวอย่าง ที่ได้สนับสนุนจากกลุ่มตรวจพิสูจน์ทางเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ ได้ผลการวิเคราะห์ที่เปรียบเทียบกับเทคนิค GC-MS ที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และด้วยประสิทธิภาพที่สูงกว่า คือ ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยกว่า เวลาวิเคราะห์สั้น มีความถูกต้อง แม่นยำสูง ดังนั้น จึงสามารถใช้เทคนิค LC-MS/MS นี้แทนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

58312304 : Major (FORENSIC SCIENCE)
Keyword : Amphetamines Ketamine Urine LC-MS/MS

MISS KANNIKAN SIKIWAT : QUANTITATIVE ANALYSIS OF AMPHETAMINES, KETAMINE AND THEIR METABOLITES IN URINE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS) THESIS ADVISOR : SUPACHAI SUPALAKNARI, Ph.D.

Amphetamines, MDMA, MDEA, Ketamine and Phentermine have been the most commonly abused drugs in Thailand. Quantitative analysis of drugs in urine has the important for prove in forensic science. The concentration of abuse in urine sample can be taken for inquest of suspect and determine the suspect's cause of death. This study aimed to evaluate a more effective approach to simultaneously quantify these 8 analytes in urine by Liquid Chromatography-Tandem Mass spectrometry (LC-MS/MS). Samples (100 uL) were extracted via liquid-liquid extraction, evaporated and reconstituted in the mobile phase for injection into the LC–MS-MS. Chromatographic separation by an the Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 mm × 100 mm, 2.7μm particle size and mass spectrometric analysis was performed by electrospray ionization in positive-ion multiple reaction monitoring mode with optimized collision energy for each analytes. This method used to quantitate abused drug and their metabolites with range 50–1,500 ng/mL. Analytical parameters evaluated and resulting data are as follows: (i) LOD was 2, 5, 10 and 15ng/mL; (ii) LLOQ was 50ng/ml; (iii) calibration linearity (r^2) for all analytes was >0.99; (iv) within-precision and between-precision (%RSD) were 1.5-19.4% and 1.1 -9.5 % respectively. No effect of carryover and matrix effect except for Nor-ketamine and Phentermine at low concentrations. The analytes were stable at room temperature for 30 h. This method was successfully applied to the analysis of specimens collected from 13 unknown death cases and 15 known cases from Forensic Chemistry section, Central of Situation of Forensic Science, and the results comparison with reference GC-MS were not significantly different. The LC–MS/MS analysis was as high efficiency (less samples, short time, precise and accurate) In conclusion; the LC–MS/MS method is robust, reliable and can be used instead.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความกรุณาของอาจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง และขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ ในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนช่วยแนะนำแก้ไข ตรวจทานข้อบกพร่องต่างๆ วิทยานิพนธ์เล่มนี้ จนเสร็จสมบูรณ์ด้วยดี และขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยุภาพร สมีน้อย ที่กรุณาสละเวลามาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิ

ขอขอบคุณ คุณสุปราณี พันธะทัน หัวหน้ากลุ่มตรวจพิสูจน์ทางเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ สนับสนุนเครื่องมือ สารมาตรฐาน สารเคมีต่างๆ และตัวอย่างปัสสาวะ รวมทั้งให้คำแนะนำการทดลองในวิทยานิพนธ์ คอยเป็นที่ปรึกษา ในการพัฒนาวิธี นอกจากนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกคนของกลุ่มตรวจพิสูจน์ทางเคมี ที่เป็นกำลังใจในการวิจัย

สุดท้ายขอขอบคุณบิดา มารดา แฟนที่เป็นกำลัง และเป็นแรงผลักดันให้สามารถทำวิทยานิพนธ์ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

กรรณิกาญจน์ ศิขิวัฒน์

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูปภาพ ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

ที่มาและความสำคัญของปัญหา 1

ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา 2

สมมติฐานของการศึกษา 3

ขอบเขตการศึกษา 3

ขั้นตอนของการศึกษา 3

นิยามศัพท์เฉพาะ 5

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5

บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 6

ยาเสพติด 6

การตรวจสารเสพติดในปัสสาวะ 8

ค่า cut-off ของสารเสพติดในปัสสาวะ 9

องค์ประกอบและหลักการทำงานของ HPLC 10

องค์ประกอบของเครื่อง LC/MS 11

รูปแบบในการสแกนใน tandem mass spectrometry 13

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ)method validation) 14
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 19
ขอบเขตของตัวอย่าง 19
เครื่องมือและอุปกรณ์ 19
สารเคมี 20
การเตรียมสารละลาย 21
ขั้นตอนการดำเนินการ 21
บทที่ 4 ผลการวิจัย 27
สภาวะของเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์ 27
สภาวะของการเตรียมตัวอย่าง 36
การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี 40
ผลการประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้น 59
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย 62
ข้อเสนอแนะ 63
รายการอ้างอิง 66
ประวัติผู้เขียน 68

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ช่วงเวลาที่มีโอกาสตรวจพบสารเสพติดในปัสสาวะ แบ่งตามชนิดของสารเสพติดและลักษณะการเสพ	8
ตารางที่ 2ชนิดสารเสพติด สารสำคัญ สารเมตาบอไลต์ และสารที่ตรวจพบได้ในปัสสาวะ	9
ตารางที่ 3ชนิดสารเสพติด ประเภทยาเสพติดให้โทษ และเกณฑ์ตัดสิน	9
ตารางที่ 4 ผลการศึกษาชนิดของ Mobile phase	27
ตารางที่ 5 ผลการศึกษาความเข้มข้นของ Mobile phase	29
ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ Gradient program A	30
ตารางที่ 7 ผลการทดสอบ Gradient program B	32
ตารางที่ 8 ผลการทดสอบ Gradient program C	33
ตารางที่ 9 สรุปสภาวะของ Chromatogram ที่ใช้ในการศึกษา	34
ตารางที่ 10 สรุปสภาวะของ Mass spectrometer ที่ใช้ในการศึกษา	34
ตารางที่ 11 transition และ collision energy ที่เหมาะสมกับแต่ละ precursor ion	35
ตารางที่ 12 เปรียบเทียบผลประสิทธิภาพการสกัดของการใช้ปริมาณตัวอย่างปัสสาวะที่ 100uL	36
ตารางที่ 13 เปรียบเทียบผลประสิทธิภาพการสกัดของการใช้ปริมาณตัวอย่างปัสสาวะที่	37
ตารางที่ 14 ผลการศึกษาเปรียบเทียบค่า Recovery ระหว่างการใช้ตัวทำละลายเป็น	38
ตารางที่ 15 รายชื่อยาและสารเสพติดจำนวน 200 ชนิด ที่ความเข้มข้น 40ng/mL	41
ตารางที่ 16 ผลการทดสอบ %Ionization suppression / enhancement	43
ตารางที่ 17 ผลการทดสอบ %Ionization suppression / enhancement	44
ตารางที่ 18 สรุปค่า LOD ของการตรวจวิเคราะห์ยาและสารเสพติดโดยเทคนิค LC/MS/MS	45
ตารางที่ 19 Chromatogram แสดงค่า S/N ของ ค่า LOD	45
ตารางที่ 20 ผลการศึกษา accuracy และ precision สำหรับ LLOQ (n=15)	47
ตารางที่ 21 ช่วงความเป็นเส้นตรงของยาและสารเสพติด ชนิด 8	48

ตารางที่ 22ค่า between-day precision และ accuracy การตรวจวิเคราะห์ ปริมาณยาและสารเสพติดในปัสสาวะ (n=21) 53

ตารางที่ 23 ค่า within-day precision และ accuracy การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ยาและสารเสพติดในปัสสาวะ (n=4) 54

ตารางที่ 24ข้อมูลการทดสอบ stability ที่ เวลาต่างๆ ของสารมาตรฐาน ยาและสารเสพติดในปัสสาวะที่ความเข้มข้น 50ng/mL ณ เวลา เริ่มต้น ถึง 30 ชั่วโมง 57

ตารางที่ 25 ข้อมูลการทดสอบ stability ที่ เวลาต่างๆ ของสารมาตรฐาน 58

ตารางที่ 26 ผลการทดสอบความถูกต้อง แม่นยำของยาและสารเสพติดที่ทราบค่าแน่นอนที่ความเข้มข้นต่างๆ 59

ตารางที่ 27 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS กับเทคนิค GC-MS 60

ตารางที่ 28 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติระหว่าง 2 วิธี ด้วย paired t-test 60

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1ส่วนประกอบสำคัญของเครื่อง HPLC 10

รูปที่ 2ไดอะแกรมของ Quadrupole analyzer 12

รูปที่ 3 เครื่อง LC/MS/MS ของบริษัท Agilent Technologies 20

รูปที่ 4TIC ของ analyte แต่ละชนิด ที่ใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10mM 28

รูปที่ 5 TIC ของ analyte แต่ละชนิด ที่ใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 5mM 28

รูปที่ 6 TIC ของ Gradient program A 30

รูปที่ 7 TIC ของ Gradient program B 31

รูปที่ 8 TIC ของ Gradient program C 33

รูปที่ 9 TIC ของการทดสอบ Specificity 41

รูปที่ 10 TIC ของการทดสอบ Selectivity 42

รูปที่ 11 Calibration curve ของยาและสารเสพติดแต่ละชนิด 48

รูปที่ 12Chromatogram ของการศึกษา carryover ของสารแต่ละชนิด 55

รูปที่ 13 ตัวอย่างยาและสารเสพติดที่ยังคงมีความเสถียรเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้องตั้งแต่เริ่มเริ่มต้นเป็นเวลา 6 ชั่วโมง 58

รูปที่ 14 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น Amphetamine (ng/ml) ของวิธี LC-MS/MS (แกนy) และวิธี derivatization GC-MS (แกนx) 61

รูปที่ 15 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น Methamphetamine (ng/ml) ของวิธี LC-MS/MS (แกนy) และวิธี derivatization GC-MS (แกนx) 61

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันปัญหายาเสพติดกำลังแพร่ระบาดและขยายไปทั่วประเทศมากขึ้น ก่อให้เกิดปัญหาทางสังคมขึ้นมามากมาย เช่น ปัญหาอาชญากรรม ปัญหาเยาวชนติดยาเสพติด เป็นต้น นอกจากนี้ยาเสพติดยังเป็นภัยร้ายแรงต่อสุขภาพจิตและสุขภาพกาย ทำให้สุขภาพทรุดโทรมอ่อนแอ ความจำเสื่อม เสียบุคลิกภาพ และส่งผลกระทบต่อสังคม เศรษฐกิจ บั่นทอนความเจริญของประเทศชาติ

ยาเสพติด มีหลายประเภท ได้แก่ ฝิ่น เฮโรอีน ทินเนอร์ กัญชา ยาบ้า ยาอี สาระเหย กระท่อม และยากระตุ้นประสาท เป็นต้น การตรวจหาสารเสพติดในร่างกายของผู้เสพ สามารถใช้ตัวอย่างชีววัตถุหลายชนิด เช่น ปัสสาวะ ซีรั่ม เส้นผมเป็นต้น ปัสสาวะเป็นตัวอย่างชีววัตถุที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายและเป็นที่ยอมรับในกระบวนการยุติธรรมในระดับสากล ข้อดีของการใช้ตัวอย่างปัสสาวะ คือ เป็นตัวอย่างที่สามารถเก็บได้ง่าย เมื่อเทียบกับสารชีววัตถุอื่นๆ และสามารถเก็บตัวอย่างในปริมาณมากได้ ทำให้มีตัวอย่างเพียงพอที่จะใช้ในการตรวจ

การตรวจสารเสพติดในร่างกาย ของกลุ่มบุคคลเพื่อทดสอบว่ามีสารเสพติดในร่างกายหรือไม่ มีหลายวิธี เช่น การตรวจวิเคราะห์เบื้องต้น ด้วยเทคนิค Immunoassay method ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก สามารถคัดแยกตัวอย่างจำนวนมาก ได้ในระยะเวลาสั้นๆ และราคาถูก แต่ยังคงมีข้อจำกัดของค่าเกณฑ์การตัดสินผลบวก (Cut-off) ที่สูง ทำให้อาจเกิดผลการวิเคราะห์เป็นผลลบลวง (false negative) ได้ ถ้าตัวอย่างจากการตรวจวิเคราะห์เบื้องต้นให้ผลบวก ถือได้ว่าอาจมีสารเสพติดผสมอยู่ จึงนำไปสู่ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ยืนยันผล ด้วยเทคนิคที่ความถูกต้องมากขึ้น เช่น การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตรเมตรี (GC-MS) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถแยก และตรวจสอบสารเสพติดได้หลายชนิด รวมทั้งเมตาบอไลท์ต่างๆด้วย นอกจากนี้ยังมีความไว และความจำเพาะเจาะจงสูง อย่างไรก็ตาม การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตรเมตรี (GC-MS) ยังต้องอาศัยกระบวนการ Derivatization โดยการทำปฏิกิริยากับสารอนุพันธุ์ TFA หรือ PFPA ซึ่งเข้าไปแทนที่ไฮโดรเจนของเอมีน (Amine) เพื่อเพิ่มขนาดโมเลกุล เพิ่มความจำเพาะเจาะจง และเพิ่มความไว (selectivity และ sensitivity) ซึ่งกระบวนการ Derivatization มีราคาแพง ใช้ระยะเวลานาน นอกจากนี้สารอนุพันธุ์ TFA หรือ PFPA มีอันตรายต่อสุขภาพด้วย

จากประกาศคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด เรื่อง กำหนดหลักเกณฑ์วิธีการและ เงื่อนไขการตรวจหรือทดสอบว่าบุคคลหรือกลุ่มบุคคลใด มีสารเสพติดอยู่ในร่างกายหรือไม่ ประกาศ ณ วันที่ ๑๑ กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๔๓ ได้กำหนดให้ถือเกณฑ์การตัดสินผลการตรวจพิสูจน์ว่าเป็นผู้มีสารเสพติดในร่างกาย ดังต่อไปนี้

1. กลุ่มแอมเฟตามีน (Amphetamines) และกลุ่ม MDMA (ยาอี) เมื่อตรวจพบว่ามีสารดังกล่าวอยู่ในปัสสาวะตั้งแต่ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ขึ้นไป

ด้วยเหตุผลข้างต้นผู้วิจัยจึงศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารเสพติดกลุ่ม แอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลท์ต่างๆ ซึ่งมีการแพร่ระบาดมากในประเทศไทย โดยอาศัยเทคนิคลิควิดโครมาโทรกราฟฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี/ แมสสเปคโตรเมตรี (LC-MS/MS) ที่ได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้านนิติพิษวิทยา เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ คือ มีความแม่นยำ สะดวก รวดเร็ว และไม่ต้องอาศัยกระบวนการ Derivatization

งานวิจัยนี้จึงนำเทคนิค LC-MS/MS มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลท์ต่างๆในปัสสาวะ โดยการศึกษามีวัตถุประสงค์ คือ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ ให้ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยลง ด้วยการสกัดแบบ liquid-liquid extraction สามารถข้ามขั้นตอน Derivatization เพื่อลดเวลาในการเตรียมตัวอย่าง ศึกษาสภาวะของเครื่องมือ LC-MS/MS ที่เหมาะสม เช่น Gradient program Detection เป็นต้น รวมทั้งตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีในพารามิเตอร์ต่างๆ และประยุกต์ใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น กับตัวอย่างปัสสาวะที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจากกลุ่มตรวจพิสูจน์ทางเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์

ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อพัฒนาวิธีและศึกษาสภาวะในการเตรียมตัวอย่าง สภาวะของเครื่องมือที่เหมาะสมของการตรวจวิเคราะห์สำหรับหาปริมาณสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลท์ในปัสสาวะ โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทรกราฟฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี/ แมสสเปคโตรเมตรี

2. เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์สำหรับหาปริมาณสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลท์ในปัสสาวะ โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทรกราฟฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี/ แมสสเปคโตรเมตรี

3. เพื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจวิเคราะห์สำหรับหาปริมาณสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลท์ในปัสสาวะ โดยเทคนิคลิควิดโครมาโทรกราฟฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี/ แมสสเปคโตรเมตรี กับการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้ในงานประจำ

สมมติฐานของการศึกษา

สามารถตรวจวิเคราะห์สารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลท์ในตัวอย่างปัสสาวะด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทรกราฟฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี/ แมสสเปคโตรเมตรี ได้ โดยใช้ปริมาณตัวอย่างและเวลาการวิเคราะห์ที่น้อยลง และสามารถประยุกต์ใช้กับตัวอย่างจริงได้

ขอบเขตการศึกษา

1. ชนิดสารเสพติดที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่

Methamphetamine
Amphetamine
3,4-methylenedioxy-N-methylamphe-tamine (MDMA)
3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA),
3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine (MDEA),
Phentermine
Ketamine,
Norketamine

2. ตัวอย่างปัสสาวะที่ใช้ในการศึกษา

ปัสสาวะที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Blank urine) จำนวน 10 แหล่งๆละ 50 ml

ขั้นตอนของการศึกษา

1. กำหนดปัญหาการวิจัย
2. กำหนดกรอบแนวคิด
3. ทบทวนวรรณกรรมและเอกสารที่เกี่ยวข้อง
4. ออกแบบงานวิจัย และขั้นตอนการวิจัย
5. รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลการวิจัย
6. รายงานผลการวิจัย

วิธีการศึกษา

1. สถานที่

กลุ่มตรวจพิสูจน์ทางเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม
อาคารสุขประพฤติ ชั้น 16 ถ.ประชาชื่น แขวงบางซื่อ เขตบางซื่อ กรุงเทพมหานคร

มหาวิทยาลัยศิลปากร

2. เครื่องมือในการตรวจวิเคราะห์สำหรับหาปริมาณสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลท์ต่างๆ ในตัวอย่างปัสสาวะ

เครื่องมือ LC/MS/MS ของบริษัท Agilent Technologies	
Liquid Chromatogram	รุ่น 1260 Infinity
Mass Spectrometer	ยี่ห้อ Agilent รุ่น 6495 Triple Quad

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ โดยการสกัดแบบ liquid-liquid extraction

4. ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ด้วยพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

4.1 ความจำเพาะ (Selectivity/Specificity)

4.2 ผลของเมทริกซ์ (Matrix Effect)

4.3 ความถูกต้อง (Accuracy)

4.4 ความแม่นยำ (Precision)

4.5 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

4.6 ขีดจำกัดการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

4.7 ขีดจำกัดการตรวจพบเชิงปริมาณ (Limit of Quantitative, LOQ)

4.8 ความเสถียร (Stability)

4.9 Carryover

5. ประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างที่ทราบค่า (Known samples) และศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องลิควิดโครมาโทรกราฟฟี/ แมสสเปคโตรเมตรี/ แมสสเปคโตรเมตรี ดำเนินการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ เช่น Standard deviation, Coefficient of Variation, Mean เป็นต้น

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. ความถูกต้อง (Accuracy) หมายถึง ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่วัดได้ใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุด

2. ความแม่นยำ (Precision) หมายถึง ความแม่นยำในการวิเคราะห์ซ้ำๆหลายๆครั้ง ความแตกต่างที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำๆนี้มักมักแสดงเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard derivation, SD) หรือสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variance, CV)

3. ความจำเพาะ (Selectivity) หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารที่ต้องการได้อย่างถูกต้อง และสามารถแยกเฉพาะเจาะจงสำหรับสารที่สนใจออกจากสารประกอบอื่นในตัวอย่าง

4. ความเป็นเส้นตรง (Linearity) หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่ทำให้วิเคราะห์แล้วได้ผลการวิเคราะห์ที่เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด

5. ขีดจำกัดการตรวจพบ (Limit of detection, LOD) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำของสารที่สามารถตรวจพบได้

6. ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of Quantitation, LOQ) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ซึ่งสามารถหาปริมาณได้โดยมีความแม่นยำและความเที่ยงเป็นที่ยอมรับ

7. Carryover หมายถึงความสามารถของวิธีในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงแล้วไม่เกิดปนเปื้อนข้ามของยาในตัวอย่าง

8. ความเสถียร (Stability) หมายถึง ความเสถียรของสารที่ต้องการวิเคราะห์ในตัวอย่างภายหลังการเก็บรักษาในช่วงเวลาต่างๆ

9. Liquid-liquid extraction หมายถึง การสกัดด้วยตัวทำละลายสามารถทำได้โดยใช้ตัวทำละลายของเหลวชนิดหนึ่งสกัด ตัวถูกละลาย ออกจากของเหลวอีกชนิดหนึ่ง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ใช้เทคนิค Liquid chromatography-Tandem Mass spectrometry (LC-MS/MS) ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลท์ในปัสสาวะได้ โดยใช้ปริมาณตัวอย่างที่น้อยลง ลดระยะเวลาในการเตรียมตัวอย่าง และมีความถูกต้อง แม่นยำมากขึ้น

2. เป็นแนวทางสำหรับการศึกษางานวิจัยเกี่ยวกับนิติวิทยาศาสตร์ด้านอื่นๆ และเป็นฐานข้อมูลสำหรับผู้ที่สนใจต่อไป

3. นำไปประยุกต์ใช้เป็นวิธีการตรวจพิสูจน์หาปริมาณสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และ เมตาบอไลท์ในปัสสาวะ สำหรับงานด้านนิติวิทยาศาสตร์

บทที่ 2
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ยาเสพติด

ความหมายของยาเสพติดให้โทษ

จากพระราชบัญญัติ ยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 มาตรา 4 “ยาเสพติดใหโทษ” หมายความวา สารเคมีหรือวัตถุชนิดใดๆ ซึ่งเมื่อเสพเขาสูรางกาย ไมวาจะโดยรับประทาน ดม สูบ ฉีด หรือดวยประการใดๆ แลว ทำใหเกิดผลตอรางกายและ จิตใจ และสุขภาพโดยทั่วไป จะทรุดโทรมลง (สำนักยาและวัตถุเสพติดกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2558)

ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 5 ประเภท คือ

1. ยาเสพติดให้โทษ ประเภทที่ 1 ได้แก่ แอมเฟตามีน หรือ ยาอี ยาบ้า หรือยาเลิฟ เฮโรอีน แอลเอสดี

2. ยาเสพติดให้โทษ ประเภทที่ 2 ยาเสพติดที่นำมาใช้เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ ซึ่งต้องอยู่ภายใต้การควบคุมของแพทย์ และใช้เฉพาะกรณีที่จำเป็นเท่านั้น ได้แก่ ฝน มอร์ฟีน โคเคน หรือ โคคาอีน โคเคอีน และเมทาโดน

3. ยาเสพติดให้โทษ ประเภทที่ 3 ยาเสพติดประเภทนี้เป็นยาเสพติดให้โทษที่มียาเสพติดประเภทที่ 2 ผสมอยู่ด้วย มีประโยชน์ทางการแพทย์ การนำไปใช้เพื่อจุดประสงค์อื่น

4. ยาเสพติดให้โทษ ประเภทที่ 4 คือ สารเคมีที่ใช้ในการผลิตยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 1 หรือประเภทที่ 2 ยาเสพติดประเภทนี้ ไม่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดโรคแต่อย่างใด

5. ยาเสพติดให้โทษ ประเภทที่ 5 เป็นยาเสพติดให้โทษที่มิได้เข้าข่ายอยู่ในยาเสพติดประเภทที่ 1 ถึง 4

นอกจากนั้นยาเสพติดสามารถจำแนกประเภทตามเกณฑ์อื่นๆได้ดังนี้

1. จำแนกตามการออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท แบ่งเป็น 4 ประเภท

1.1 ประเภทกดประสาท ได้แก่ เฮโรอีน มอร์ฟีน ยานอนหลับ ฝิ่น ยาระงับประสาท ยากล่อมประสาท รวมทั้งสารระเหย เช่น แล็กเกอร์ ทินเนอร์ กาว น้ำมันเบนซิน เป็นต้น มักพบว่าผู้เสพติดมีร่างกาย ผอม เหลือง อ่อนเพลีย ฟุ้งซ่าน อารมณ์เปลี่ยนแปลงง่าย

1.2 ประเภทกระตุ้นประสาท ได้แก่ ยาบ้า ยาอี โคเคน กระท่อม เป้นต้น มักพบว่าผู้เสพติดจะ มีอาการ กระวนกระวาย หงุดหงิด จิตสับสนหวาดระแวง บางครั้งมีอาการคลุ้มคลั่ง หรือทำในสิ่งที่คนปกติไม่กล้าทำ

1.3 ประเภทหลอนประสาท ได้แก่ เห็ดขี้ควาย และ แอลเอสดี เป็นต้น ผู้เสพติดจะมีอาการ หูแว่ว ได้ยินเสียงประหลาด ประสาทหลอน หรือเห็นภาพหลอนที่น่าเกลียดน่ากลัว ควบคุมตนเองไม่ได้

1.4 ประเภทออกฤทธิ์ผสมผสาน คือ ทั้งกระตุ้นกดและหลอนประสาทร่วมกัน ผู้เสพติด มักมีอาการหูแว่ว ควบคุมตนเองไม่ได้ และป่วยเป็นโรคจิตได้

2. จำแนกตามแหล่งที่มาโดยแบ่งตามแหล่งที่เกิด ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

2.1 ยาเสพติดธรรมชาติ (natural drugs) คือ ยาเสพติดที่ผลิตมาจากพืช เช่น ฝิ่น มอร์ฟีน กระท่อม กัญชา เป็นต้น

2.2 ยาเสพติดสังเคราะห์ (synthetic drugs) คือ ยาเสพติดที่ผลิตขึ้นด้วยกรรมวิธีทาง เคมี เช่น เฮโรอีน แอมเฟตามีน ยาอี เอ็กซ์ตาซี เป็นต้น

การตรวจสารเสพติดในปัสสาวะ

การตรวจสารเสพติดในปัสสาวะมี 2 ขั้นตอน คือ การตรวจสารเสพติดเบื้องต้น และการตรวจสารเสพติดขั้นยืนยันผล

1. การตรวจสารเสพติดเบื้องต้น เป็นการตรวจเพื่อคัดแยกตัวอย่างที่คาดว่าจะมีสารเสพติดออกจากตัวอย่างที่ไม่มีสารเสพติด เมื่อขั้นตอนนี้ให้ผลการวิเคราะห์เป็นบวกต้องนำไปสู่ขั้นตอนการตรวจยืนยันผล

2. การตรวจยืนยันผล เป็นการตรวจยืนยันจากการตรวจเบื้องต้นอีกครั้งในห้องปฏิบัติการ ว่ามีสารเสพติดหรือไม่ โดยการตรวจด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี (chromatography) เช่น ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) แก๊สโครมาโทกราฟี (GC) แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโทเมทรี (GC-MS) ลิควิดโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโทเมทรี (LC-MS) เป็นต้น

การตรวจพบสารเสพติดในปัสสาวะ ขึ้นอยู่กับช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่าง ถ้าช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างใกล้เคียงกับช่วงเวลาที่เสพครั้งหลังสุดมากเกินไป มีโอกาสสูงที่จะตรวจไม่พบสารเสพติดในปัสสาวะ เนื่องจากสารเสพติดยังไม่ถูกขับออกจากร่างกาย นอกจากนั้นจะต้องทราบชนิดของสารเสพติดและสารเมตาบอไลต์ของสารเสพติดนั้นๆ ซึ่งเกิดขึ้นในกระบวนการเผาผลาญสารเสพติดของร่างกายทำให้สารเสพติดเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปและถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ช่วงเวลาที่มีโอกาสตรวจพบสารเสพติดในปัสสาวะ แบ่งตามชนิดของสารเสพติดและลักษณะการเสพ

ชนิดสารเสพติด	**ช่วงเวลาที่มีโอกาสตรวจพบสารเสพติดในปัสสาวะ**		
	ผู้เสพไม่ประจำ	**ผู้เสพประจำ**	**ผู้เสพเรื้อรัง**
แอมเฟตามีน	1-3 วัน	2-6 วัน	2-3 สัปดาห์
เมทแอมเฟตามีน	1-3 วัน	2-6 วัน	2-3 สัปดาห์
ยาอี	1-3 วัน	2-6 วัน	2-3 สัปดาห์
กัญชา	2-5 วัน	4-14 วัน	อาจนานถึง 2-3 เดือน
โคคาอีน	12-48 ชม.	1-4 วัน	อาจนานถึง 2-3สัปดาห์
มอร์ฟีน	12-48 ชม.	2-6 วัน	อาจนานถึง2-3 สัปดาห์
โคเดอีน	1-3 วัน	2-6 วัน	2-3 สัปดาห์
เบนโซไดอาซิปินส์	2-5 วัน	4-14 วัน	อาจนานถึง 1 เดือน

ตารางที่ 2 ชนิดสารเสพติด สารสำคัญ สารเมตาบอไลต์ และสารที่ตรวจพบได้ในปัสสาวะ

ชนิดสารเสพติด	**สารสำคัญ**	**สารเมตาบอไลต์**	**สารที่ตรวจพบได้ในปัสสาวะ**
ยาบ้า/ยาไอซ์	เมทแอมเฟตามีน	แอมเฟตามีน	เมทแอมเฟตามีน แอมเฟตามีน
ยาอี	3,4เมทิลลีนไดออกซีเมทแอมเฟตามีน(MDMA)	3,4 เมทิลลีนไดออกซีแอมเฟตามีน (MDA)	MDMA MDA
ยาเลิฟ	3,4 เมทิลลีนไดออกซีแอมเฟตามีน (MDA)	3,4 เมทิลลีนไดออกซีแอมเฟตามีน(MDA)	MDA
ยาเค	เคตามีน (Ketamine)	นอร์เคตามีน (Nor-ketamine)	Ketamine Nor-ketamine

ค่า cut-off ของสารเสพติดในปัสสาวะ

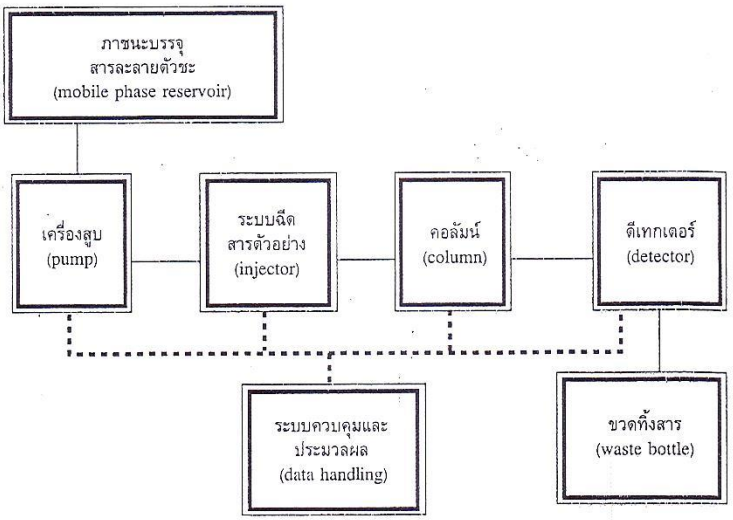
ค่าcut-off คือ ปริมาณต่ำสุดของสารเสพติดในปัสสาวะที่กฎหมายกำหนดและใช้เป็นเกณฑ์ตัดสินว่ามีสารเสพติดอยู่ในปัสสาวะหรือไม่ เกณฑ์ตัดสินว่ามีสารเสพติดอยู่ในปัสสาวะตามประกาศคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด เรื่องกำหนดหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการตรวจหรือทดสอบว่าบุคคล หรือกลุ่มบุคคลใดมีสารเสพติดอยู่ในร่างกายหรือไม่ พ.ศ. 2543 ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดสารเสพติด ประเภทยาเสพติดให้โทษ และเกณฑ์ตัดสิน

สารเสพติด/วัตถุออกฤทธิ์	**ประเภทยาเสพติดให้โทษ**	**เกณฑ์ตัดสิน (นาโนกรัม/มิลลิลิตร)**
กลุ่มแอมเฟตามีน (Amphetamines)	ยาเสพติดให้โทษประเภท 1	1000
กลุ่มยาอี (MDA, MDMA และ MDEA)	ยาเสพติดให้โทษประเภท 1	1000

องค์ประกอบและหลักการทำงานของ HPLC

ส่วนประกอบที่สำคัญของ HPLC แสดงในรูปที่ 1 หลักการทำงานของ HPLC คือ สารตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าเครื่องด้วยระบบฉีดสาร และสารละลายตัวชะจะนำพาสารตัวอย่างเคลื่อนที่เข้าสู่คอลัมน์ สารแต่ละชนิดจะผ่านเฟสด้วยระยะทางแตกต่างกัน ทำให้สารแยกออกจากกัน หลังจากนั้นก็จะเคลื่อนที่เข้าสู่ดีเทกเตอร์ต่อไป



รูปที่ 1 ส่วนประกอบสำคัญของเครื่อง HPLC

ที่มา: แม้น อมรสิทธิ์ และคนอื่นๆ. **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: ชวนพิมพ์ 50, 2555.

1. ภาชนะบรรจุสารละลายตัวชะ

การเตรียมสารละลายตัวชะ ต้องใช้สารเคมี หรือน้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง หรือสารเคมี reagent grade Chromatography grade deionized water

2. เครื่องสูบ (Pump)

ทำหน้าที่ดูดสารละลายตัวชะ จากภาชนะบรรจุเข้าสู่ระบบ คือ ส่วนฉีดสาร คอลัมน์ ดีเทกเตอร์ และผ่านท่อทิ้งสาร

3. ระบบฉีดสาร

ระบบฉีดสาร ทำหน้าที่นำสารละลายตัวอย่างเข้าคอลัมน์ ซึ่งมีหลายชนิด ได้แก่ Syringe injector ใช้ syringe ฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์โดยตรง และวาล์ว (sampling injector) เป็นวิธีฉีดสารที่จะ

หมุนชุดฉีดสารตัวอย่างให้อยู่ในตำแหน่ง load ใช้ syringe ดูดสารตัวอย่าง ฉีดสารเข้า sample loop สารตัวอย่างจะบรรจุใน loop จนเต็ม ส่วนที่เหลือจะล้นออกมา เมื่อต้องการสารเข้าสู่คอลัมน์ ให้หมุนวาล์วของตัวฉีดมาอยู่ในตำแหน่ง inject สารละลายตัวชะจะเคลื่อนที่พาสารตัวอย่างเข้าคอลัมน์ อีกชนิดหนึ่ง คือ เครื่องฉีดสารแบบอัตโนมัติ (automatic injector) เป็นการฉีดสารตัวอย่างแบบอัตโนมัติควบคุมการทำงานด้วยไมโครโพรเซสเซอร์ หรือคอมพิวเตอร์

4. คอลัมน์

คอลัมน์ที่ใช้ในเทคนิค HPLC ได้แก่

1. คอลัมน์ที่ใช้แยกสาร (analytical columns) เป็นคอลัมน์ที่ทำหน้าที่แยกสาร มีความยาว 10-35 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1-10 มม. สารที่บรรจุภายในคอลัมน์ขนาด 3-10 ไมครอน สารที่บรรจุแตกต่างกันขึ้นอยู่กับงานที่วิเคราะห์

2. การ์ดคอลัมน์ (guard column) มีขนาดสั้นต่ออยู่กับด้านหน้าของคอลัมน์ที่ใช้แยกสาร ภายในบรรจุด้วยอนุภาคเดียวกันกับสารที่บรรจุในคอลัมน์ที่ใช้แยกสาร และทำหน้าที่ช่วยยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์แยกสารโดยสามารถจับอนุภาคเล็กๆ และสารที่ยึดติดในคอลัมน์ได้ดี

5. ดีเทกเตอร์

ดีเทกเตอร์ เป็นส่วนประกอบของเครื่องมือที่ทำหน้าที่ตรวจวัดสัญญาณจากการวัดตัวอย่างเปรียบเทียบกับสัญญาณจากการวัดสารละลายตัวชะ

องค์ประกอบของเครื่อง LC/MS

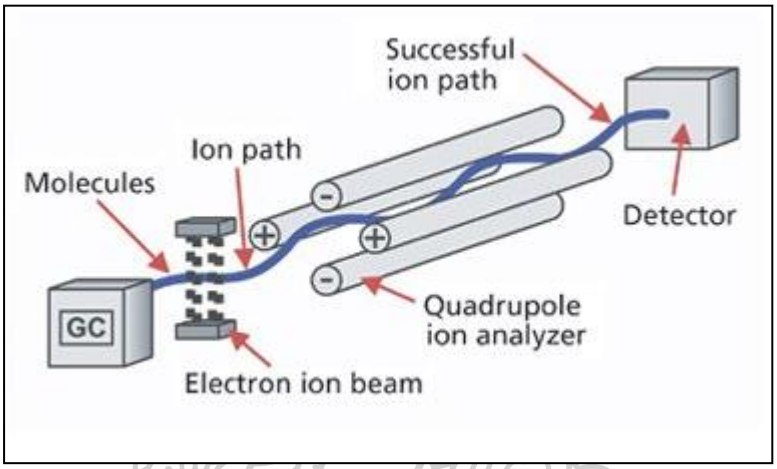
องค์ประกอบของเครื่อง LC/MS คือ ปั๊ม HPLC คอลัมน์ ionization interface และ mass spectrometer ที่ประกอบด้วยระบบสุญญากาศ focusing lens ตัววิเคราะห์มวล ตัวตรวจหาไอออน และระบบควบคุมเครื่องและเก็บ และประมวลผลข้อมูล ซึ่งแสดงในไดอะแกรมของเครื่อง LC/MS ดังนี้

1. **ส่วนเชื่อมต่อแหล่งกำเนิดไอออน** (Ionization interface)

ได้แก่ Electrospray ionization (ESI) ทำหน้าที่ให้สารตัวอย่างกลายสเปรย์ของละอองฝอยที่มีประจุสูงในสนามไฟฟ้า แล้วไปชนก๊าซแห้งหรือได้รับความร้อน ตัวทำละลายก็จะระเหยออกจากละอองฝอยนั้น ทำให้ขนาดละอองลดลง และแรงผลักคูลอมบิกระหว่างประจุที่เหมือนกันบนผิวนี้จะมากขึ้นจนเกิดแรงตึงผิว มีผลทำให้ไอออนดีดออกจากละอองนั้น (charge-residue model) ไอออนที่เกิดขึ้นจะถูกส่งไปยัง orifice ผ่านเลนส์ไฟฟ้าสถิตย์ซึ่งจะเข้าไปยังตัววิเคราะห์มวล

2. Mass analyzer

ทำหน้าที่ตรวจหามวลโดยการวัด m/z หรือแยกไอออนตาม m/z โดยมีทั้งโหมดไอออนบวก และ ไอออนลบ ตัวอย่าง mass analyzer ได้แก่ เครื่องวิเคราะห์มวลแบบควอดดรูโพล (Quadrupole analyzer) เป็นอุปกรณ์ซึ่งใช้ความเสถียรของแนววิถีในสนามไฟฟ้าที่กวัดแกว่งเป็นตัวแยกไอออนตามอัตราส่วนมวลต่อประจุ Quadrupole เป็นแท่ง 4 แท่ง โดยคู่ของแท่งที่อยู่ตรงข้ามกันจะเชื่อมต่อถึงกันโดยให้ความต่างศักย์ แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ไดอะแกรมของ Quadrupole analyzer

ที่มา:Chromatography online. (2018). **Quadrupole analyzer**. เข้าถึงเมื่อ 31 มีนาคม. เข้าถึงได้จาก http://www.chromatographyonline.com/comparing-capabilities-time-flight-and-quadrupole-mass-spectrometers-0

3. ตัวตรวจหาไอออน (Ion detector)

เมื่อไอออนถูกแยกจากเครื่องวิเคราะห์มวลแล้วจะเข้าสู่ตัวตรวจหาซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภทคือ ประเภทวัดประจุโดยตรง และฟาราเดย์เคจ ส่วนอีกประเภทหนึ่งคือ เพิ่มความเข้มของสัญญาณ ได้แก่ อิเล็กตรอนมัลติพลายเออร์ โฟตอนมัลติพลายเออร์ และ array

รูปแบบในการสแกนใน tandem mass spectrometry

Tandem mass spectrometry มี 2 ประเภท คือ หน่วยวิเคราะห์ไอออนสองหน่วยมาต่อกันจริง ส่วนอีกแบบหนึ่งมีภายในเครื่องเดียวกันสามารถเลือกให้ precursor ion ยังอยู่ในเครื่องนั้นแล้วเกิดการแตกหักเป็นส่วนย่อยในเวลาต่อมา โดยรูปแบบการสแกนทั้งหมดมีสี่แบบ

1. Product ion scan

Precursor ion จะถูกเลือกจาก spectrometer แรก ไอออนนี้จะขึ้นกับแก๊สเฉื่อยจากภายใน cell และเกิดการแตกหัก ซึ่ง Product ion ที่เกิดทั้งหมดจะถูกวิเคราะห์โดย mass spectrometer เครื่องที่สอง วิธีนี้ใช้ดูmolecular ion นั้นแตกหักให้ส่วนย่อยอะไรบ้าง

2. Precursor ion scan

Spectrometer แรก จะสแกนมวล และไอออนย่อยทั้งหมดที่เกิดจะเข้าสู่ cell collision และเกิดการแตกหักเป็นไอออนทุติยภูมิ (Secondary fragment) spectrometer เครื่องที่สองจะถูกกำหนดไว้ที่ตำแหน่งมวลต่อประจุ ดังนั้น เฉพาะไอออนปฐมภูมิที่เกิดการแตกหักให้ไอออนทุติยภูมิที่มีมวลต่อประจุ

3. Natural loss scan

Mass spectrometer ทั้งสองจะสแกนด้วยกัน แต่ตั้งค่าของมวลต่างกันด้วยค่าคงที่ ระหว่าง 2 spectrometer ดังนั้น ถ้าให้ a เป็นค่าของมวลที่ต่างกันที่ตั้งไว้เมื่อไอออนมวล m ผ่านไปยัง mass spectrometer ตัวที่หนึ่ง การตรวจหาจะเกิดขึ้น ถ้าไอออนนี้ผลิตไอออนย่อยที่มีมวล m-a หลังจากที่ไอออนนี้ออกจากเซลล์ นั่นคือ มีการสูญเสียโมเลกุลที่เป็นกลาง ในรูปแบบ positive ionization จะพบว่า ไอออนที่มีหมู่ไฮดรอกซีมักมีการสูญเสียโมเลกุลของน้ำ

4. Selected Reaction Monitoring, MRM

สำหรับรูปแบบ SRM นี้ mass spectrometer ทั้งสองจะถูกกำหนดไปที่มวลที่เลือกแล้ว ดังนั้นจึงไม่มีการสแกน โดยไอออนที่เลือกโดย mass spectrometer ตัวแรก จะถูกตรวจหาถ้าหากไอออนนี้แตกหักให้ส่วนย่อยที่เลือกโดยปฏิกิริยาที่เลือกแล้ว การที่ไม่มีการสแกนจึงทำให้สภาพไวของวิธีนี้ดีมาก นอกจากนี้มีความจำเพาะดีด้วย จึงทำให้ลดสัญญาณรบกวน และกำจัดการแทรกสอดได้เป็นส่วนใหญ่

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation)

Method validation เป็นกระบวนการยืนยันความถูกต้อง ความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ที่ศึกษา เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ ช่วยให้ทราบถึงคุณสมบัติ เงื่อนไข หรือข้อจำกัดของวิธีการวิเคราะห์นั้นๆ (จุไรรัตน มหาเทียน, 2561)

สถิติขั้นพื้นฐานที่ใช้ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธี ได้แก่

Mean (ค่าเฉลี่ย)

Standard deviation (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

Variance (ค่าความแปรปรวน)

Relative standard deviation (RSD) or Coefficient of variance (CV)

พารามิเตอร์ที่มักจะศึกษาใน Method Validation

1. Specificity/Selectivity

Specificity ของวิธีสามารถทดสอบได้โดยใช้ blank matrix ที่เติมสารนอกเหนือจากการวิเคราะห์ลงในตัวอย่างเพื่อตรวจสอบว่าสารอื่นๆสามารถถูกตรวจวัดได้ด้วยวิธีที่ทดสอบหรือไม่ การตรวจไม่พบสัญญาณรบกวนจาก blank matrix หรือสารอื่นๆแสดงให้เห็นว่าวิธีที่ทดสอบมีความจำเพาะ (selective and specific) อย่างไรก็ตามการมีสัญญาณรบกวนเล็กน้อยเป็นสิ่งที่ยอมรับได้ถ้าค่าความเที่ยงและความแม่นยำที่ lower limit of quantitation (LLOQ) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (±20%)

2. Range หมายถึง ช่วงการใช้งานที่ครอบคลุมระดับความเข้มข้นของสารที่ต้องการศึกษา (lower และ upper levels) โดยสามารถแสดงระดับของความเที่ยง (Precision) ความแม่น (Accuracy) และ ความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) ตามที่กำหนดในวิธีทดสอบ

3. ความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) หมายถึง ความสามารถของวิธีทดสอบที่ให้ค่าสัญญาณของเครื่องมือวัดที่แปรสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่ต้องการศึกษา

4. LOD (Limit of Detection) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจพบได้ โดยทั่วไปจะเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ให้สัญญาณเป็น 3 เท่า ของ SD ของ blank เหนือค่าเฉลี่ย สัญญาณของ blank

5. LOQ (Limit of Quantitation) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถตรวจพบ และ อ่านค่าได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ สามารถรายงานค่าได้ โดยทั่วไปจะเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ให้ สัญญาณเป็น 10 เท่า ของ SD ของ blank เหนือค่าเฉลี่ยสัญญาณของ blank

6. Accuracy หมายถึง ค่าที่ได้จากการวัดมีค่าใกล้เคียงกับค่าจริงมากน้อย เพียงใด โดยทั่วไปจะมีความสัมพันธ์กับค่าความเบี่ยงเบน (Bias) คือจะแปรผกผันกับค่าความเบี่ยงเบน (Bias)

7. Precision หมายถึง การวัดซ้ำหลายๆ ครั้งแล้วดูว่าค่าที่ได้ใกล้เคียงกันหรือไม่ ซึ่งการวัดที่ได้ ค่าใกล้เคียงกันไม่ได้หมายความว่าค่าที่วัดได้จะเป็นค่าที่ถูกต้องเสมอไป

7.1 Repeatability หมายถึง การทดสอบซ้ำๆ ภายใต้สภาวะคงที่ ทำโดยห้องปฏิบัติการเดียวกัน ตัวอย่างเดียวกัน ภาวะแวดล้อมเดียวกัน ผู้ทดสอบคนเดียวกัน และภายใต้เวลา ใกล้เคียงกัน

7.2 Reproducibility หมายถึง การทดสอบซ้ำซึ่งอาจมีความแตกต่างกัน ดังนี้

7.2.1 Intra-lab Reproducibility หมายถึง การทดสอบซ้ำโดยอาจจะขยายเวลา ในการทดสอบมากขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงเจ้าหน้าที่ทดสอบ เปลี่ยนเครื่องมือ วันที่ทำการทดสอบต่างกัน แต่ ห้องปฏิบัติการที่ใช้ทดสอบเป็นห้องปฏิบัติการเดียวกัน

7.2.2 Inter-lab Reproducibility หมายถึง การทดสอบซ้ำโดยดูค่าความแปรปรวนที่ มีผลต่อความแม่นยำของวิธีเมื่อ มีการเปลี่ยนผู้ทดสอบ เปลี่ยนเครื่องมือ แต่ไม่ได้ทำการทดสอบโดยห้องปฏิบัติการ เดียวกัน (ยุพิน รัตนะแพร, 2561)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

María del Mar Ramírez Fernández และคณะ ได้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน และเมตาบอไลท์ต่างๆ ในตัวอย่างปัสสาวะ โดยอาศัยเทคนิค LC-MS/MS พารามิเตอร์ที่ศึกษา ได้แก่ selectivity, linearity, LOD, LOQ, imprecision, bias, stability, matrix effect, recovery, carryover และ dilution integrity สำหรับการเตรียมตัวอย่างใช้วิธีการสกัดแบบ liquid-liquid extraction ด้วย ethyl acetate จากการวิจัย ได้ผลดังนี้ linear dynamic range อยู่ระหว่าง 25 500 ถึงng/ml ค่า LOQ กำหนดให้ค่าความเข้มข้นสุดท้ายของ calibrator และ LOD อยู่ระหว่าง 2.5-0.125ng/mL วิธีที่ศึกษานี้มีการตรวจพบที่ดีโดย ค่า inter- และ intra- precision น้อยกว่า 10.7% ไม่มี carryover หลังจากการวิเคราะห์ blank หลังจากความเข้มข้นสูงๆ รวมทั้งสามารถประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์ตัวอย่างทางนิติเวชได้ (María del Mar Ramírez Fernández, 2010a, 2010b)

Chu-An Yang และคณะ ได้ศึกษาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน โอปิเอตส์ ละเมตาบอไลท์ต่างๆในตัวอย่างปัสสาวะ และเลือด โดยเทคนิค LC-MS/MS ใช้ตัวอย่างปริมาตร 1 mL ในการสกัดโดยผ่านเทคนิค solid phase extraction (SPE) คอลัมน์ที่ใช้ คือ Agilent Zorbax SB-Aq ส่วน mass analyzer ใช้โหมด ESI Positive-ion กับ DMRM mode ช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา คือ 50-1000 ng/mL ผลการศึกษาตามพารามิเตอร์ต่างๆ มีดังนี้ (1) ประสิทธิภาพการสกัดดี คือ มีค่า recovery มากกว่า 80% ยกเว้น MDMA (71%) และ

morphine (74%) (2) การศึกษา precision ในวันเดียวกัน %CV อยู่ในช่วง 0.57-3.89% ส่วนการศึกษาต่างวันกัน %CV อยู่ในช่วง 1.59-8.80% (3) calibration linearity มากกว่า 0.999 ทุกๆ สารที่วิเคราะห์ ค่า LOD และ LOQ เท่ากับ 1 และ 5 ng/mL ตามลำดับ (4) การศึกษา matrix effect (ion suppression) มีผลกับ 3 analyte แต่การศึกษางานวิจัยนี้ก็ยังเป็นที่น่าพอใจสำหรับการใช้ deuterated internal standard และยังสามารถประยุกต์ใช้กับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บรวบรวมจากคดีฆาตกรรมที่ไม่ทราบสาเหตุจากสำนักงานอัยการเขตต่างๆในไต้หวันและยังเป็นประโยชน์ต่อการทำความเข้าใจว่า opiate ที่ตรวจพบมาจากเฮโรอีน หรือมากจากมอร์ฟีนหรือโคเดอีนที่ใช้ในการรักษาหรือไม่ (Yang et al., 2017)

Huei-Ru Lin และคณะได้ศึกษาการตรวจวิเคราะห์สารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน โอปิเอตส์ เคตามีน ละเมตาบอไลท์ต่างๆ ในปัสสาวะ โดยอาศัยเทคนิค LC-MS/MS กับการเตรียมตัวอย่างแบบ SPE ใช้เวลาในการวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS เพียง นาที วิธีที่ได้ศึกษานี้ ดำเนินการตรวจสอบ 6.7 ความใช้ได้ของวิธีตามguideline ของ European Commission (EC) decision 2002/642/EC จากการศึกษา ค่า precision วันเดียว และต่างวันเท่ากับ ต่ำกว่า 13.6% สำหรับค่า accuracy อยู่ระหว่าง17.7-% ถึง 9.9% สำหรับทุกๆสาร จากการศึกษา matrix effect พบว่า ion suppression ได้รับการชดเชยโดยการใช้ deuterated internal standard และไม่มีการตรวจพบการปนเปื้อนข้ามในกรณีความเข้มข้นสูงๆ และสารเสพติดที่วิเคราะห์มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง และที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วิธีการนี้ได้รับการตรวจสอบโดยเปรียบเทียบกับวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-MS) โดยใช้ตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 52 ตัวอย่าง จากผลการทดลองพบว่า การวิเคราะห์ LC-MS / MS มีความถูกต้องแม่นยำ และจำเพาะเจาะจง เช่นเดียวกับ GC-MS สรุปได้ว่าวิธีการของ LC-MS / MS ในปัจจุบันมีประสิทธิภาพ น่าเชื่อถือ และเหมาะสำหรับใช้เป็นเทคนิคการยืนยันสารเสพติดในปัสสาวะ ได้พร้อมกันหลายชนิดๆ และสามารถหาปริมาณสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน โอปิเอตส์ และเคตามีนได้ (Lin, Choi, Lin, & Hu, 2013)

Marek Dziadosz และคณะได้ศึกษาวิธีการตรวจคัดกรอง cannabinoids, opiates, amphetamines, cocaine, benzodiazepines และ methadone โดยการพัฒนาวิธีขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ใน ซีรัม ปัสสาวะ และเลือด โดยอาศัยเทคนิค LC-MS / MS สำหรับการเตรียมตัวอย่างใช้วิธีการตกตะกอนโปรตีน และใช้ปริมาตรตัวอย่างเพียง 100 ไมโครลิตร การวิเคราะห์โดยใช้ Luna 5 มม. C18 (2) 100 A, 150 มม. Mobile phase ที่ใช้ประกอบด้วย A (H_2O / methanol = 95/5, v / v) และ B (H_2O / methanol = 3/97, v / v) ทั้งสองเติม 10 mM ammonium acetate และ 0.1% acetic acid ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า วิธีการที่พัฒนาขึ้นเหมาะสำหรับวิธีการตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพและประสบความสำเร็จในการวิเคราะห์ตัวอย่างจริง (Dziadosz, 2018)

Jason Hudson และคณะ ได้พัฒนาการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารเสพติดกลุ่ม Amphetamine Phentermine และdesigner stimulant ต่างๆ ในตัวอย่างชีววัตถุ โดยอาศัยเครื่องมือ Agilent 6430 Triple Quadruploe-MS จากการวิเคราะห์สารเสพติดทั้ง 13 ใช้รูปแบบ Calibration เป็น linear และ Quadrupole วิธีการวิเคราะห์สามารถแยกสารเพติดแต่ละชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพภสยในเวลา 9 นาที นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี สำหรับการยืนยันผล ซึ่งใช้พารามิเตอร์ตามแนวทางสากลของ SWGTOX ได้แก่ LOD, LOQ interference, robustness, ion suppression/ enhancement, recovery เป็นต้น((Hudson, 2015)

Jason Hudson และคณะ ได้ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี สำหรับการยืนยันผล ซึ่งใช้พารามิเตอร์ตามแนวทางสากลของ SWGTOX ได้ผลการศึกษาดังนี้ ช่วงความเข้มข้นของสารเสพติดครอบคลุมกฎหมายเกี่ยวกับการขับขี่ (DUID) และ medical examiner casework คือ ในช่วง 0.010-2.0 mg/L โดยที่ 1/x weighting factor สำหรับ linear และ Quadratic calibration curve ถูกใช้ในการดูค่าความสัมพันธ์ (R^2), %Accuracy อยู่ในช่วง 93±5% ถึง 105±6% ในทุกๆชนิด, ค่า within-precision และ intermediate อยู่ในช่วง ±11% และ±13% ตามลำดับ การศึกษา LOD และ LOQ ทำการวิเคราะห์ในตัวอย่างเลือด 3 แหล่ง 3 ความเข้มข้น คือ 0.005, 0.0025 และ 0.00125mg/L (Jason Hudson, 2015)

ธนสิริ ยกเชื้อ ได้ศึกษาการพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาปริมาณยาในเลือดโดยเทคนิค Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ตามแนวทางสากลของ SWGTOX โดยวิเคราะห์สำหรับสารเสพติดและเมแทบอไลต์ในเลือดได้ 16 ชนิด ได้แก่ 7-Aminoflunitrazepam, 7-Aminonitrazepam, Alprazolam, Amphetamine, Clonazepam, Diazepam, Flunitrazepam, Ketamine, MDA, MDMA, Methadone, Methamphetamine, Nitrazepam, Nordiazepam, Oxazepam และ Temazepam มีผลการศึกษา ดังนี้ ใช้ตัวอย่างเลือดในการสกัดเพียง 200 ไมโครลิตร และสกัดแบบ liquid-liquid extraction ใช้ Diazepam-d5, Methamphetamine-d5 และ MDMA-d5 เป็น Internal Standard จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ได้ค่า LOD ที่ 1, 2 และ 5 ng/mL, Accuracy และ Precision ของยาทั้ง 16 ชนิด 3 ความเข้มข้น พบว่า ค่าที่ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือน้อยกว่า ±20 % โดยมีค่า %Bias อยู่ระหว่าง -13.75 ถึง 9.12 และ ค่า %RSD อยู่ระหว่าง 1.98 ถึง 7.54, Matrix effect ไม่มีผลการต่อการวิเคราะห์, LOQ ที่ 5, 10 และ25ng/ml ซึ่งครอบคลุมระดับที่ใช้ในการรักษา ดังนั้นวิธีการทดสอบนี้มีความเหมาะสม ที่จะนำไปใช้ในการการตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาในเลือดและรายงานผลการวิเคราะห์ได้ (ยกเชื้อ, 2561)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์หาปริมาณยาและสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลท์ต่างๆในปัสสาวะ และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยใช้เครื่องมือ LC-MS/MS เพื่อให้ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยลง ลดระยะเวลาการวิเคราะห์ ไม่ยุ่งยาก และมีsensitivity สูง ผู้วิจัยจึงพัฒนาวิธีการสกัดตัวอย่าง สภาวะของเครื่องมือที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังศึกษาวิธีที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างจริงที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน จำนวน 28 ตัวอย่าง จากกลุ่มตรวจพิสูจน์ทางเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม โดยมีลำดับในการวิจัยดังนี้

ขอบเขตของตัวอย่าง

1. ตัวอย่างปัสสาวะที่ไม่มีสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Blank Urine) จากอาสาสมัคร จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 50 mL

2. ตัวอย่างปัสสาวะ ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจากห้องปฏิบัติการฯ ของกลุ่มตรวจพิสูจน์ทางเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งให้ผลการตรวจกลุ่มแอมเฟตามีนเป็นบวก (Positive Result)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยประกอบด้วย

    1.1 Automatic pipettes
    1.2 Centrifuge
    1.3 N_2 Evaporator (Turbovap, Zymark)
    1.4 Micro-centrifuge tube
    1.5 Syringe filters 0.45 μm
    1.6 Rack
    1.7 Vibration mixer

2. เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องมือ LC/MS/MS ของบริษัท Agilent Technologies

Liquid Chromatogram	รุ่น 1260 Infinity
Mass Spectrometer	ยี่ห้อ Agilent รุ่น 6495 Triple Quad

รูปที่ 3 เครื่อง LC/MS/MS ของบริษัท Agilent Technologies

ที่มา: Agilent. (2018). 1260 Infinity II LC Systems. เข้าถึงเมื่อ 10 มิถุนายน. เข้าถึงได้จากเข้าถึงได้จากhttps://www.agilent.com/en/products/liquid-chromatography/infinitylab-analytical-lc-solutions/1260-infinity-ii-lc-systems#1

สารเคมี

3.1 Acetonitrile	(HPLC Grade)
3.2 1-Chlorobutane	(AR Grade)
3.3 Ultrapure water	
3.4 Hydrochloric acid	
3.5 Drug standards	
3.6 Formic acid	(Mass Grade)
3.7 Isopropanol	(HPLC Grade)
3.8 Ammonium formate	(HPLC Grade)

การเตรียมสารละลาย

1. 200 mM Ammonium formate

   ชั่ง Ammonium formate 6.036 กรัม ปรับปริมาตรในขวดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วย Deionized Water

2. 10 mM Amm onium formate

   เติม 50 มิลลิลิตร ของ 200mM Ammonium formate ปรับปริมาตรในขวดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ด้วย Deionized Water

3. Needle wash

   เตรียมสารลาย Isopropanol, Methanol, Acetonitrile และ H_2O อย่างละ 250 mL ลงในขวดเตรียมสารปริมาตร 1000 mL

4. Pump seal

   เติม 100 mL ของ Isopropanol ลงในขวดปริมาตร 1 L หลังจากนั้นเติม DI Water 900 mL

5. 0.1 M Carbonate buffer pH 10.3

   ชั่ง sodium carbonate 10.6 g และ ชั่ง sodium hydrogen carbonate 8.4 g และละลายด้วย DI water จนมีปริมาตร 1000 ml

ขั้นตอนการดำเนินการ

1. ศึกษาสภาวะของเครื่องมือที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์

เครื่องมือ LC/MS/MS ของบริษัท Agilent Technologies

Liquid Chromatogram รุ่น 1260 Infinity

Mass Spectrometer ยี่ห้อ Agilent รุ่น 6495 Triple Quad

1.1 สภาวะที่ศึกษา มีดังนี้

1) Mobile phase
2) Gradient program
3) Column temperature
4) Flow rate
5) Ion source setting
6) Detection (MS)

2. ศึกษาสภาวะของการเตรียมตัวอย่าง

2.1 สภาวะที่ศึกษา มีดังนี้

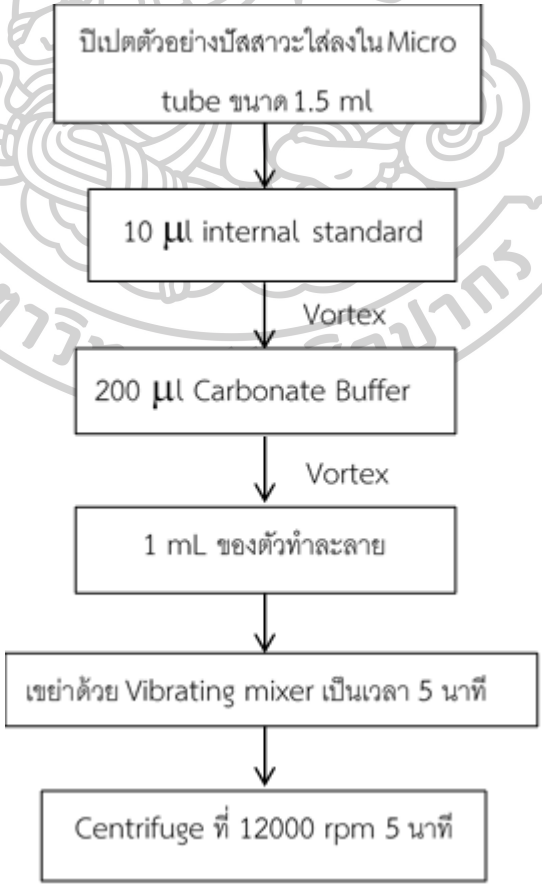
2.1.1 วิธีการสกัด ทดสอบการสกัดโดยเลือกวิธีการสกัดแบบ liquid-liquid extraction เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย และมีค่าใช้จ่ายต่ำ

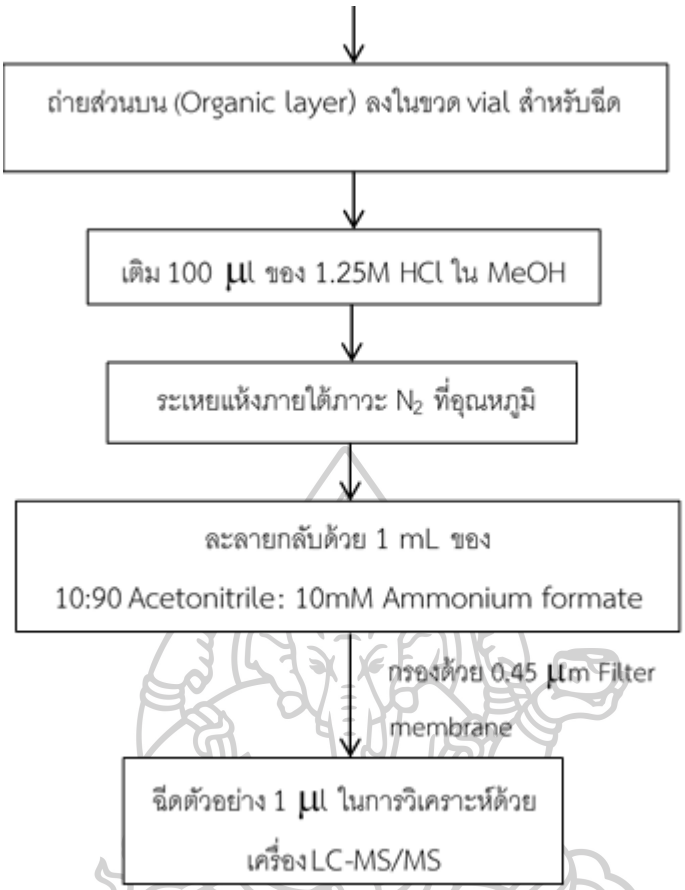
2.1.2 ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด ในการศึกษาเลือกเปรียบเทียบการใช้ปริมาณตัวอย่างปัสสาวะที่ 100μl และ 200μl

2.1.3 บัฟเฟอร์ในการสกัด ในการศึกษาบัฟเฟอร์ที่เลือกใช้ คือ carbonate buffer pH 10.3 เนื่องจากเป็นบัฟเฟอร์ที่เตรียมได้ง่าย ใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการตรวจพิสูจน์ทางเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ และที่ pH 10.3 เป็น pH ที่ครอบคลุมค่า pK_a ของสารที่ต้องการวิเคราะห์

2.1.4 ตัวทำละลาย ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดระหว่างตัวทำละลาย Tert-butyl-methyl-ether (TBME) กับ Butyl chloride: isopropanol (9:1)

2.1.5 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง





3. ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

ศึกษาการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตามแนวทางมาตรฐานสากล ของ The Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX, 2013) ด้วยพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

3.1 ความจำเพาะ (Selectivity/ Specificity)

Specificity ของวิธีสามารถทดสอบได้โดยใช้ blank matrix ที่เติมสารเสพติดในตัวอย่างปัสสาวะ 10 แหล่ง เพื่อตรวจสอบว่ายาอื่นๆสามารถถูกตรวจวัดได้ด้วยวิธีที่ทดสอบหรือไม่ การตรวจไม่พบสัญญาณรบกวนจาก blank matrix หรือสารอื่นๆแสดงให้เห็นว่าวิธีที่ทดสอบมีความจำเพาะ (selective and specific) อย่างไรก็ตามการมีสัญญาณรบกวนเล็กน้อยเป็นสิ่งที่ยอมรับได้ถ้าค่าความเที่ยงและความแม่นยำที่ lower limit of quantitation (LLOQ) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (±20%)

3.2 ผลของเมทริกซ์ (Matrix Effect)

3.2.1 ทดสอบการรบกวนของ internal standard โดยใช้ตัวอย่าง Blank Urine ที่เติม internal standard คือ MDMA-d6 MA-d5 และ AM-d6 ที่ความเข้มข้น 250 ng/ml ในตัวอย่างปัสสาวะ เพื่อตรวจสอบว่า internal standard ที่ใช้มีผลรบกวนการวิเคราะห์ตัวอย่างหรือไม่

3.2.2 ทดสอบ Ionization Suppression/ Enhancement เป็นสิ่งที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการกำเนิดประจุ (ionization) ของ LC/MS โดยเฉพาะกับ electrospray ionization (ESI) interface โดยสามารถเกิดจากในทุกขั้นตอนตั้งแต่การเตรียมตัวอย่าง ชนิดของตัวอย่าง mobile phase หรือ additives ซึ่ง matrix effect นั้นสามารถส่งผลต่อประสิทธิภาพการ ionization โดยสามารถลดหรือเพิ่มสัญญาณได้ เนื่องจาก matrix effects ใน LC/MS นั้นอาจจะส่งผลกระทบกับค่าอื่นๆ ในการทดสอบความใช้ได้ของวิธี เช่น LOD, LLOQ, precision และ accuracy ดังนั้นการศึกษา matrix effect จึงถือเป็นส่วนหนึ่งของการทดสอบความใช้ได้ของวิธีที่ใช้ LC/MS Matrix effects สามารถทดสอบได้ 2 วิธี โดยใช้ตัวอย่าง 2 ชุด

ทดสอบตัวอย่าง 2 ชุด ประกอบด้วย

ชุด A คือ ตัวอย่างปัสสาวะที่นำมาสกัด และทำการเติมสารมาตรฐานยาและสารเสพติดที่ความเข้มข้น 50 และ 500 ng/ml ภายหลังจากการสกัด

ชุด B คือ สารมาตรฐานยาและสารเสพติด (Standard) ที่ความเข้มข้น 50 ng/ml และ 500 ng/ml

การหาผลของ Ionization Suppression/ Enhancement
คำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยของแต่ละชุดความเข้มข้น ดังนี้

$$\text{Ionization suppression /enhancement (\%)} = \left(\frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย ชุด } \mathbf{A}}{\text{พื้นที่ใต้ กราฟเฉลี่ย ชุด } \mathbf{B}} - 1\right) \times 100$$

โดย ถ้ามีค่าบวก หมายถึง เกิด ionization enhancement แต่ถ้ามีค่าลบ หมายถึงเกิด ionization suppression และเกณฑ์การยอมรับ คือ % Ionization suppression / enhancement ต้อง < 25%

3.3 ความถูกต้อง และความแม่นยำ (Accuracy and precision)

คือ การทดสอบความแม่นและความเที่ยงของวิธี ซึ่งใช้เพื่อตรวจวัดค่า random error และ systematic error ความเที่ยง (precision) สามารถตรวจวัดได้ 2 กรณี คือ การตรวจ “repeatability” หรือที่เรียกว่า “within-day precision” และ “reproducibility” หรือที่เรียกว่า “between-day precision” โดย repeatability จะเป็นการตรวจวัดค่า precision ภายใต้สภาวะ

เดียวกันในขณะที่ reproducibility จะเป็นการตรวจวัดค่า precision ในสภาวะที่แตกต่างกัน เช่น ต่างคน ต่างเวลา เป็นต้น

โดยค่า precision ของวิธีนั้นจะถูกตรวจวัดในรูปของ percentage relative standard deviation (%RSD) โดยมีช่วงที่ยอมรับได้ คือ น้อยกว่า ±20%

ความแม่น (accuracy) นิยมตรวจวัดในรูปแบบของค่า %bias หรือค่าเปอร์เซ็นต์ความเบี่ยงเบนจากค่าจริง (%bias is percentage deviation from the accepted reference value) โดยมีช่วงที่ยอมรับได้คือน้อยกว่า ±20%

Accuracy และ precision สามารถวัดได้โดยใช้ quality control samples (QCs) ที่ความเข้มข้นต่างกัน 3 ความเข้มข้น คือ 100, 500 และ 1000 ng/mL ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 7 วัน แล้วหาค่า within-day (n=4), between-day precision (n=21) และ %bias (n=21)

วิธีการคำนวณ

$$Within-\ precision\ \%RSD = (\frac{Std\ of\ deviation\ \ of\ a\ single\ run\ of\ samples}{Mean\ calulate\ value\ \ of\ a\ single\ run\ of\ samples})x100$$

$$Between-\ precision\ \%RSD = (\frac{Std\ deviation\ \ grand\ mean\ of\ each\ concemtration}{grand\ mean\ of\ each\ concentration})x100$$

$$\%Bias = \left(\frac{Mean\ of\ calculated\ concentration - Nominal\ Concentration}{Nominal\ Concentration}\right)x100$$

3.4 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

Linearity ของวิธีสามารถทดสอบได้โดยใช้ calibration curves 7 ความเข้มข้นที่ ครอบคลุมช่วงของความเข้มข้นที่ต้องการตรวจวัด โดยเติมสารมาตรฐานยาและสารเสพติด และ internal standard ลงในตัวอย่าง blank urine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

50, 100, 250, 500, 800, 1000, และ 1500 ng/mL

ทำการวิเคราะห์ 7 ซ้ำ แล้วนำค่าที่ได้มาดูความสัมพันธ์โดยใช้ linear regression หรือ non-linear สำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณนั้น ค่า correlation coefficient (R^2) ยอมรับได้อย่างน้อยที่ R^2 = 0.99 หรือดีกว่า

3.5 ขีดจำกัดการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

Limit of Detection (LOD) คือ การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ โดยการใช้ blank urine จากแหล่งต่างกัน 3 แหล่งๆละ 2 ซ้ำ แล้วเติมด้วยสารมาตรฐานสารเสพติดที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 2 5 10 15 และ 20 ng/mL โดยทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง

ค่า LOD คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่ให้ค่า signal-to-noise ratio (S/N) อย่างน้อยเท่ากับหรือมากกว่า 3 (S/N ≥3)

3.6 Lower Limit of quantitation (LLOQ)

Lower Limit of quantitation (LLOQ) คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้โดยต้องมีค่า accuracy และ precision (n=9) อยู่ที่ช่วงที่ยอมรับได้คือ ±20% ซึ่งในการทดสอบนี้ได้ใช้ความเข้มข้นต่ำสุดของ calibration curves เป็นค่า LLOQ โดยความเข้มข้นดังกล่าวต้องมีค่า signal-to-noise ratio (S/N) อย่างน้อยเท่ากับหรือมากกว่า 10 (S/N ≥10)

3.7 Carry over

ทดสอบโดยเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ (Blank Matrix samples) โดยไม่เติม internal standard ต่อจากการวิเคราะห์ที่มีความเข้มข้น 3000 ng/ml โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

3.8 ความเสถียร (Stability)

ทดสอบโดยเตรียมตัวอย่างปัสสาวะ ที่มีการเติมสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 50 ng/ml และ 500 ng/ml หลังจากการสกัดทำการเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

4. ประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้น

ศึกษาเปรียบเทียบวิธีที่พัฒนาขึ้นด้วยตัวอย่างที่ทราบค่า (Known samples) จำนวน 28 ตัวอย่าง และเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Derivatize GC-MS

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน เคตามีน และเมตาบอไลท์ต่างๆ

สภาวะของเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์

1. เลือกชนิดของคอลัมน์

<u>คอลัมน์ที่เลือกใช้</u>

Column Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 mm × 100 mm, 2.7µm particle size

Guard column Agilent Poroshell 120 EC-18, 2.1x5 mm, 2.7 µm particle size

2. Mobile phase

<u>ชนิดของ mobile phase</u>

ชนิดของ mobile phase ได้ศึกษา 2 ชนิด คือ ชนิดแรก mobile phase A เป็น water และชนิดที่สอง mobile phase A เป็น Ammonium formate ที่ความเข้มข้น 10 mM *(ยกเชื้อ, 2561)* ส่วน mobile phase B เป็น Acetonitrile ได้ผลการศึกษาแสดงรายละเอียด ดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาชนิดของ Mobile phase

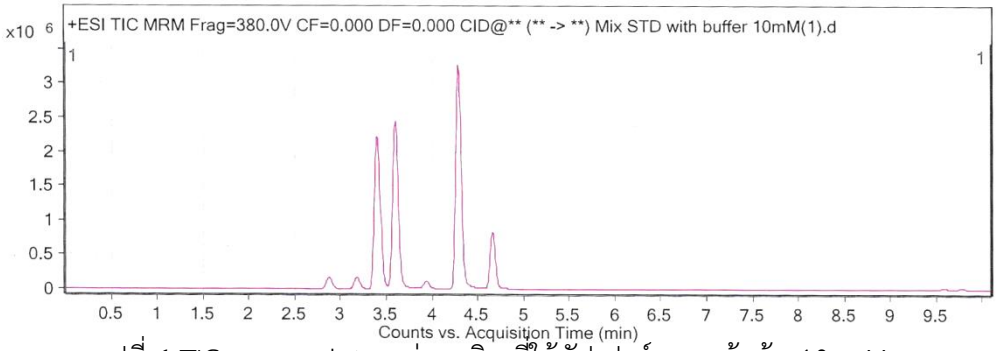
Compound	Water		Buffer 10mM Ammonium formate	
	Retention time (min)	Relative intensity*	Retention time (min)	Relative intensity*
Amphetamine	2.51	467551	3.29	486610
Methamphetamine	3.03	4303376	3.79	4725037
MDA	2.79	575306	3.57	535551
MDMA	3.25	5998816	3.96	7029752
MDEA	3.98	8051609	4.63	8620342
Ketamine	4.38	2303192	5.03	2456362
Norketamine	4.15	30100	4.90	30352
Phentermine	3.61	138091	4.29	139931

*relative intensity ที่ความเข้มข้น 200 ng/mL

จากผลการศึกษาพบว่า การใช้ mobile phase เป็น Ammonium formate ที่ความเข้มข้น 10 mM *(ยกเชื้อ 2018)* ทำให้ analyte แต่ละชนิดสามารถแยกออกจากกันได้ดี และให้ relative intensity ที่มากกว่าการใช้ mobile phase เป็น water เนื่องจากเป็นการเพิ่มความแรงไอออน (ionic strength) ของสารละลายให้สูงขึ้น ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ mobile phase เป็น Ammonium formate สำหรับการแยก analyte แต่ละชนิด

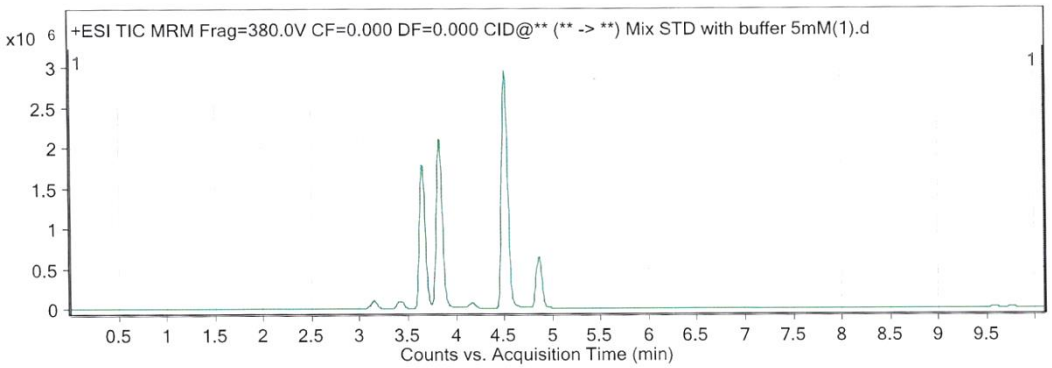
<u>ความเข้มข้นของ mobile phase</u>

- Ammonium formate ที่ความเข้มข้น10 mM (ยกเชื้อ, 2561)



รูปที่ 4 TIC ของ analyte แต่ละชนิด ที่ใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 mM

- Ammonium formate ที่ความเข้มข้น 5 mM *(María del Mar Ramírez Fernández, 2010b)*



รูปที่ 5 TIC ของ analyte แต่ละชนิด ที่ใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 5 mM

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาความเข้มข้นของ Mobile phase

Compound	5 mM Ammonium Formate Buffer		10mM Ammonium Formate Buffer	
	Retention time (min)	relative intensity*	Retention time (min)	relative intensity*
Amphetamine	3.15	277533	3.29	486610
Methamphetamine	3.66	3776963	3.79	4725037
MDA	3.42	268249	3.57	53551
MDMA	3.83	5847956	3.96	7029752
MDEA	4.51	7492828	4.63	8620342
Ketamine	4.86	1874164	5.03	2456362
Nor-ketamine	4.61	17902	4.90	30352
Phentermine	4.17	37794	4.29	70084

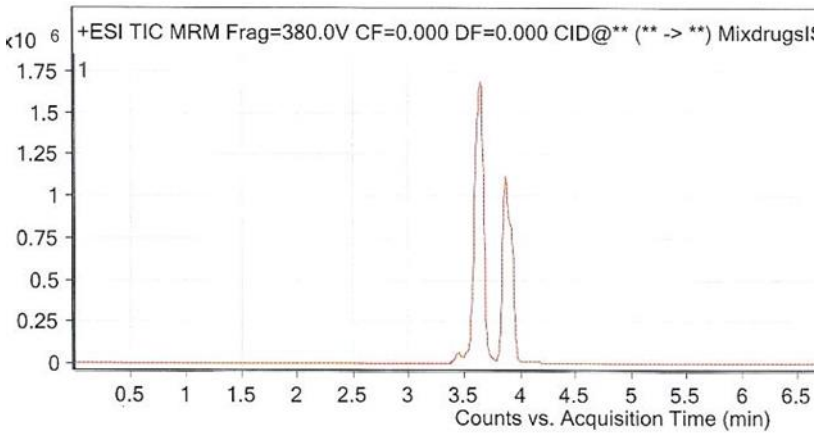
*relative intensity ที่ความเข้มข้น 200 ng/mL

จากผลการศึกษาพบว่า การใช้ mobile phase เป็น Ammonium formate ที่ความเข้มข้น 10 mM ให้ relative intensity ที่มากกว่า เนื่องจากเป็นการเพิ่มความแรงไอออน (ionic strength) ของสารละลายให้สูงขึ้น ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ mobile phase ที่ความเข้มข้น 10 mM

3. Gradient Program

ทดสอบ gradient program ทั้งหมด 3 ชุด ได้แก ชุด A, B,และ C ได้ผลการศึกษา ดังต่อไปนี้

Mobile phase	A
	Eluent A: Ammonium formate Eluent B: Acetonitrile with 0.1% Formic acid
LC settings Column	Gradient program Time (min) B (%) 0 5 1 5 8 90 10 90 10.05 5 Stop time: 10.10 min Post time: 2 min



รูปที่ 6 TIC ของ Gradient program A

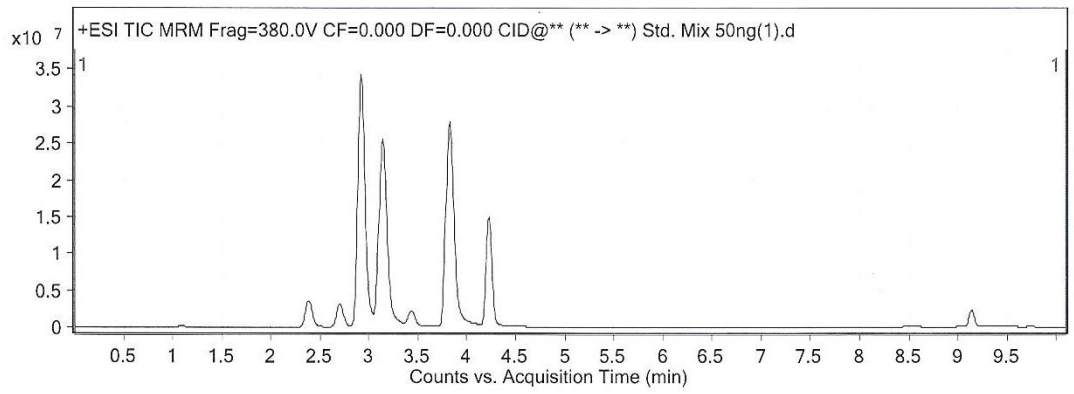
จาก Total ion chromatography (TIC) จะเห็นได้ว่า สารแต่ละชนิดไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่าง พิจารณาจากค่า R_s ที่มีค่าน้อยกว่า 1.5 โดย retention time แสดงให้เห็นดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบ Gradient program A

Compound	A	
	Retention time (min)	R_s
Amphetamine	3.45	1.6
Methamphetamine	3.61	0.83
MDA	3.53	0.83
MDMA	3.66	0.039
MDEA	3.87	0.17
Ketamine	3.92	0.57
Nor-ketamine	3.86	0.17
Phentermine	3.75	0.95

Gradient program B

	B
Mobile phase	Eluent A: Ammonium formate Eluent B: Acetonitrile with 0.1% Formic acid
LC settings Column	Gradient program Time (min) B (%) 0 10 1.5 10 7 30 8 90 9 90 9.05 10 Stop time: 9.10 min Post time: 2 min



รูปที่ 7 TIC ของ Gradient program B

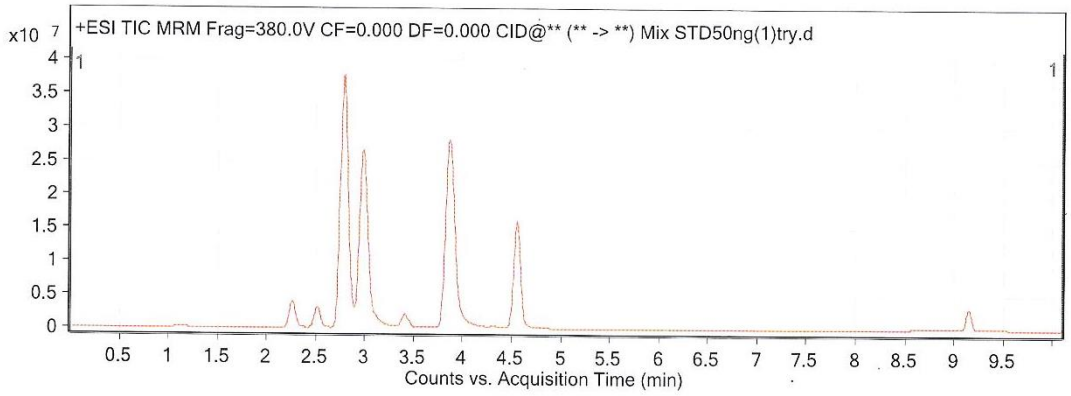
จาก Total ion chromatography (TIC) จะเห็นได้ว่า สารแต่ละชนิดไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ โดยพิจารณาจากค่า R_s ที่มีค่าน้อยกว่า 1.5 ของ Methamphetamine Norketamine และ Phentermine สำหรับ retention time แสดงให้เห็นดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบ Gradient program B

Compound	B	
	Retention time (min)	R_s
Amphetamine	3.97	2.96
Methamphetamine	4.39	0.01
MDA	4.28	2.2
MDMA	4.59	2.2
MDEA	5.10	2.11
Ketamine	5.37	2.11
Nor-ketamine	5.10	0.05
Phentermine	4.39	0.01

Gradient program C

	C
Mobile phase	Eluent A: Ammonium formate Eluent B: Acetonitrile with 0.1% Formic acid
LC settings Column	Gradient program Time (min) B (%) 0 10 1.5 10 7 20 8 90 9 90 9.05 10 Stop time: 9.10 min Post time: 2 min



รูปที่ 8 TIC ของ Gradient program C

จาก Total ion chromatography (TIC) จะเห็นได้ว่า สารแต่ละชนิดสามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ โดยพิจารณาจากค่า R_s พบว่าสารแต่ละชนิดที่มีค่ามากกว่า 1.5 และ สำหรับ retention time แสดงให้เห็นดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบ Gradient program C

Compound	C	
	Retention time (min)	R_s
Amphetamine	2.26	1.9
Methamphetamine	2.78	3.9
MDA	2.51	2.0
MDMA	2.98	5.9
MDEA	3.86	5.9
Ketamine	4.54	1.5
Nor-ketamine	4.31	1.5
Phentermine	3.41	2.0

จากการศึกษาสภาวะของเครื่องมือทั้งส่วน Chromatograph และ Mass spectrometer สำหรับการวิเคราะห์ยาและสารเสพติดในปัสสาวะ ได้สภาวะที่เหมาะสม รายละเอียดแสดงในตารางที่ 9 และ 10

ตารางที่ 9 สรุปสภาวะของ Chromatogram ที่ใช้ในการศึกษา

Parameters	รายละเอียด
Equipment	เครื่อง LC-MS/MS ประกอบด้วย Liquid Chromatograph ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1260 Infinity Mass Spectrometer ยี่ห้อ Agilent รุ่น 6495 Triple Quad
Chromatographic system	
Column	Agilent poroshell 120 EC-C18, 2.1 mm × 100 mm, 2.7μm particle size
Guard column	Agilent Poroshell 120 EC-18, 2.1x5 mm, 2.7 μm particle size
Mobile phase	Eluent A: 10 mM Ammonium formate Eluent B: Acetonitrile with 0.1% Formic acid
Gradient Program	Time (min) B (%) 0 10 1.5 10 7 20 8 90 9 90 9.05 10 Stop time: 9.10 min Post time: 2 min

ตารางที่ 10 สรุปสภาวะของ Mass spectrometer ที่ใช้ในการศึกษา

Parameters	รายละเอียด
Ion source setting	Gas Temp.: 200 °C Gas flow: 14 L/min Nebulizer: 45 psi Sheath gas flow: 11 L/min Capillary: +3500V, -3000V Nozzle voltage: +1000V, -1500V
Detection (MS)	Multiple reaction monitoring (MRM) Scheduled MRM mode
Mode	ESI Positive mode

จากการศึกษาสภาวะของ Detection (MS) ในโหมด acquisition ได้วิเคราะห์ collision energy ของแต่ละ precursor ion และ ตรวจสอบ transition ที่เหมาะสมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ได้ผลการศึกษาดังต่อไปนี้

ตารางที่ 11 transition และ collision energy ที่เหมาะสมกับแต่ละ precursor ion

Compound	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product Ion (m/z)	Fragment (V)	Collision energy (V)	Polarity
Amphetamine	2.26	136	119	380	5	Positive
			91	380	17	
Methamphetamine	2.78	150	119	380	9	Positive
			91	380	17	
MDA	2.51	180	**163**	380	9	Positive
			135	380	20	
			105	380	25	
MDMA	2.98	194.2	**163**	380	9	Positive
			133	380	20	
			105	380	25	
MDEA	3.86	208	**163**	380	9	Positive
			135	380	25	
			105	380	25	
Phentermine	4.31	150.1	**133**	380	10	Positive
			91.1	380	10	
			65.1	380	45	
Ketamine	4.54	238	207	380	15	Positive
			125	380	25	
			67	380	25	
Nor-ketamine	4.31	224	206.9	380	10	Positive
			179	380	10	
			125	380	25	

***ตัวหนา คือ quantitative ion**

สภาวะของการเตรียมตัวอย่าง

1. วิธีการสกัด ทดสอบการสกัดโดยเลือกวิธีการสกัดแบบ liquid-liquid extraction เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย และมีค่าใช้จ่ายต่ำ

2. ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด ในการศึกษาเลือกเปรียบเทียบการใช้ปริมาณตัวอย่างปัสสาวะที่ 100μl และ 200μl โดยวิเคราะห์จากผลประสิทธิภาพการสกัด (Extraction Efficiency) ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

ประสิทธิภาพการสกัด (Extraction Efficiency) = (A/B)*100

เมื่อ A คือ ตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารมาตรฐานยาและสารเสพติดแล้วนำมาสกัด (Spike sample)

B คือ สารมาตรฐานยาและสารเสพติด (Standard)

ได้ผลการศึกษาดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบผลประสิทธิภาพการสกัดของการใช้ปริมาณตัวอย่างปัสสาวะที่ 100uL และ 200uL

Analyte	ประสิทธิภาพการสกัด (Extraction Efficiency)	
	ปัสสาวะ 100uL	ปัสสาวะ 200uL
Ketamine	7.4	9.4
Nor-ketamine	7.5	9.3
MDEA	11.5	15.9
MDMA	11.0	14.2
MDA	6.8	8.5
Phentermine	17.8	12.5
Methamphetamine	7.6	8.7
Amphetamine	7.4	8.8

จากการศึกษาปริมาณของปัสสาวะที่ใช้ พบว่า ปัสสาวะที่ปริมาตร 100 และ 200 uL ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อพิจารณาผลของประสิทธิภาพการสกัด พบว่า มีค่าน้อย เนื่องจากระหว่างการระเหยภายใต้แก๊สไนโตรเจน analyte มีการสูญหายไป ผู้วิจัย จึงแก้ปัญหาโดยการเติม 1.25M HCl ใน MeOH เพื่อให้ analyte เสถียรในรูปเกลือ และไม่สูญหาย หลังจากทำการเตรียมตัวอย่างโดยการเติม HCl ก่อนการระเหยแห้งแล้ว พบว่า ได้ประสิทธิภาพการสกัดที่ดีขึ้น และอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ±25% รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบผลประสิทธิภาพการสกัดของการใช้ปริมาณตัวอย่างปัสสาวะที่ 100uL และ 200uL เมื่อเติม 1.25M HCl ก่อนการระเหยแห้งแล้ว

Analyte	ประสิทธิภาพการสกัด (Extraction Efficiency)	
	ปัสสาวะ 100uL	ปัสสาวะ 200uL
Ketamine	110.9	93.2
Nor-ketamine	122.6	89.7
MDEA	102.3	86.7
MDMA	99.7	85.9
MDA	88.9	94.7
Phentermine	85.6	76.4
Methamphetamine	99.6	92.6
Amphetamine	96.4	86.1

ดังนั้น จากการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณปัสสาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ปริมาณปัสสาวะ 100 uL สำหรับการหาปริมาณ ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ ถึงแม้จะมีปริมาณปัสสาวะน้อย และที่สำคัญช่วยลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายสำหรับการเตรียมตัวอย่างด้วย

3. บัฟเฟอร์ในการสกัด ในการศึกษาเลือกใช้บัฟเฟอร์ชนิด carbonate buffer pH 10.3 เนื่องจากเป็นบัฟเฟอร์ที่เตรียมได้ง่าย มีใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการ และที่ pH 10.3 เป็น pH ที่ครอบคลุมค่า pK_a ของสารที่ต้องการวิเคราะห์

4. ตัวทำละลาย ศึกษาเปรียบเทียบผล Recovery ระหว่างตัวทำละลาย Tert-butyl-methyl-ether (TBME) กับ Butyl chloride: isopropanol (9:1) โดยศึกษาที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 100 500 และ1500 ng/ml ความเข้มข้นละ 2ซ้ำ

ทดสอบตัวอย่าง 2 ชุด ประกอบด้วย

ชุด 1 คือ ตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารมาตรฐานยาและสารเสพติดให้มีความเข้มข้นเป็น 3 ความเข้มข้น คือ 100 500 และ1500 ng/ml แล้วนำมาสกัด (Spike sample)

ชุด 2 คือ ตัวอย่างปัสสาวะที่นำมาสกัด แล้วทำการเติมสารมาตรฐานยาและสารสเพติดให้มีความเข้มข้น เป็น 3 ความเข้มข้น คือ 100 500 และ1500 ng/ml

การหาผล Recovery คำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ยของแต่ละชุดความเข้มข้น ดังนี้

Recovery = (พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย ชุด 1/พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย ชุด 2) x 100

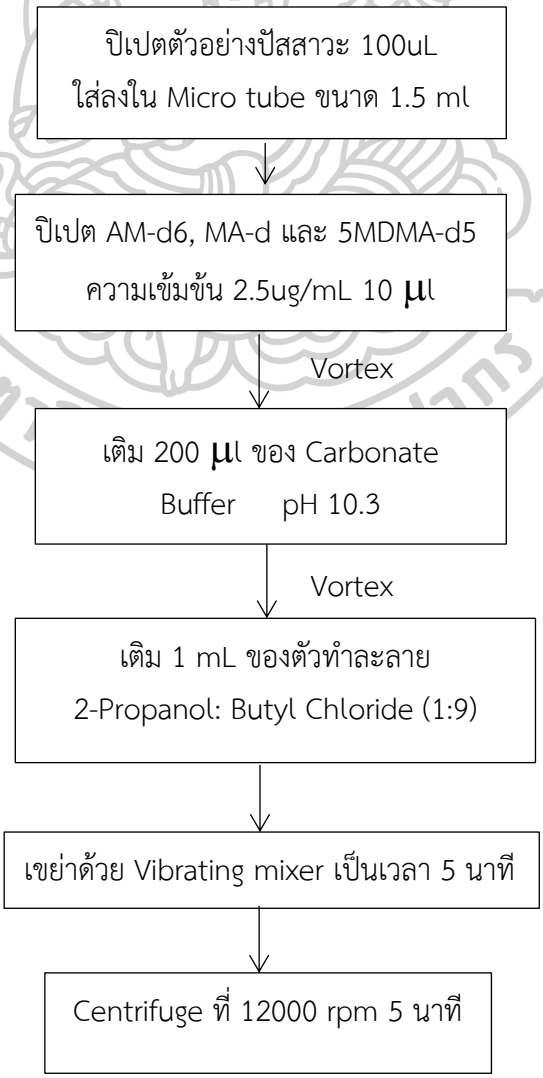
ได้ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 14

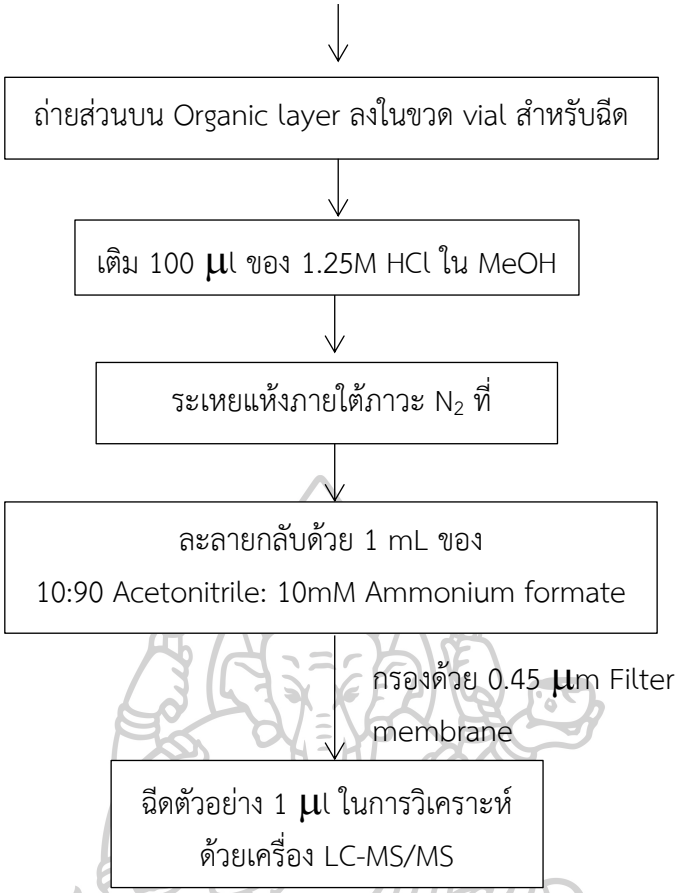
ตารางที่ 14 ผลการศึกษาเปรียบเทียบค่า Recovery ระหว่างการใช้ตัวทำละลายเป็น TBME กับ BUCl: IPA (9:1)

Analyte	TBME				BUCl : IPA (9:1)		
	Concentration (ng/mL)	Recovery	SD	%CV	Recovery	SD	%CV
Ketamine	L (100)	82.1	5.7	7.0	91.5	12.7	15.1
	M (500)	95.5	6.1	6.4	92.4	8.9	10.1
	H (1500)	78.0	2.2	2.9	85.8	10.5	12.2
Nor-ketamine	L (100)	80.2	0.5	0.6	93.4	8.1	8.7
	M (500)	90.0	4.9	5.4	88.2	0.1	0.1
	H (1500)	75.6	2.8	3.8	74.6	5.5	7.3
MDEA	L (100)	83.6	1.0	1.2	93.1	4.5	4.8
	M (500)	93.4	2.1	2.3	92.0	2.3	2.6
	H (1500)	81.4	5.0	6.2	86.0	0.8	0.9
MDMA	L (100)	76.5	8.4	11.0	93.9	1.4	1.5
	M (500)	103.6	5.0	4.8	89.5	2.3	2.6
	H (1500)	75.1	4.9	6.5	86.0	0.8	0.9
MDA	L (100)	76.7	2.1	2.7	80.2	2.6	3.3
	M (500)	87.4	9.3	10.6	83.4	4.7	5.6
	H (1500)	70.2	0.5	0.8	82.3	0.2	0.3
Phentermine	L (100)	80.4	5.0	6.2	85.9	2.3	2.7
	M (500)	95.1	3.7	3.9	83.3	0.3	0.3
	H (1500)	72.3	4.0	5.5	82.2	8.1	9.8
Methamphetamine	L (100)	78.0	4.3	5.6	90.8	2.3	2.5
	M (500)	93.9	3.2	3.4	85.7	0.3	0.3
	H (1500)	73.3	4.4	6.0	87.3	4.6	5.2
Amphetamine	L (100)	78.3	7.9	10.1	88.8	1.0	1.1
	M (500)	91.4	3.1	3.4	86.2	1.9	2.2
	H (1500)	73.0	1.0	1.3	83.4	0.7	0.8

จากการผลการทดสอบ พบว่า การสกัดด้วย (1:9) isopropanol : 1-Chlorobutane ให้ค่า Recovery ที่ดีกว่าในทุกช่วงความเข้มข้น โดยมีค่า Recovery อยู่ระหว่าง 74.6-93.4 ส่วน TBME ให้ค่า Recovery มากสุดเฉพาะที่ความเข้มข้น 500 ng/mL และTBME เป็นตัวทำละลายที่มีกลิ่นเหม็น ผู้วิจัยจึงไม่เลือกใช้สำหรับการทดสอบในวิธีนี้

จากการศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณยาและสารเสพติดในปัสสาวะ ได้ขั้นตอนที่เหมาะสมที่สุด คือ ใช้ตัวอย่างปัสสาวะ 100 uL ใส่ลงใน Micro tube ขนาด 1.5 ml เติม 10 uL ของ AM-d6, MA-d5 และ MDMA-d5 ที่ความเข้มข้น 2.5ug/mL ซึ่งใช้เป็น internal standard หลังจากนั้นเติม Carbonate buffer pH (10.3) ปริมาตร 200uL แล้วสกัดด้วย 2-Propanol:Butyl Chloride (1:9) ปริมาตร 1 mL เขย่าเป็นเวลา 5 นาที ด้วย vibrating mixer และหมุนด้วยเครื่อง Centrifuge เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนใสใส่ vial หลังจากนั้นเติม HCl (1.25M ใน Methanol) ปริมาตร 100 uL ระเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจน ละลายกลับด้วย Mobile phase ปริมาตร 1 mL และกรองด้วย filter ขนาด 0.45 um นำตัวอย่างที่ได้ฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป





การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

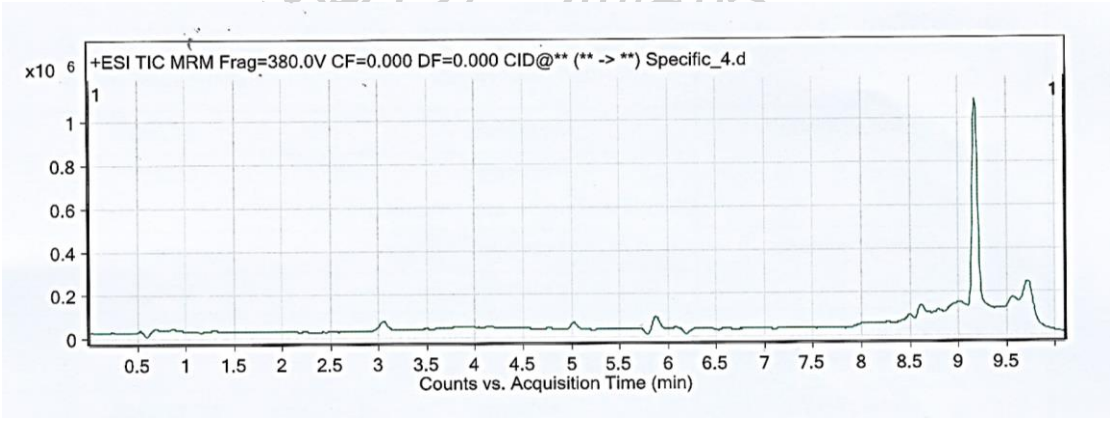
1. การศึกษา Selectivity and specificity

Specificity ทำได้โดยการทดสอบปัสสาวะ (blank urine) ที่เติมด้วยยาที่อยู่นอกขอบข่ายการทดสอบนี้ที่พบได้ทั่วไปร่วมกับกลุ่มแอมเฟตามีน (mixed drugs) จำนวน 40 ชนิด ที่ความเข้มข้น 200 ng/mL รายชื่อแสดงดังตาราง 15 ผลการทดสอบพบว่า ไม่พบสารที่รบกวนการวิเคราะห์ยาและสารเสพติด แสดงในรูปที่ 9

ส่วนการทดสอบ selectivity นั้น ทำได้โดยการทดสอบวิเคราะห์ปัสสาวะจาก 10 แหล่ง ผลการทดสอบพบว่า ไม่พบปัสสาวะที่รบกวนการวิเคราะห์ยาและสารเสพติด แสดงในรูปที่ 10

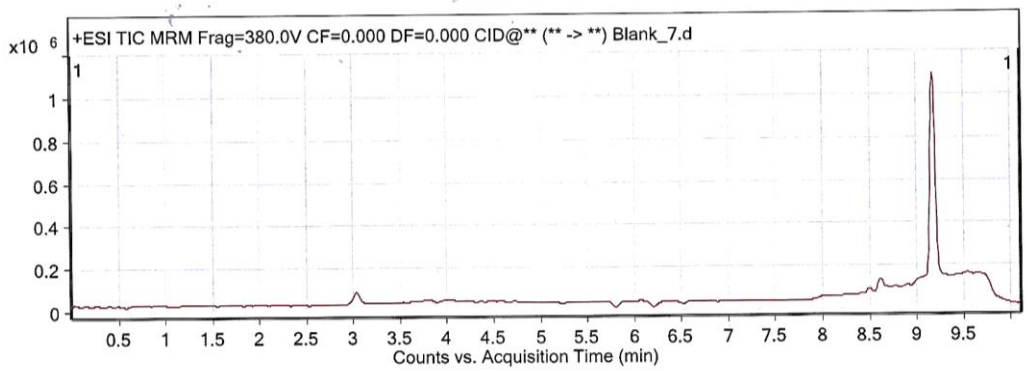
ตารางที่ 15 รายชื่อยาและสารเสพติดจำนวน 40 ชนิด ที่ความเข้มข้น 200 ng/mL ที่เติมในปัสสาวะเติมทดสอบ specificity

No.	Name	No.	Name	No.	Name	No.	Name
1	6-MAM	11	Fentanyl	21	Mitragynine	31	Phencyclidine
2	Alprazolam	12	Flunitrazepam	22	Morphine	32	Phenytoin
3	Amitriptyline	13	Haloperidol	23	Nitrazepam	33	Sentraline
4	Benzoylecgonine	14	Hydrocodone	24	Nordiazepam	34	Sertraline
5	Cocaine	15	Hydromorphone	25	Norfurazepam	35	Theophylline
6	Codeine	16	Lorazepam	26	Oxazepam	36	Tramadol
7	delta-9-THC	17	Methadane	27	Oxycodone	37	Trazodone
8	Diazepam	18	Methaqualone	28	Oxymorphone	38	Triazolam
9	Ephedrine	19	Methylphenidate	29	Paroxetine	39	Venlafaxine
10	Fenfluramine	20	Midazolam	30	Pentylone	40	Zolpidem



รูปที่ 9 TIC ของการทดสอบ Specificity

จะเห็นได้ว่า ไม่มี peak รบกวนในช่วง Retention time ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ดังนั้น ยาและสารเสพติดทั้ง 40 ชนิด จึงไม่รบกวนการตรวจหาปริมาณยาและสารเสพติดทั้ง 8 ชนิด

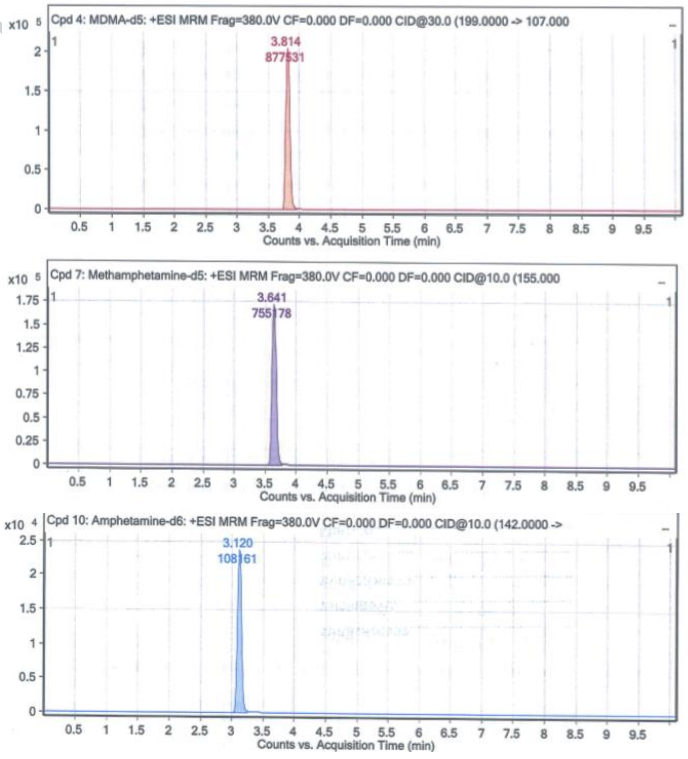


รูปที่ 10 TIC ของการทดสอบ Selectivity

จะเห็นได้ว่า ไม่มี peak รบกวนในช่วง Retention time ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ดังนั้น ปัสสาวะที่นำมาทดสอบ จึงไม่รบกวนการตรวจหาปริมาณยาและสารเสพติดทั้ง 8 ชนิด

2. การศึกษา Matrix Effect

2.1 ทดสอบการรบกวนของ internal standard 3 ชนิด คือ MDMA-d6 MA-d5 และ AM-d6 ที่ความเข้มข้น 250 ng/ml จากการทดสอบ พบว่า internal standard ทั้ง 3 ชนิด ไม่รบกวนการตรวจวิเคราะห์ ผลการทดสอบมีรายละเอียด ดังนี้



2.2 ทดสอบ Ionization suppression / enhancement

ผลการศึกษาถ้ามีค่าบวกหมายถึงเกิด ionization enhancement แต่ถ้ามีค่าลบหมายถึงเกิด ionization suppression โดยที่ เกณฑ์การยอมรับ คือ % Ionization suppression / enhancement ต้องไม่เกินช่วง±25% (SWGTOX, 2013)

การคำนวณมีดังนี้

$$\text{Ionization suppression /enhancement (\%)} = \left(\frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟเฉลี่ย ชุด } \mathbf{A}}{\text{พื้นที่ใต้ กราฟเฉลี่ย ชุด } \mathbf{B}} - 1\right) \times 100$$

โดยที่

ชุด A คือ ตัวอย่างปัสสาวะที่นำมาสกัดตามขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง แล้วจึงเติมสารมาตรฐานยาและสารเสพติด ความเข้มข้น 50 และ 500 ng/ml แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

ชุด B คือ สารมาตรฐานยาและสารเสพติด (Standard) ที่เตรียมให้มีความเข้มข้น 50 ng/ml และ 500 ng/ml ปริมาตร 1 mL ใส่ vial แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบ % Ionization suppression / enhancement ที่ความเข้มข้น 50 ng/mL

Analyte	**ตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารมาตรฐานยาและสารเสพติดภายหลังจากการสกัด (A)**	**สารมาตรฐานยาและสารเสพติด (B)**	**% Ionization suppression / enhancement ((A/B)-1) *100**
	peak area	**peak area**	
Ketamine	52942868	45157840.5	17.2
Nor-ketamine	459248	328941	39.6
MDEA	104136982	98599523	5.6
MDMA	96286502	86137454	11.8
MDA	9927030	8122657	22.2
Phentermine	1110917	529880	110
Methamphetamine	86216950	76901134	12.1
Amphetamine	10943811	9024025	21.3

จากผลการทดสอบ Ionization suppression/enhancement พบว่า

ที่ความเข้มข้น 50 ng/mL มีสารเสพติด 6 ชนิด ที่มีค่าระหว่าง 5.6-22.2% ซึ่งมีค่าไม่เกินช่วง ±25% อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ (SWGTOX, 2013) ยกเว้น Nor-ketamine และ Phentermine ที่ไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ เนื่องจากเกิด Ionization suppression ค่อนข้างสูง ดังนั้น จึงอาจส่งผลให้ตรวจไม่พบสารเสพติดดังกล่าวในตัวอย่างกรณีที่มีความเข้มข้นต่ำได้

ที่ความเข้มข้น 500 ng/mL สารเสพติดทั้งหมด มีค่าอยู่ระหว่าง -7.0-5.5% ซึ่งมีค่าไม่เกินช่วง ±25% อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ (SWGTOX, 2013) ดังนั้น Matrix ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์สารดังกล่าวที่ความเข้มข้น 500ng/mL แสดงดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบ % Ionization suppression / enhancement
ที่ความเข้มข้น 500 ng/mL

Analyte	ตัวอย่างปัสสาวะที่เติมสารมาตรฐานยาและสารเสพติดภายหลังจากการสกัด (A)	สารมาตรฐานยาและสารเสพติด (B)	% Ionization suppression / enhancement ((A/B)-1) *100
	peak area	peak area	
Ketamine	129368786	130396330	-0.8
Nor-ketamine	3463565	3283389	5.5
MDEA	223678821	223292491	0.2
MDMA	203778785	206768827	-1.5
MDA	58821024	60934391	-3.5
Phentermine	3736995	4017551	-7.0
Methamphetamine	185478116	184460017	0.6
Amphetamine	58400773	59412504	-1.7

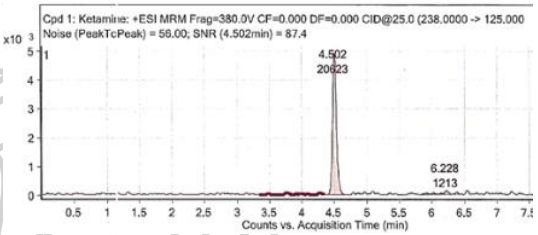
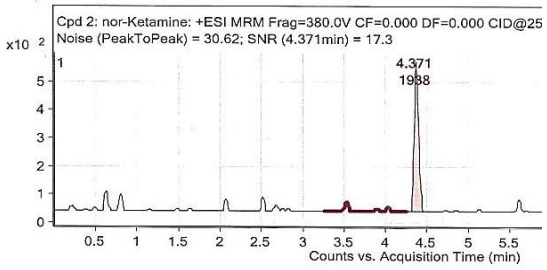
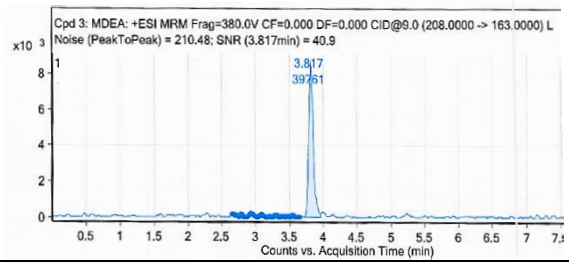
3. การศึกษา Limit of Detection (LOD)

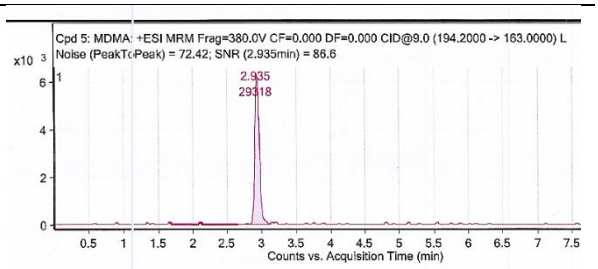
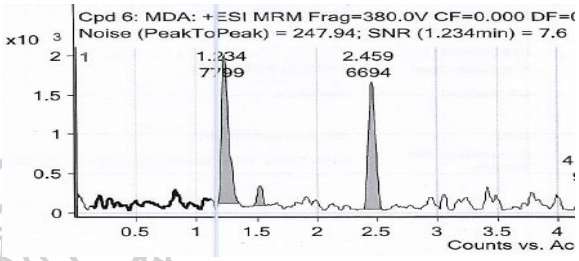
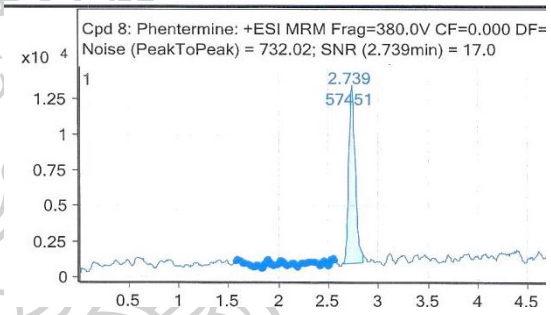
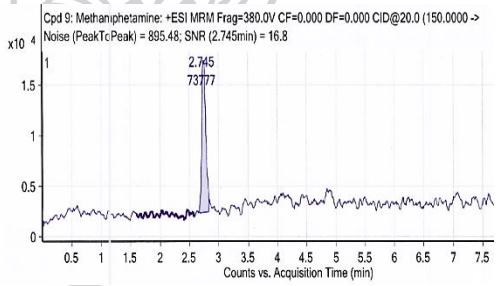
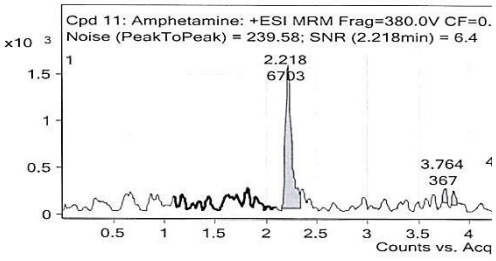
การทดสอบหาค่า LOD ทำโดยใช้ blank urine แล้วเติมสารมาตรฐานยาและสารเสพติดที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ ที่ 2, 5, 10, 15 และ 20 ng/mL แล้วทำการวิเคราะห์ใน blank urine 3 แหล่งๆละ 2 ซ้ำ แล้ววิเคราะห์ค่า signal-to-noise ratio (S/N) โดยการวิเคราะห์นี้ใช้ software ของ Agilent MassHunter Workstation Software โดยที่ LOD ต้องมีค่า signal-to-noise ratio (S/N) อย่างน้อยเท่ากับหรือมากกว่า 3 (S/N ≥3) (SWGTOX, 2013) รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 สรุปค่า LOD ของการตรวจวิเคราะห์ยาและสารเสพติดโดยเทคนิค LC/MS/MS

สารที่ต้องการวิเคราะห์	LOD (ng/mL)	S/N	ช่วงความเป็นเส้นตรง (ng/mL)
Ketamine	2	87.4	50-1500
Nor-ketamine	15	17.3	50-1500
MDEA	2	40.9	50-1500
MDMA	2	86.6	50-1500
MDA	10	7.6	50-1500
Phentermine	5	17.0	50-1500
Methamphetamine	2	16.8	50-1500
Amphetamine	5	6.4	50-1500

ตารางที่ 19 Chromatogram แสดงค่า S/N ของ ค่า LOD

Analyte	LOD (ng/mL)	Chromatogram
Ketamine	2	
Nor-ketamine	15	
MDEA	2	

MDMA	2	
MDA	10	
Phentermine	5	
Methamphetamine	2	
Amphetamine	5	

4. การศึกษา Lower Limit of Quantitative (LLOQ)

Lower Limit of quantitation (LLOQ) คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ โดยต้องมีค่า accuracy และ precision อยู่ที่ช่วงที่ยอมรับได้คือ ±20% (SWGTOX, 2013) ซึ่งในการทดสอบนี้ได้ใช้ความเข้มข้นต่ำสุดของ calibration curves เป็นค่า LLOQ

จากการศึกษา จะเห็นได้ว่า ค่า accuracy และ precision ที่ LLOQ นั้นพบว่า ค่าที่ได้ของยาและสารเสพติด จำนวน 8 ชนิด อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ ±20% โดยมีค่า %bias อยู่ระหว่าง -0.2 ถึง 3.0 ค่า %RSD อยู่ระหว่าง 6.3 ถึง 12.0 แสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ผลการศึกษา accuracy และ precision สำหรับ LLOQ (n=15)

Analyte	Expect conc. (ng/mL)	Observed conc. (ng/mL)	Accuracy (%Bias)	Precision (%RSD)
Ketamine	50	50.0	0	7.9
Nor-ketamine	50	51.5	3.0	8.5
MDEA	50	49.9	-0.2	8.8
MDMA	50	50.6	1.2	6.3
MDA	50	50.1	0.3	8.8
Phentermine	50	50.7	1.5	7.8
Methamphetamine	50	50.4	0.7	12.0
Amphetamine	50	50.8	1.7	7.5

5. การศึกษา Linearity

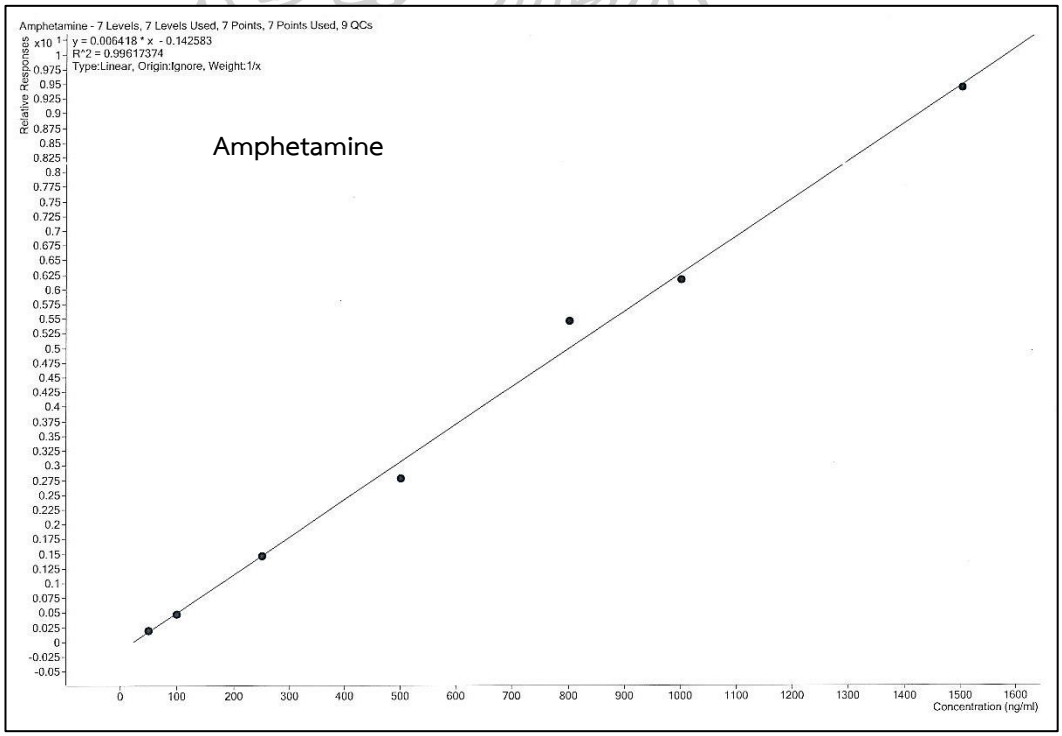
ช่วงของความเข้มข้นของ calibration curves ที่ใช้ในการศึกษายาและสารเสพติดทั้ง 8 ชนิด มีทั้งหมด 7 ความเข้มข้น คือ 50, 100, 250, 500, 800, 1000 และ 1500ng/mL ทำการวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมด 7 ซ้ำ เพื่อทดสอบ Calibration Model และสารเสพติดแต่ละชนิดจะใช้ internal standard ดังนี้ Amphetamine ใช้ Amphetamine-d6, Methamphetamine ใช้ Methamphetamine-d5 สำหรับ Ketamine และ Norketamine ใช้ MDMA-d5 นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ จะใช้ calibration model เป็น linear และ weight 1/x จากการศึกษาพบว่า ค่า Correlation Coefficient (r2) ของยาและสารเสพติดทุกชนิดใน 7 ซ้ำนั้น มีค่ามากกว่า 0.990 แสดง Calibration curve ดังตารางที่ 21

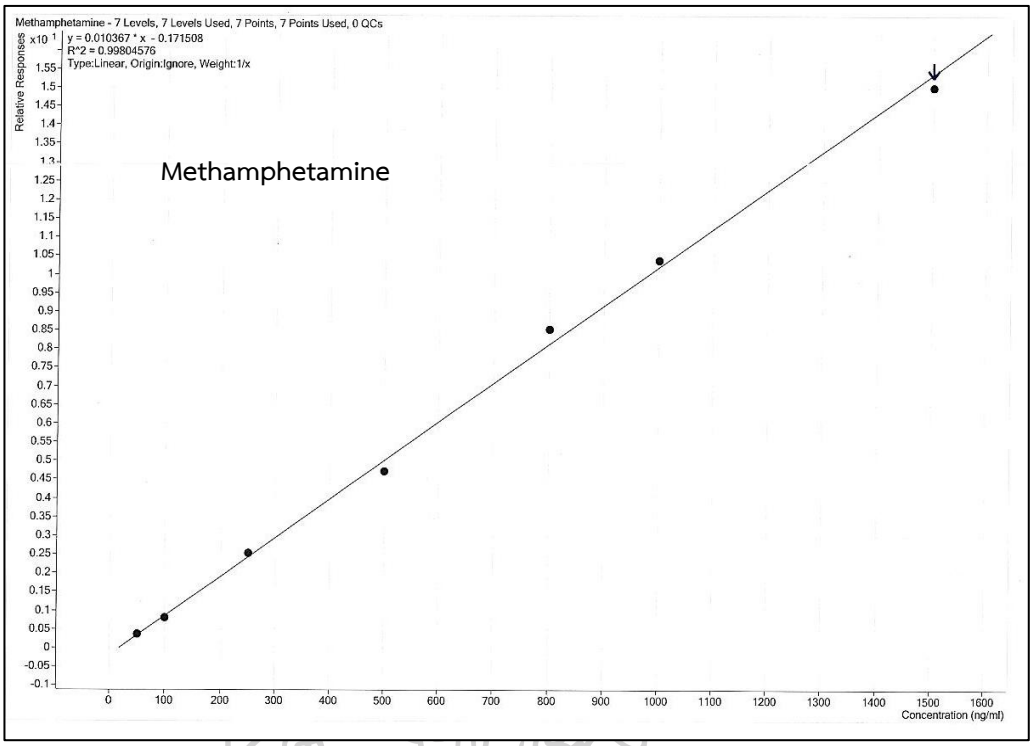
ตารางที่ 21 ช่วงความเป็นเส้นตรงของยาและสารเสพติด 8 ชนิด

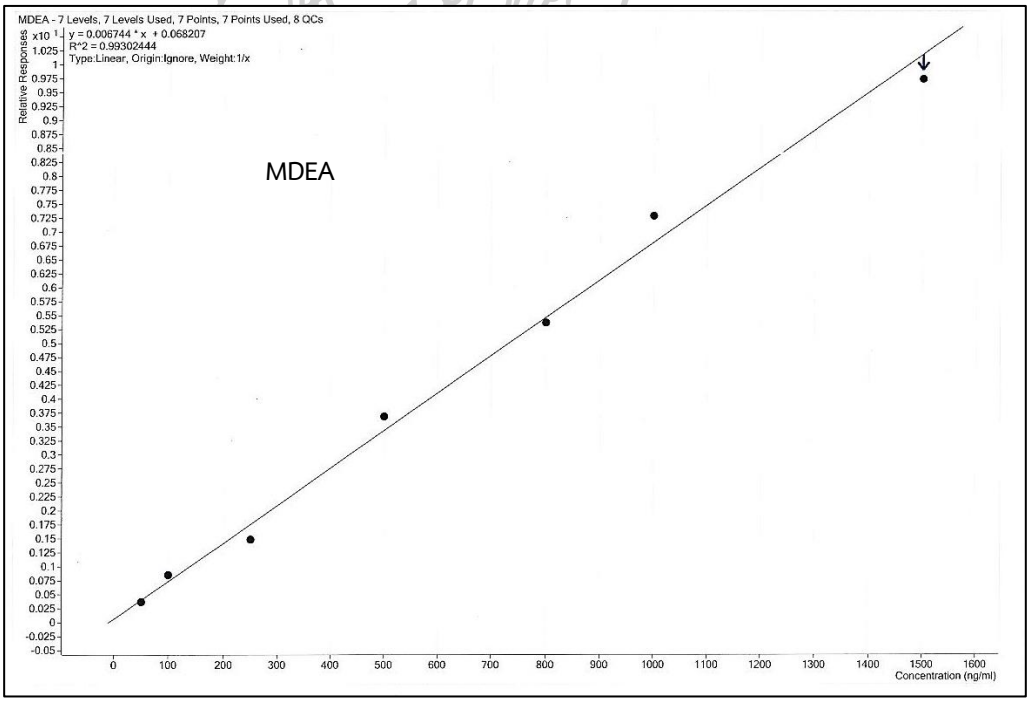
สารที่ต้องการวิเคราะห์	ช่วงความเป็นเส้นตรง (ng/mL)	Model	Weight	R^2
Ketamine	50-1500	Linear	1/x	≥ 0.99
Nor-ketamine	50-1500	Quadratic	1/x	≥ 0.99
MDEA	50-1500	Linear	1/x	≥ 0.99
MDMA	50-1500	Linear	1/x	≥ 0.99
MDA	50-1500	Linear	1/x	≥ 0.99
Phentermine	50-1500	Linear	1/x	≥ 0.99
Methamphetamine	50-1500	Quadratic	1/x	≥ 0.99
Amphetamine	50-1500	Linear	1/x	≥ 0.99

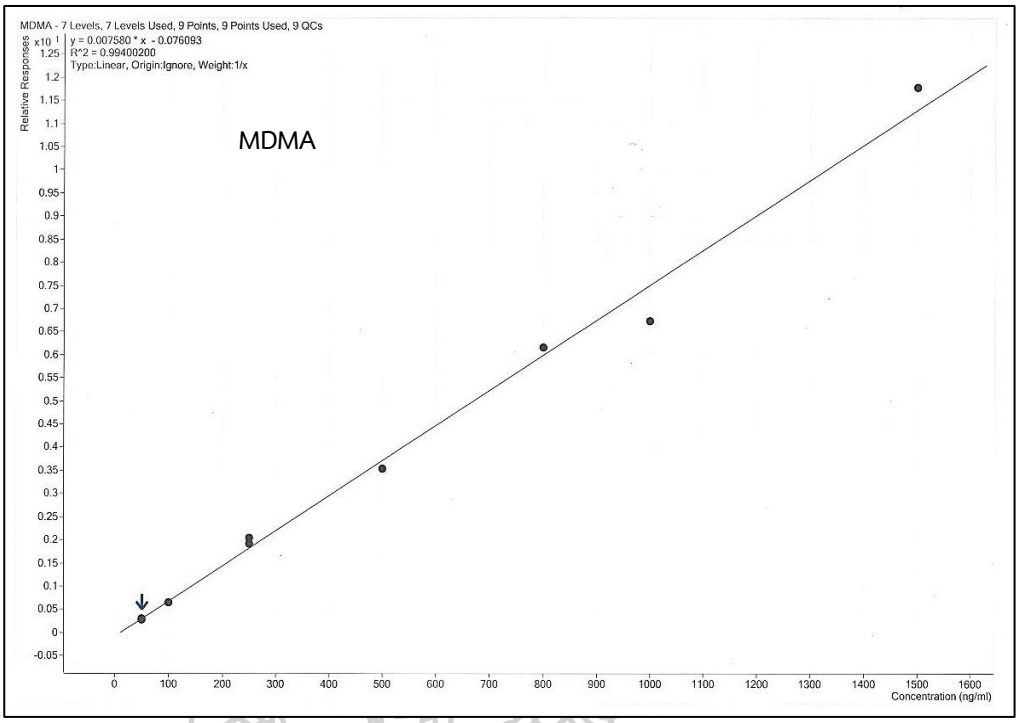
1/x weighting factor สำหรับ calibration curve ถูกใช้ในการดูค่าความสัมพันธ์ จากการศึกษาพบว่าค่า correlation coefficient (r^2) ของยาและสารเสพติดทุกชนิดนั้น มีค่า $r^2 \geq 0.99$ ซึ่ง ค่าดังกล่าวอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (SWGTOX, 2013) รูปที่ 11

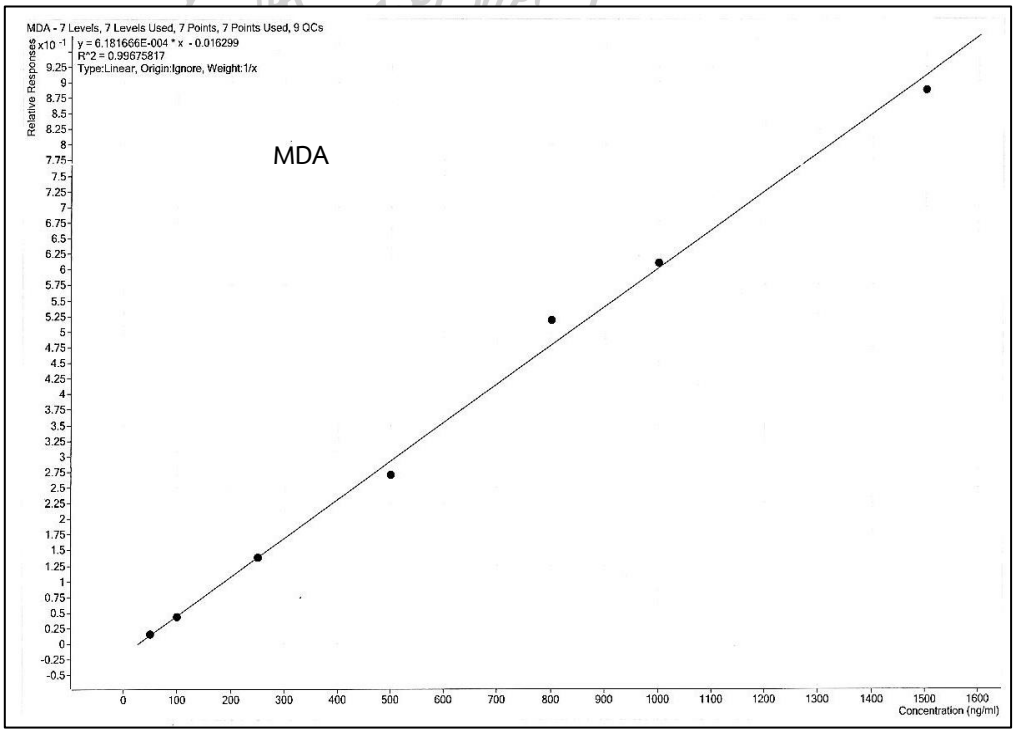
รูปที่ 11 Calibration curve ของยาและสารเสพติดแต่ละชนิด

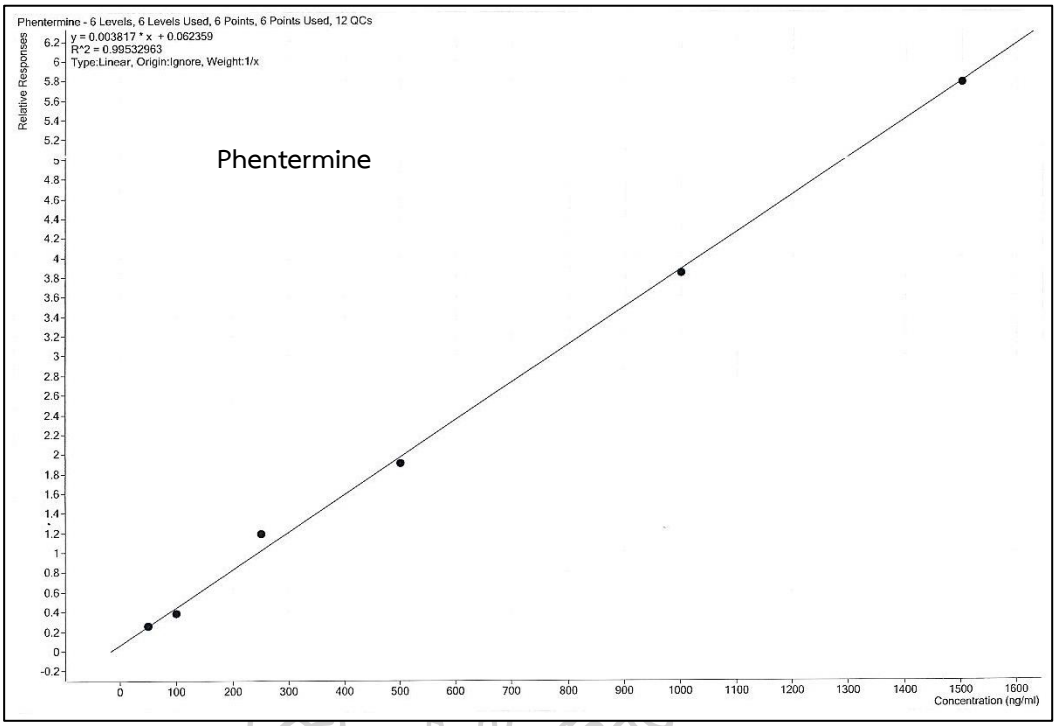


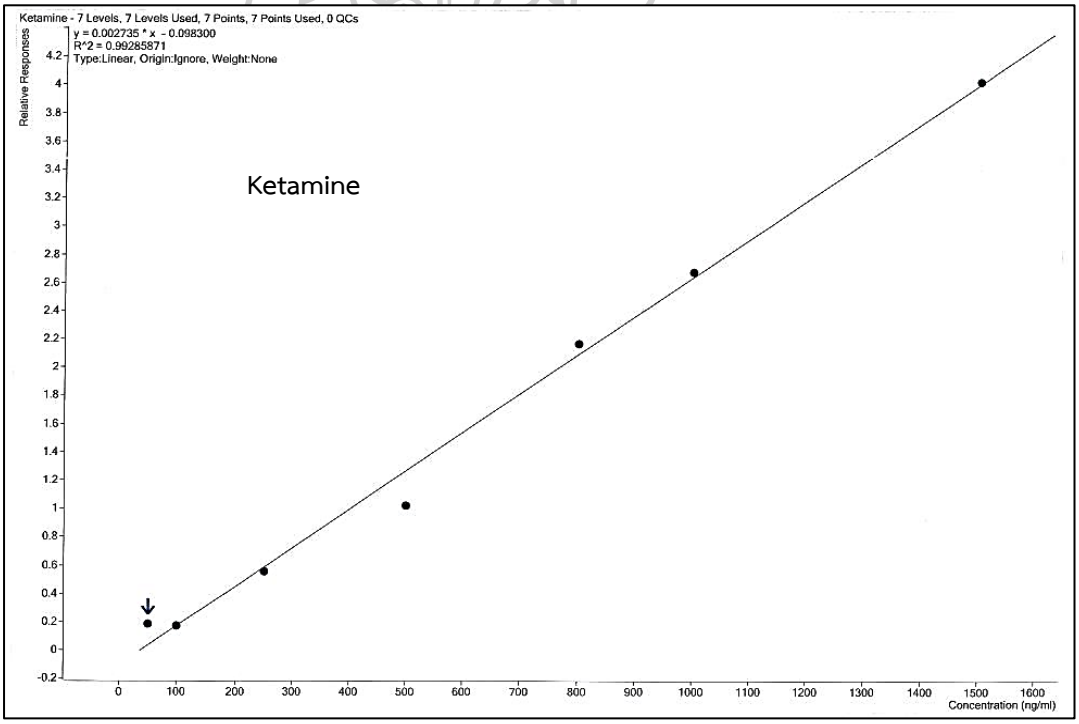

Methamphetamine - 7 Levels, 7 Levels Used, 7 Points, 7 Points Used, 0 QCs
y = 0.010367 * x - 0.171508
R^2 = 0.99804576
Type:Linear, Origin:Ignore, Weight:1/x
Relative Responses
Methamphetamine
Concentration (ng/ml)

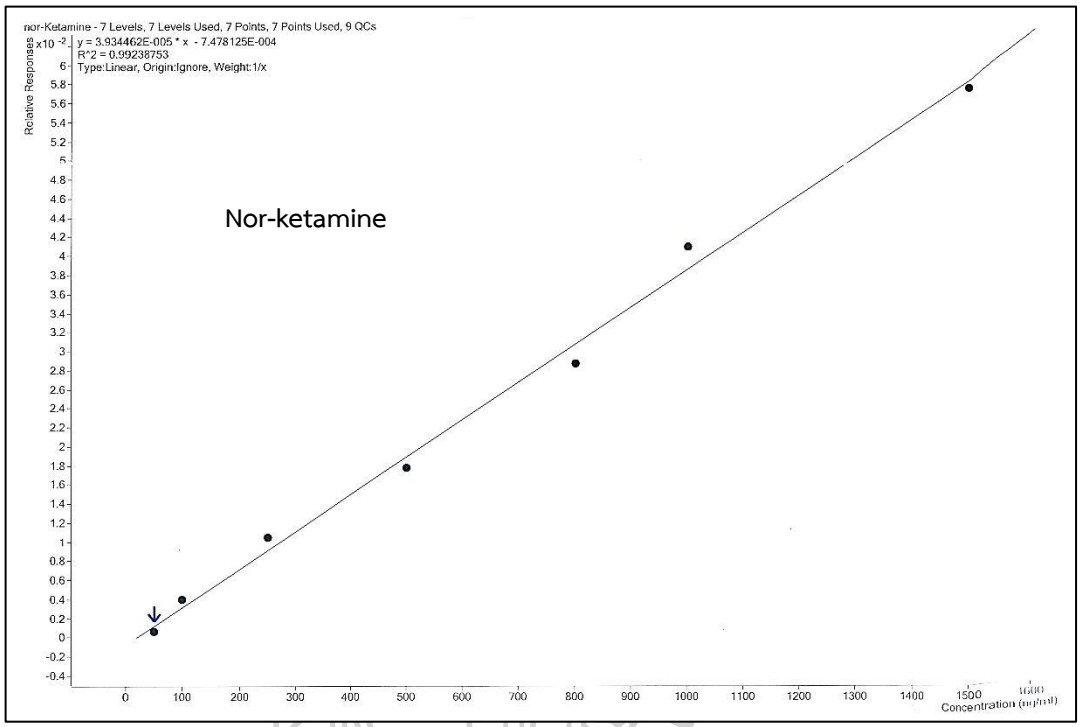

MDEA - 7 Levels, 7 Levels Used, 7 Points, 7 Points Used, 8 QCs
y = 0.006744 * x + 0.068207
R^2 = 0.99302444
Type:Linear, Origin:Ignore, Weight:1/x
Relative Responses
MDEA
Concentration (ng/ml)


MDMA - 7 Levels, 7 Levels Used, 9 Points, 9 Points Used, 9 QCs
y = 0.007580 * x - 0.076093
R^2 = 0.99400200
Type:Linear, Origin:Ignore, Weight:1/x
Relative Responses
x10 1
MDMA
Concentration (ng/ml)


MDA - 7 Levels, 7 Levels Used, 7 Points, 7 Points Used, 9 QCs
y = 6.181666E-004 * x - 0.016299
R^2 = 0.99675817
Type:Linear, Origin:Ignore, Weight:1/x
Relative Responses
x10 -1
MDA
Concentration (ng/ml)


Phentermine - 6 Levels, 6 Levels Used, 6 Points, 6 Points Used, 12 QCs
y = 0.003817 * x + 0.062359
R^2 = 0.99532963
Type:Linear, Origin:Ignore, Weight:1/x
Relative Responses
Phentermine
Concentration (ng/ml)


Ketamine - 7 Levels, 7 Levels Used, 7 Points, 7 Points Used, 0 QCs
y = 0.002735 * x - 0.098300
R^2 = 0.99285871
Type:Linear, Origin:Ignore, Weight:None
Relative Responses
Ketamine
Concentration (ng/ml)



6. การศึกษา Accuracy และ Precision

Accuracy และ precision สามารถวัดได้โดยใช้ quality control samples (QCs) ที่ความเข้มข้นต่างกัน 3 ความเข้มข้น คือ 100, 500 และ 1000 ng/mL แล้วทำการวิเคราะห์หาค่า within-day, between-day precision และ %bias

จากการทดสอบค่า between-day precision และ accuracy ของยาและสารเสพติดจำนวน 8 ชนิด ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 100, 500 และ 1000 ng/mL พบว่าค่าที่ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ ±20% (SWGTOX, 2013) โดยมีค่า%bias อยู่ระหว่าง -7.22 ถึง 11.4 และค่า %RSD อยู่ระหว่าง 1.1 ถึง 9.5 (n=21) รายละเอียดดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 ค่า between-day precision และ accuracy การตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาและสารเสพติดในปัสสาวะ (n=21)

Analyte	QC level	Expect conc. (ng/mL)	Observed conc. (ng/mL)	Accuracy (%Bias)	Precision (%RSD)
Ketamine	Low	100	**97.8**	-2.16	1.1
	Medium	500	**463.9**	-7.22	8.3
	High	1000	**972.0**	-2.80	7.5
Nor-ketamine	Low	100	**111.4**	11.4	6.4
	Medium	500	**478.8**	-4.25	9.5
	High	1000	**1000.2**	0.02	6.6
MDEA	Low	100	**102.0**	2.0	6.6
	Medium	500	**506.0**	1.2	5.9
	High	1000	**1012.5**	1.2	5.6
MDMA	Low	100	**100.1**	0.10	7.9
	Medium	500	**515.8**	3.17	7.2
	High	1000	**1016.1**	1.61	6.3
MDA	Low	100	**99.6**	-3.45	9.4
	Medium	500	**486.6**	-2.68	8.5
	High	1000	**1035.3**	3.53	7.9
Phentermine	Low	100	**99.8**	-0.22	2.5
	Medium	500	**496.5**	-0.71	8.9
	High	1000	**1000.8**	0.08	7.4
Methamphetamine	Low	100	**99.9**	-0.14	7.9
	Medium	500	**514.4**	2.88	5.0
	High	1000	**1031.4**	3.14	7.7
Amphetamine	Low	100	**99.7**	-0.29	7.6
	Medium	500	**511.8**	2.35	6.2
	High	1000	**1039.1**	3.91	1.5

จากการทดสอบค่า within-day precision และ accuracy ของยาและสารเสพติด จำนวน 8 ชนิด ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 100, 500 และ 1000 ng/mL พบว่าค่าที่ได้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้คือ ±20% (SWGTOX, 2013) โดยมีค่า%bias อยู่ระหว่าง -13.39 ถึง 8.18 และค่า %RSD อยู่ระหว่าง 1.5 ถึง 19.4 (n=4) รายละเอียดดังตารางที่ 23

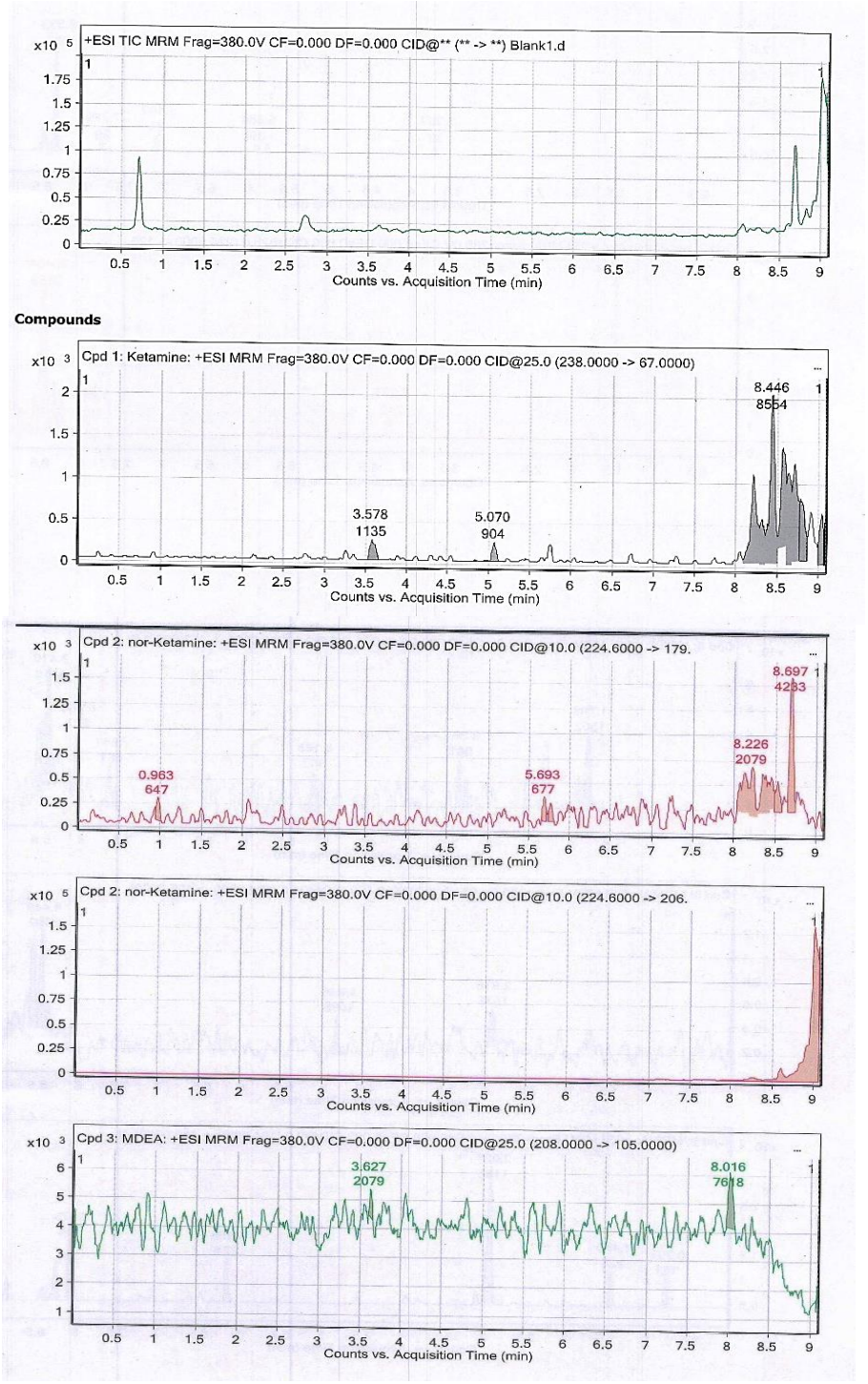
ตารางที่ 23 ค่า within-day precision และ accuracy การตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาและสารเสพติดในปัสสาวะ (n=4)

Analyte	QC level	Expect conc. (ng/mL)	Observed conc. (ng/mL)	Accuracy (%Bias)	Precision (%RSD)
Ketamine	Low	100	**97.3**	-2.72	16.5
	Medium	500	**540.6**	8.12	18.6
	High	1000	**1011.1**	1.11	6.4
Nor-ketamine	Low	100	**98.3**	-1.75	15.4
	Medium	500	**463.0**	-7.40	9.4
	High	1000	**1005.1**	0.51	7.3
MDEA	Low	100	**95.2**	-4.83	6.4
	Medium	500	**433.1**	-13.39	6.0
	High	1000	**1051.7**	5.17	9.9
MDMA	Low	100	**108.2**	8.18	14.4
	Medium	500	**480.7**	-3.86	11.2
	High	1000	**1009.5**	0.95	6.7
MDA	Low	100	**97.4**	-2.65	5.6
	Medium	500	**526.7**	5.33	11.6
	High	1000	**962.5**	-3.75	7.4
Phentermine	Low	100	**100.1**	0.13	19.1
	Medium	500	**502.3**	-0.04	19.4
	High	1000	**1002.0**	0.20	11.6
Methamphetamine	Low	100	**99.2**	-0.78	15.2
	Medium	500	**498.0**	-0.41	12.2
	High	1000	**992.3**	-0.77	14.2
Amphetamine	Low	100	**98.1**	-1.88	8.1
	Medium	500	**488.0**	-2.41	6.5
	High	1000	**1028.1**	2.81	1.5

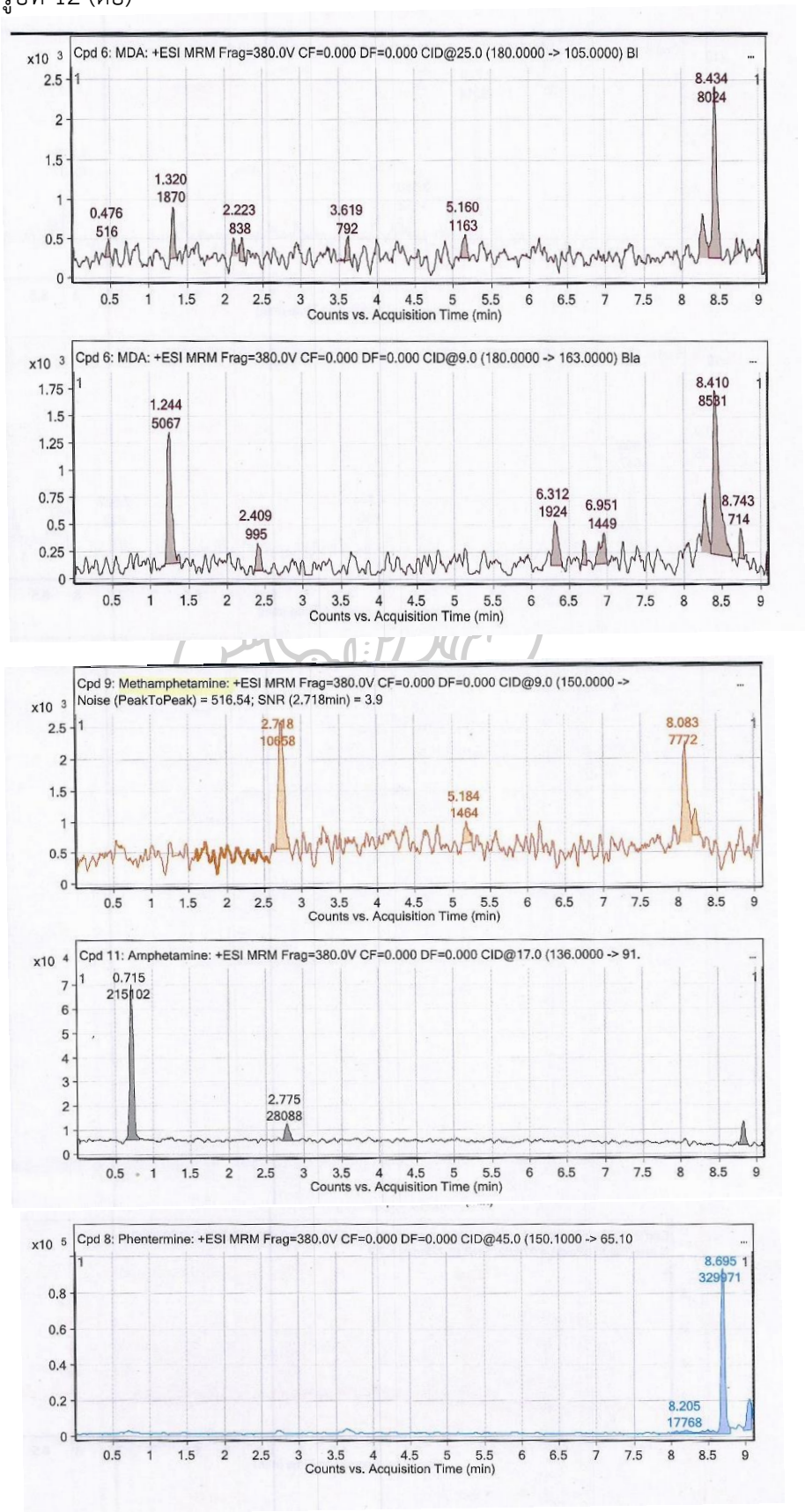
7. การศึกษาการตกค้างของสารตัวอย่างในระบบหลังจากการวิเคราะห์ (Carry over)

ศึกษาโดยการเตรียมตัวอย่างปัสสาวะตามขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS โดยให้ลำดับการวิเคราะห์ต่อจาก vial ที่มีการเตรียมความเข้มข้นไว้ที่ 3000 ng/ml ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ซ้ำ เพื่อจะตรวจสอบว่าจะมีการตกค้างของสารตัวอย่างในระบบหลังจากการวิเคราะห์หรือไม่ ซึ่งจากการศึกษา พบว่าสารเสพติดทุกชนิดไม่มีการตกค้างในระบบ และไม่ส่งผลต่อการวิเคราะห์กรณีที่สารตัวอย่างมีความเข้มข้นสูง รายละเอียดแสดงดังภาพที่ 12

รูปที่ 12 Chromatogram ของการศึกษา carryover ของสารแต่ละชนิด



รูปที่ 12 (ต่อ)


Cpd 6: MDA: +ESI MRM Frag=380.0V CF=0.000 DF=0.000 CID@25.0 (180.0000 -> 105.0000) Bl
0.476 516
1.320 1870
2.223 838
3.619 792
5.160 1163
8.434 8024
Counts vs. Acquisition Time (min)
Cpd 6: MDA: +ESI MRM Frag=380.0V CF=0.000 DF=0.000 CID@9.0 (180.0000 -> 163.0000) Bla
1.244 5067
2.409 995
6.312 1924
6.951 1449
8.410 8531
8.743 714
Counts vs. Acquisition Time (min)
Cpd 9: Methamphetamine: +ESI MRM Frag=380.0V CF=0.000 DF=0.000 CID@9.0 (150.0000 ->
Noise (PeakToPeak) = 516.54; SNR (2.718min) = 3.9
2.718 10658
5.184 1464
8.083 7772
Counts vs. Acquisition Time (min)
Cpd 11: Amphetamine: +ESI MRM Frag=380.0V CF=0.000 DF=0.000 CID@17.0 (136.0000 -> 91.
0.715 215102
2.775 28088
Counts vs. Acquisition Time (min)
Cpd 8: Phentermine: +ESI MRM Frag=380.0V CF=0.000 DF=0.000 CID@45.0 (150.1000 -> 65.10
8.205 17768
8.695 329971
Counts vs. Acquisition Time (min)

8. การศึกษาความเสถียร (Stability)

การทดสอบความเสถียรของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 50 และ 500ng/mL ซึ่งอยู่ใน auto sampler ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 ชั่วโมง พบว่าได้ผลการทดสอบสรุปดังนี้

ที่ความเข้มข้น 50 ng/mL มียาและสารเสพติด จำนวน 8 ชนิด มีค่าความเสถียรของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึง 30 ชั่วโมง ระหว่าง 80% ถึง 119% มีค่าไม่เกินช่วง ±20% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ (SWGTOX, 2013) ยกเว้น MDMA และ Amphetamine ที่มีบางช่วงที่ค่าไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ แสดงดังตารางที่ 24

ตารางที่ 24 ข้อมูลการทดสอบ stability ที่ เวลาต่างๆ ของสารมาตรฐานยาและสารเสพติดในปัสสาวะที่ความเข้มข้น 50ng/mL ณ เวลา เริ่มต้น ถึง 30 ชั่วโมง

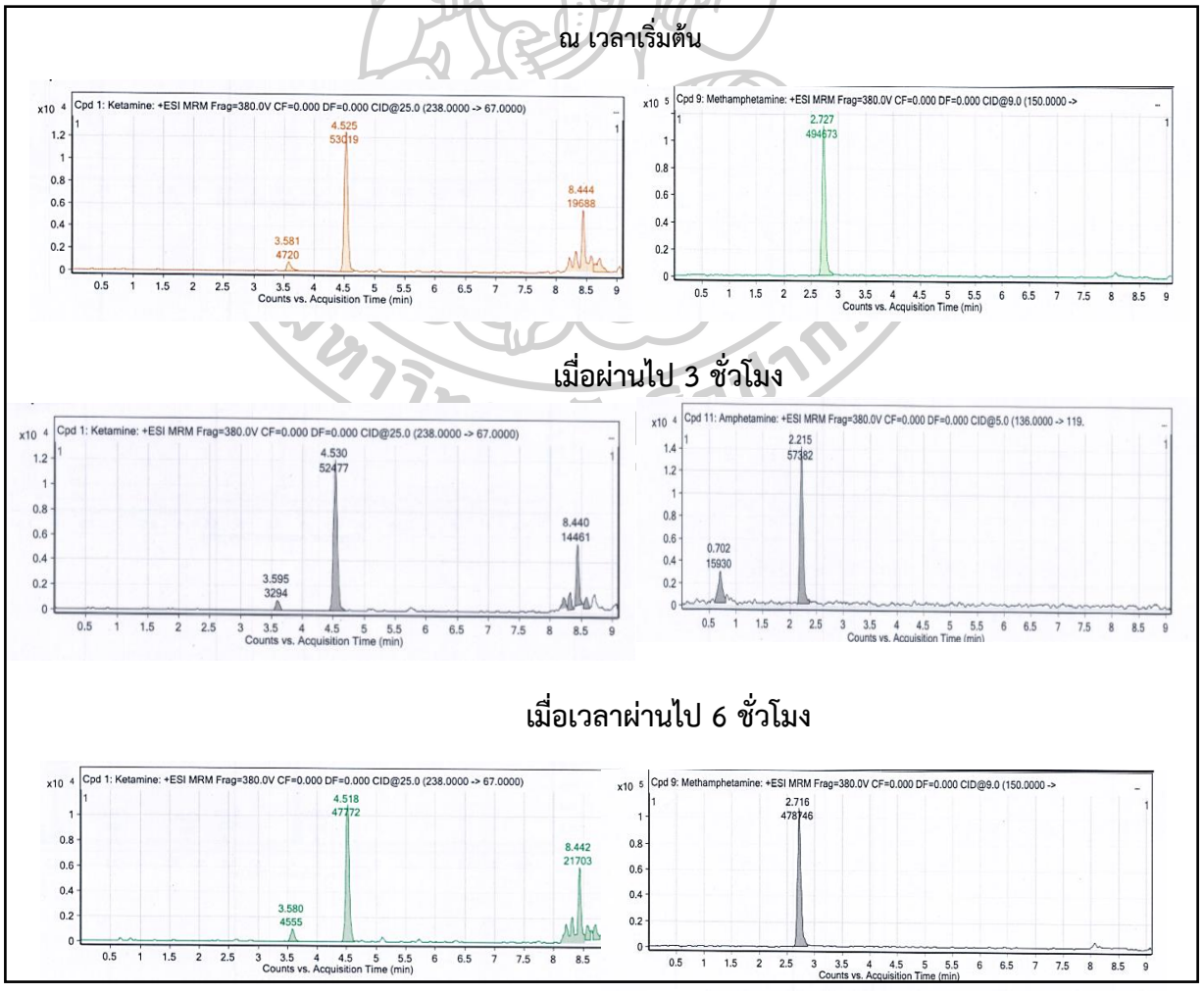
Concentration	Stability at 50ng/mL										
hr	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
Ketamine	100	94	94	85	96	96	101	103	103	98	101
Nor-ketamine	100	97	91	83	80	86	86	89	90	87	94
MDEA	100	98	95	83	91	91	97	103	103	102	100
MDMA	100	82	82	78	84	84	104	98	98	101	100
MDA	100	89	83	82	86	86	116	109	109	110	107
Phentermine	100	96	91	84	94	94	99	96	95	109	106
Methamphetamine	100	86	84	80	82	82	105	99	99	107	107
Amphetamine	100	82	84	72	76	80	113	121	119	114	112

ที่ความเข้มข้น 500 ng/mL มียาและสารเสพติด จำนวน 8 ชนิด มีค่าความคงทนของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึง 30 ชั่วโมง ระหว่าง 83% ถึง 112% มีค่าไม่เกินช่วง ±20% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ (SWGTOX, 2013) ยกเว้น MDEA และ Nor-ketamine บางช่วงที่ค่าไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับ แสดงดังตารางที่ 25

ตารางที่ 25 ข้อมูลการทดสอบ stability ที่ เวลาต่างๆ ของสารมาตรฐาน
ยาและสารเสพติดในปัสสาวะ ที่ความเข้มข้น 500ng/mL ณ เวลา เริ่มต้น ถึง 30 ชั่วโมง

Concentration	%Stability at 500ng/mL										
hr	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
Ketamine	100	97	101	102	93	93	97	97	92	106	102
Nor-ketamine	100	83	90	77	90	90	103	103	97	95	98
MDEA	100	92	94	93	92	92	101	99	93	121	121
MDMA	100	96	97	99	96	96	102	103	103	106	106
MDA	100	99	90	96	90	90	108	107	107	104	103
Phentermine	100	97	93	99	94	94	96	97	97	107	106
Methamphetamine	100	98	94	92	93	93	99	102	102	102	100
Amphetamine	100	104	96	99	98	98	105	102	102	108	112

รูปที่ 13 ตัวอย่างยาและสารเสพติดที่ยังคงมีความเสถียรเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้องตั้งแต่เริ่ม
เริ่มต้นเป็นเวลา 6 ชั่วโมง



ผลการประยุกต์วิธีที่พัฒนาขึ้น

ประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างปัสสาวะ โดยนำตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจเบื้องต้นด้วย Strip test ของ Methamphetamine เป็นบวก และตัวอย่างปัสสาวะที่เติมยาและสารเสพติดที่ทราบค่าแน่นอน จำนวน 28 ตัวอย่าง รวมทั้งศึกษาเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์แบบเดิม คือ เทคนิค Derivatize GC-MS ได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้

1. ตัวอย่างปัสสาวะที่เติมยาและสารเสพติดที่ทราบค่าแน่นอน ทั้งหมด 5 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ คือ 100, 300, 500 1000 และ 1200 ng/mL ได้ผลการทดสอบ ดังตารางที่ 26

ตารางที่ 26 ผลการทดสอบความถูกต้อง แม่นยำของยาและสารเสพติดที่ทราบค่าแน่นอนที่ความเข้มข้นต่างๆ

Analyte	100 ng/ml			300 ng/ml			500 ng/ml		
	Mean (n=3)	Accuracy	%RSD	Mean (n=3)	Accuracy	%RSD	Mean (n=3)	Accuracy	%RSD
Ketamine	**99.5**	99.5	4.2	**263.4**	96.0	10.8	**475.5**	95.1	11.7
Nor-ketamine	**113.9**	113.9	5.2	**359.3**	119.8	6.8	**492.6**	98.5	11.2
MDEA	**100.3**	100.3	5.7	**301.3**	100.4	9.4	**506.5**	101.3	6.0
MDMA	**99.6**	99.6	9.1	**304.6**	101.5	4.5	**508.6**	101.7	8.4
MDA	**98.9**	98.9	8.2	**279.7**	93.2	4.9	**489.4**	97.9	6.8
Phentermine	**99.9**	99.9	10.5	**321.4**	107.1	0.3	**512.8**	102.6	7.9
Methamphetamine	**100.1**	100.1	10.1	**305.8**	101.9	0.3	**515.8**	103.2	6.7
Amphetamine	**99.2**	99.2	10.5	**315.5**	105.2	1.3	**499.0**	99.8	3.9

ตารางที่ 26 (ต่อ)

Analyte	1000 ng/ml			1200 ng/ml		
	Mean (n=3)	Accuracy	%RSD	Mean (n=3)	Accuracy	%RSD
Ketamine	**1007.5**	100.8	7.3	**1252.5**	104.4	16.7
Nor-ketamine	**1016.4**	101.6	6.7	**1390.0**	115.8	11.2
MDEA	**994.1**	99.4	7.5	**1302.6**	108.5	1.5
MDMA	**1001.6**	100.2	8.6	**1279.4**	106.6	4.3
MDA	**1019.4**	101.9	9.2	**1237.7**	103.1	8.7
Phentermine	**1012.5**	101.3	8.8	**1032.0**	86.0	6.2
Methamphetamine	**1005.2**	100.5	8.2	**1276.7**	106.4	10.6
Amphetamine	**1017.9**	101.8	9.6	**1369.1**	114.1	3.5

2. ตัวอย่างปัสสาวะที่มีผลการตรวจด้วยเทคนิค Strip test เป็นบวก จำนวน 13 ตัวอย่าง เปรียบเทียบผลที่ได้จาการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Derivatize GC-MS โดยผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Derivatize GC-MS ผู้วิจัยได้อ้างอิงผลจากวิธีการวิเคราะห์ของกลุ่มตรวจพิสูจน์ทางเคมี สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ ซึ่งตัวอย่างทั้ง 13 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างเดียวกันกับที่นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS ได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้

ตารางที่ 27 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS กับเทคนิค GC-MS

Sample	Amphetamine		Methamphetamine	
	ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS (ng/ml)	ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS (ng/ml)	ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS (ng/ml)	ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS (ng/ml)
Sample 1	129.34	172.49	956.90	1286.44
Sample 2	488.16	612.11	1621.48*	2961.86
Sample 3	27.85*	0	97.79	126.45
Sample 4	178.60	224.27	830.28	1103.58
Sample 5	21.85*	0	71.70	139.00
Sample 6	101.79	131.55	384.09	547.49
Sample 7	155.77	225.07	964.52	1361.15
Sample 8	59.11	98.98	534.93	667.08
Sample 9	36.03*	82.59	39.88*	95.64
Sample 10	155.62	157.28	1047.06	1271.49
Sample 11	460.18	465.12	1285.14	1504.21
Sample 12	297.73	381.13	606.13	799.12
Sample 13	3225.85*	2777.01	9317.86*	30512.37

*ค่า linearity อยู่ในช่วง 50-1500 ng/ml

จากการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS กับเทคนิค GC-MS นำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยค่า paired t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ค่าที่ได้จาก 2 เทคนิค พบว่า t-stat จากการคำนวณ มีค่าน้อยกว่า t-critical (t-stat = 0.020 สำหรับ Amphetamine, t-stat= -1.18 สำหรับ Methamphetamine) แสดงว่า ทั้งสองเทคนิคไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ รายละเอียดแสดง ดังตารางที่ 28

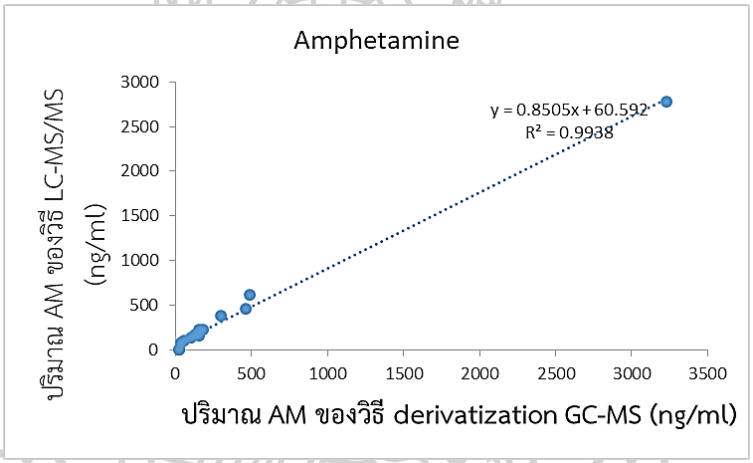
ตารางที่ 28 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติระหว่าง 2 วิธี ด้วย paired t-test

ผลการวิเคราะห์ด้วย paired t-test	Amphetamine		Methamphetamine	
	ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS	ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS	ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS	ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS
n	13	13	13	13
Mean	410.6	409.8	1366.0	3259.7
t stat	0.020		-1.18	
t-critical	1.782	2.178	1.782	2.178
P	0.492*	0.984*	0.131*	0.262*

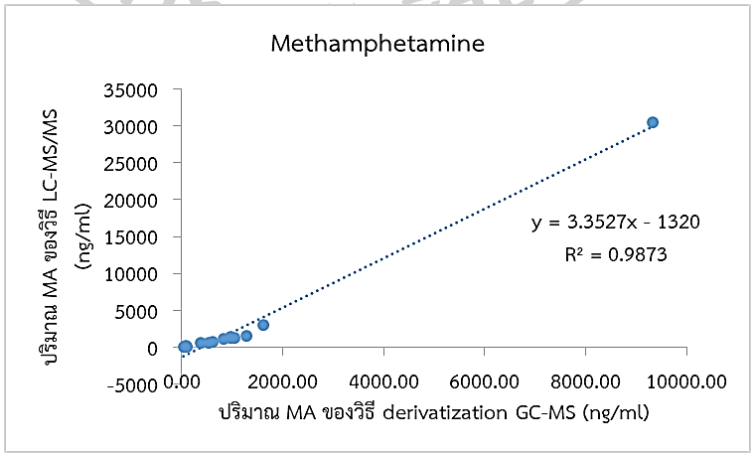
*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

นอกจากนี้ เมื่อนำผลการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นทั้ง Amphetamine และ Methamphetamine ที่ได้จากทั้ง 2 วิธี ดังตารางที่ 27 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น Amphetamine/ Methamphetamine (ng/ml) ของวิธี LC-MS/MS (แกนy) และวิธี derivatization GC-MS (แกนx) ดังรูปที่ 14 และ 15 จากกราฟในรูปที่ 14 จะเห็นได้ว่า ปริมาณ Amphetamine จากทั้ง 2 วิธีนี้ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน และมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงที่ดี (r^2= 0.9938) และได้สมการ คือ y=0.8505x+60.592

และจากกราฟในรูปที่ 15 จะเห็นได้ว่า ปริมาณ Methamphetamine จากทั้ง 2 วิธีนี้ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน และมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (r^2= 0.9873) และได้สมการ คือ y=3.3527x-1320 จากการวิเคราะห์ความเป็นเส้นตรงนี้ แสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์ด้วยสองเทคนิคนี้ สามารถนำมาใช้ในการหาปริมาณ Amphetamine และ Methamphetamine ได้



รูปที่ 14 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น Amphetamine (ng/ml) ของวิธี LC-MS/MS (แกนy) และวิธี derivatization GC-MS (แกนx)



รูปที่ 15 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น Methamphetamine (ng/ml) ของวิธี LC-MS/MS (แกนy) และวิธี derivatization GC-MS (แกนx)

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาปริมาณยาและสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน และเคตามีน รวมทั้งเมตาบอไลต์ในปัสสาวะ ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ Amphetamine, Methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, Phentermine, Ketamine และ Nor-ketamine เทคนิค LC/MS/MS นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น กับตัวอย่างปัสสาวะที่ทราบค่า และเปรียบเทียบกับเทคนิค GC-MS โดยสามารถสรุปภาพรวมของผลการวิจัยดังนี้

1. วิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาปริมาณยา และสารเสพติด กลุ่มแอมเฟตามีน และเคตามีน รวมทั้งเมตาบอไลต์ในปัสสาวะได้ โดยสามารถแก้ปัญหาในกรณีที่ตัวอย่างมีปริมาณจำกัดได้ เนื่องจากใช้ปริมาณปัสสาวะเพียง 100 ไมโครลิตร ซึ่งจะช่วยแก้ปัญหากรณีที่ตัวอย่างที่ส่งตรวจพิสูจน์มีปริมาณจำกัด การเตรียมตัวอย่างทำได้ง่าย และใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 9 นาที

2. จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) นั้นพบว่าวิธีการทดสอบนี้มีความถูกต้องและแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาและสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน และเคตามีน รวมทั้งเมตาบอไลต์ในปัสสาวะ ทั้ง 8 ชนิด โดยวิธีการที่พัฒนาขึ้นมานี้มีความจำเพาะ (Selectivity) ในการตรวจแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ มีค่า Linearity, Accuracy, Precision และ Matrix Effect อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ มีค่า LOD อยู่ในช่วง 2-15 ng/mL และมีค่า LLOQ อยู่ที่ 50 ng/mL ซึ่งครอบคลุมระดับที่กฎหมายกำหนด ดังนั้น วิธีการทดสอบนี้มีความเหมาะสม ที่จะนำไปใช้ในการการตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาและสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน และเคตามีน รวมทั้งเมตาบอไลต์ในปัสสาวะ และรายงานผลการวิเคราะห์ได้ และกรณีการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความเข้มสูงกว่าค่าสูงสุดของ Calibration curve ต้องมีการ dilute ตัวอย่างให้มีความเข้มข้นในช่วงของ Calibration curve และสำหรับกรณี Retention time ของ Phentermine และ Norketamine มีค่าเท่ากันนั้น ในการวิเคราะห์ให้พิจารณาจาก Precursor ion (m/z) และ Product ion(m/z) ซึ่งทั้งสองมีค่าต่างกัน ดังนั้น วิธีการทดสอบนี้สามารถที่จะนำไปใช้ในการการตรวจวิเคราะห์ปริมาณยาและสารเสพติดกลุ่มแอมเฟตามีน และเคตามีน รวมทั้งเมตาบอไลต์ในปัสสาวะ และรายงานผลการวิเคราะห์ได้

3. จากการประยุกต์ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้น กับตัวอย่างปัสสาวะที่ทราบค่า พบว่า มีค่า Accuracy อยู่ในช่วง 86 ถึง 119.8 และ %RSD อยู่ในช่วง 0.3 ถึง 16.7 และจากการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับเทคนิค GC-MS ด้วย paired t-test พบว่า ทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่วิธีที่พัฒนาขึ้นมีขีดความสามารถในการวิเคราะห์ที่ดีกว่า ได้แก่ ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อยกว่า 10 เท่า ใช้เวลาการวิเคราะห์เพียง 9 นาที รวมทั้งมี Sensitivity และ Specificity สูงกว่า

ข้อเสนอแนะ

1. ในการวิจัยนี้ศึกษายาและสารเสพติด จำนวน 8 ชนิด ดังนั้น ควรศึกษาเพิ่มเติมชนิดอื่นๆ เช่น Mitrgynine ซึ่งเจอได้ในกระท่อม เพื่อให้งานวิจัยมีความครอบคลุมและเป็นประโยชน์ต่อเจ้าหน้าที่ในการสืบสวนสอบสวนคดี ที่เกี่ยวข้องกับสารเสพติดในปัสสาวะ และเพื่อเป็นประโยชน์ต่องานด้านนิติวิทยาศาสตร์ต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ณัฐ ตันศรีสวัสดิ์ และศิรินันท์ เอี่ยมภักดิ์. (2550). นิติพิษวิยา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

แม้น อมรสิทธิ์ และคณะ (2555). หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์ 50.

ยกเชื้อ, ธ. (2561). การพัฒนาวิธีและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการตรวจหาปริมาณยาในเลือดโดยเทคนิค Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ตามแนวทางมาตรฐานสากล. อาชญาวิทยาและนิติวิทยาศาสตร์, *4*(1), 1-14.

สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.(2558). วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจพิสูจนสารเสพติดในปสสาวะเลมที่1. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์คงเกียรติการพิมพ์,

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. ส่านักงานยาและวัตถุเสพติด. (2558). วิธีมาตรฐานส่าหรับการตรวจพิสูจน์สารเสพ ติดในปัสสาวะ เล่มที่ 1.นนทบุรี: โรงพิมพ์คงเกียรติการพิมพ์.

ภาษาอังกฤษ

Dziadosz, M. T., Jörg Henning, Katarina Klintschar, Michael Nordmeier, Frederike. (2018). LC–MS/MS screening strategy for cannabinoids, opiates, amphetamines, cocaine, benzodiazepines and methadone in human serum, urine and post-mortem blood as an effective alternative to immunoassay based methods applied in forensic toxicology for preliminary examination. *Forensic Chemistry, 7*, 33-37.

Hudson, J. (2015). Amphetamines, Phentermine, and Designer Stimulant Quantitation Using an Agilent 6430 LC/MS/MS. *Agilent Technologies*.

Jason Hudson, P. D., James Hutchings, Ph.D., and Rebecca Wagner, Ph.D. (2015). Validation of a Quantitative Method for Amphetamines, Phentermine, and Designer Stimulants Using an Agilent 6430 LC/MS/MS. *Application Note*.

Lin, H.-R., Choi, K.-I., Lin, T.-C., & Hu, A. (2013). Simultaneous quantification of amphetamine, opiates, ketamine and relative metabolites in urine for confirmatory analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, 929*, 133-141.

María del Mar Ramírez Fernández, S. M. R. W., Vincent di Fazio, Matthias Gosselin, Nele Samyn. (2010a). Analysis of amphetamines and metabolites in urine with ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, 878*, 1616-1622. doi:10.1016/j.jchromb.2010.03.048

María del Mar Ramírez Fernández, S. M. R. W., Vincent di Fazio, Matthias Gosselin, Nele Samyn. (2010b). Analysis of amphetamines and metabolites in urine with ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, 878*, 1616-1622.

SWGTOX. (2013). Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). *Journal of Analytical Toxicology, 7*(37), 452-474.

Yang, C.-A., Liu, H.-C., Lin, D.-L., Liu, R., Hsieh, Y.-Z., & Wu, S.-P. (2017). *Simultaneous Quantitation of Methamphetamine, Ketamine, Opiates and their Metabolites in Urine by SPE and LC–MS-MS* (Vol. 41).

รายการอ้างอิง

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวกรรณิกาญจน์ ศิขิวัฒน์
วัน เดือน ปี เกิด	16 เมษายน 2536
สถานที่เกิด	จังหวัดนครศรีธรรมราช
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	123 ม.7 ต.เขาดิน อ.เขาพนม จ.กระบี่
ผลงานตีพิมพ์	ตีพิมพ์วารสาร veridian มหาวิทยาลัยศิลปากร