



การพัฒนาและประยุกต์ใช้เฟเซอร์ สเปรย์ แมสสเปคโตรเมทรีในการตรวจเมทแอมเฟตามีน ยาเสพติด  
และวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทจากชีววัตถุผู้เสียชีวิต



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต  
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์และงานยุติธรรม แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การพัฒนาและประยุกต์ใช้เพเปอร์ สเปรย์ แมสสเปคโตรเมทรีในการตรวจเมทแอมเฟตา  
มีน ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทจากชีววัตถุผู้เสียชีวิต



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต  
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์และงานยุติธรรม แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

DEVELOPMENT AND APPLICATIONS OF PAPER SPRAY-MASS SPECTROMETRY  
IN POSTMORTEM METHAMPHETAMINE NARCOTICS AND PSYCHOACTIVE  
DRUGS ANALYSIS.



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for Doctor of Philosophy (FORENSIC SCIENCE AND CRIMINAL JUSTICE)

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2021

Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	การพัฒนาและประยุกต์ใช้เพเพอร์ สเปรย์ แมสสเปคโตรเมทรีใน การตรวจเมทแอมเฟตามีน ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและ ประสาทจากซีวีวัตถุผู้เสียชีวิต
โดย	วชิรวิชญ์ ตั้งธนานวัฒน์
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์และงานยุติธรรม แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พันตำรวจเอก ดร. สฤณี สืบพงษ์ศิริ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ พันตำรวจเอกวรวัช วิชชวานิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พันตำรวจเอก ดร.สฤณี สืบพงษ์ศิริ)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(พันตำรวจเอก หลิ่ง ดร.ธีรินทร์ สีนไชย )

57312910 : นิติวิทยาศาสตร์และงานยุติธรรม แบบ 1.1 ปรัชญาคุษฎีบัณฑิต

คำสำคัญ : เพเพอร์ สเปรย์ แมสสเปคโตรเมทรี, เมทแอมเฟตามีน, คีตามีน, ยาเสพติด

พันตำรวจโท วชิรวิษฐ์ ตั้งธนานุวัฒน์: การพัฒนาและประยุกต์ใช้เพเพอร์ สเปรย์ แมสสเปคโตรเมทรีในการตรวจเมทแอมเฟตามีน ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทจากชีววัตถุ ผู้เสียชีวิต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พันตำรวจเอก ดร. สฤณี สืบพงษ์ศิริ

ปัญหาการเสพติดเมทแอมเฟตามีน และวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท (คีตามีน) เป็นปัญหาระดับชาติของประเทศไทย ปริมาณงานตรวจมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ผลการตรวจจะต้องมีความละเอียดถูกต้องสูงเช่นกัน ปัจจุบันห้องปฏิบัติการตรวจสอบสารเสพติดในร่างกายมนุษย์ใช้วิธีลิควิดโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตรเมทรี (Online-SPE-LC-MS/MS) ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสิ่งส่งตรวจ เช่น ปัสสาวะ น้ำดี อาหารในกระเพาะ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวใช้เวลาประมาณ 30 นาทีถึง 1 ชั่วโมงต่อตัวอย่าง ดังนั้นจึงเกิดปัญหา workload เกิดขึ้นได้เสมอ แนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาคือการนำเครื่อง เพเพอร์ สเปรย์ แมสสเปคโตรเมทรี (Paper spray-MS) ซึ่งไม่จำเป็นต้องเตรียมตัวอย่างก่อนตรวจ และวิธีนี้ไม่มีส่วนของโครมาโตกราฟีซึ่งเป็นกระบวนการแยกสาร แต่ใช้ความสามารถของแมสสเปคโตรมิเตอร์ในการแยกสารแทน ซึ่งข้อดีคือทำให้ลดเวลาในการตรวจลงเหลือตัวอย่างละ 1-2 นาที แต่ข้อด้อยคือวิธีนี้ไม่มีกระบวนการแยกสาร ทำให้เมื่อตรวจตัวอย่างที่เหนียวข้นจะอ่านผลได้ยาก

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือ 1) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ Paper spray-MS ในงานตรวจเมทแอมเฟตามีน และวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทในปัสสาวะ เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Online-SPE-LC-MS/MS) 2) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ Paper spray-MS ในงานตรวจเมทแอมเฟตามีน และวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทจากชีววัตถุอื่น เช่น น้ำดี อาหารในกระเพาะ เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Online-SPE-LC-MS/MS)

โดยเก็บตัวอย่างแบบสุ่มในช่วงเดือนพฤษภาคม 2560 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 ผลการวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ น้ำดีและอาหารในกระเพาะด้วยวิธี Paper spray-MS เทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่า 1) ค่า true positive rate ในตัวอย่างปัสสาวะ เท่ากับ 100% (21 of 21) 2) ค่า true positive rate ในน้ำดี เท่ากับ 58.8% (10 of 17) และ 3) ค่า true positive rate ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะศพ เท่ากับ 52.9 % (9 of 17) 4) ค่า true positive rate ของคีตามีนในปัสสาวะเท่ากับ 100% (20 of 20) สรุปได้ว่า Paper spray-MS สามารถใช้ในการตรวจยืนยันเมท

แอมเฟตามีนและคีตามีนในปัสสาวะได้ ซึ่งช่วยลดเวลาในการวิเคราะห์ลงได้ประมาณ 15 เท่าเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานเดิม ส่วนการตรวจในตัวอย่างน้ำดีและอาหารในกระเพาะยังให้ผลถูกต้องเพียงครั้งหนึ่งของกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งต้องมีการปรับปรุงวิธีทดสอบต่อไป



57312910 : Major (FORENSIC SCIENCE AND CRIMINAL JUSTICE)

Keyword : Paper spray Mass spectrometry, Paper spray-MS, Methamphetamine, Ketamine, Narcotic

POL.LT.COL. WACHIRAWIT TUNGTANANUWAT : DEVELOPMENT AND APPLICATIONS OF PAPER SPRAY-MASS SPECTROMETRY IN POSTMORTEM METHAMPHETAMINE NARCOTICS AND PSYCHOACTIVE DRUGS ANALYSIS. THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR POLICE COLONEL SARIT SUEBPONGSIRI, Ph.D.

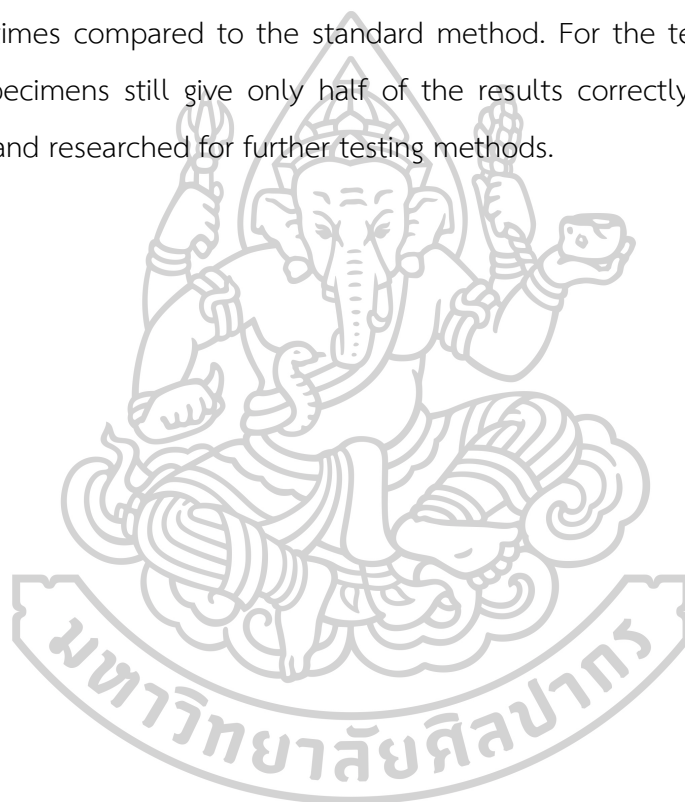
Problems with methamphetamine addiction and psychotropic substance abuse (ketamine) become a national social problem in Thailand. The workload is increasing while the analytical results must be highly accurate as well. Currently, the drug testing laboratory in the human specimen uses the Liquid Chromatography /Mass Spectrometry (Online-SPE-LC-MS/MS) as a standard method to analyses various specimens, such as urine, bile and the gastric contents. In which the technique requires about 30 minutes to 1 hour per sample, Therefore workload problems can always occur. One direction to solve the problem is to use the Paperspray Mass spectrometry (Paper spray-MS), which does not need to prepare samples before the examination and this method does not contain chromatography, which is a separation process, but using the capability of the mass spectrometers to separate the substances instead which has the advantage of reducing inspection time to 1-2 minute per sample. But the disadvantage is that there is no separation process in this method Therefore, when examining viscous samples that are difficult to interpret.

The objective of this research were 1) to study the feasibility of using Paper spray-MS in the detection of methamphetamine and psychotropic substances in urine compare with the standard method (Online-SPE-LC-MS/MS) 2) to study the feasibility of using Paper spray-MS in the detection of methamphetamine and psychotropic substances from other biological specimens such as bile or gastric contents compare with the standard method. (Online-SPE-LC-MS/MS)

The samples were collected randomly between May 2017 and December

2019. The results of the methamphetamine analysis from urine, bile and gastric content samples using Paper spray-MS compared with standard methods, founding that 1) the true positive rate in urine samples is 100% (24 of 24), 2) the true positive rate in bile is 58.8% (10 of 17) 3) the true positive rate in gastric contents is 52.9% (9 of 17) and 4) the true positive rate of urine ketamine analysis was 100% (20 of 20).

Concluded that Paper spray-MS can be used for analyst methamphetamine and ketamine in urine specimen, and this method could cut down analysis time by about 15 times compared to the standard method. For the test in bile and gastric content specimens still give only half of the results correctly, which needs to be improved and researched for further testing methods.





## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากการสนับสนุนจากคณะอาจารย์ที่ปรึกษา การให้การช่วยเหลือ การให้คำปรึกษาหารือ ในการดำเนินการโครงการวิจัย และได้รับความกรุณาอย่างสูง จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์พันตำรวจเอก สฤกษ์ดี สืบพงษ์สิริ อาจารย์ที่ปรึกษา พันตำรวจเอกหญิงธีรินทร์ สิ้นไชย หัวหน้ากลุ่มงานพิษวิทยา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และให้คำปรึกษาในการทำวิจัย รองศาสตราจารย์พันตำรวจเอกวรรัช วิชชวานิชย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ คณาจารย์ ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตรวจแก้ไขข้อบกพร่องรวมทั้งให้ข้อเสนอแนะ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ และมีคุณค่า ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์พันตำรวจโทหญิง ดร.สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐที่กรุณาให้คำปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณพันตำรวจโทหญิงภัทรพร ชดช้อยและร้อยตำรวจตรีพงศธร กอนตะวันที่กรุณาให้คำปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณเภสัชกรและบุคลากรทุกท่านในกลุ่มงานพิษวิทยาที่เอื้อข้อมูลและสนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคุณอรุณ กาญจนวัฒน์ กรรมการผู้จัดการบริษัทชายนส์สเปค จำกัดที่สนับสนุนวัสดุอุปกรณ์และทีมวิศวกรผู้เชี่ยวชาญช่วย support งานวิจัยนี้จนสำเร็จ

สารและคุณประโยชน์ที่ได้จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบ และอุทิศแด่พระคุณบิดามารดา ซึ่งเป็นแรงบันดาลใจให้ผู้วิจัยตลอดมา

พันตำรวจโท วชิรวิษณุ ตั้งธนานุวัฒน์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	7
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	8
1.4 นิยามศัพท์ .....	8
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ.....	9
บทที่ 2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	10
2.1 ข้อมูลเกี่ยวกับเมทแอมเฟตามีน (Methamphetamine Data).....	10
2.2 ข้อมูลเกี่ยวกับคีตามีน .....	13
2.3 การใช้ Online SPE LC MS/MS ในงานวิเคราะห์ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและ ประสาท .....	16
2.4 การใช้ Paper spray-MS ในงานวิเคราะห์ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท... ..	20
2.5 การศึกษาเกี่ยวกับสูตรสารละลายสำหรับฉีดพ่นเป็นละอองฝอยที่เหมาะสม .....	24
2.6 การจัดการชีววัตถุและสิ่งส่งตรวจ (Biological specimen Management).....	25
2.7 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review).....	29

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย.....	32
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ .....	32
3.2 สารเคมี.....	33
3.3 วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีน (stock solution) ความเข้มข้น 4000 ng/mL .....	34
3.4 วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีน 14 ความเข้มข้น spot บน Sample cartridges .....	34
3.5 วิธีเตรียมสารละลายแบลงค์ (Blank solution) ปริมาตร 1000 $\mu$ L spot บน Sample cartridges .....	36
3.6 วิธีเตรียม Spray solvent สำหรับ เครื่อง Paper spray-MS.....	36
3.7 Condition สำหรับการทำงานเครื่อง Paper spray-MS.....	37
3.8 หลักเกณฑ์การแปลผลการวิเคราะห์.....	38
3.9 Condition สำหรับการทำงานเครื่อง Online-SPE-LC-MS/MS (TSQ Quantiva™).....	38
3.10 วิธีดำเนินการวิจัย.....	40
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	42
4.1 ผลการศึกษาเกี่ยวกับสูตรสารละลายสำหรับฉีดพ่นเป็นละอองฝอยที่เหมาะสม (Spray Solvent Optimization).....	42
4.2 ผลการประยุกต์ใช้ Paper spray MS ในการตรวจยาเสพติด (เมทแอมเฟตามีน) .....	44
4.3 ผลการประยุกต์ใช้ Paper spray-MS ในการตรวจวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท (คีตามีน) .....	60
4.4 การเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างชีววัตถุด้วยวิธี Paper spray-MS และ Online-SPE-LC-MS/MS .....	67
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ .....	69
5.1 อภิปรายผลการศึกษา .....	69
5.2 สรุปผลการศึกษา .....	74

5.3 ข้อเสนอแนะ ..... 75

5.4 ข้อจำกัดในการวิจัยนี้ ..... 77

รายการอ้างอิง ..... 78

ประวัติผู้เขียน ..... 81



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณสารเพื่อเตรียมสารมาตรฐานเมทแอมเฟตามีน จำนวน 14 ความเข้มข้น...	35
ตารางที่ 2 แสดงอัตราส่วน Response area .....	43
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแตกต่างของสูตรน้ำยาทั้งสองด้วยสถิติ Paired t-Test.....	44
ตารางที่ 4 แสดงพารามิเตอร์ที่ตรวจพบในการวัด LOD และ LODc.....	45
ตารางที่ 5 ความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะที่สุ่มมาทดสอบ 25 ตัวอย่าง .....	50
ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความแตกต่างของความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยสถิติ Paired t-Test.....	52
ตารางที่ 7 สรุปผลการตรวจเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะทั้งสองวิธี .....	52
ตารางที่ 8 ผลตรวจเมทแอมเฟตามีนในน้ำดี.....	53
ตารางที่ 9 สรุปผลการตรวจเมทแอมเฟตามีนในน้ำดีทั้งสองวิธี.....	58
ตารางที่ 10 ผลตรวจเมทแอมเฟตามีนในอาหารในกระเพาะ .....	59
ตารางที่ 11 สรุปผลการตรวจเมทแอมเฟตามีนในอาหารในกระเพาะทั้งสองวิธี .....	60
ตารางที่ 12 แสดงพารามิเตอร์ที่ตรวจพบในการวัด LOD และ LODc .....	61
ตารางที่ 13 แสดงความเข้มข้นของสารมาตรฐานคีตามีนกับค่า Ratio of Response area .....	64
ตารางที่ 14 ความเข้มข้นคีตามีนในปัสสาวะที่สุ่มมาทดสอบ 20 ตัวอย่าง.....	66
ตารางที่ 15 ผลการทดสอบความแตกต่างของความเข้มข้นคีตามีนในปัสสาวะด้วยสถิติ Paired t-Test .....	67
ตารางที่ 16 เปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างชีววัตถุด้วยวิธี Paper spray MS และ Online-SPE-LC-MS/MS.....	68

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงกลไกการทำงานของระบบ Paper spray .....	5
ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของเมทแอมเฟตามีน .....	11
ภาพที่ 3 แสดงการกำจัดออกของเมทแอมเฟตามีน .....	12
ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของคีตามีน .....	13
ภาพที่ 5 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของคีตามีนในการจับกับตัวรับในสมอง.....	14
ภาพที่ 6 ส่วนประกอบของเครื่อง LC .....	17
ภาพที่ 7 Electrospray ionization (ESI).....	18
ภาพที่ 8 Triple quadrupole (QqQ).....	19
ภาพที่ 9 การทำงานของเครื่อง liquid chromatography/tandem mass spectrometry .....	19
ภาพที่ 10 กระจกไมโครกราฟีรูปสามเหลี่ยมภายใต้ Scanning electron microscope (SEM) .....	21
ภาพที่ 11 ตำแหน่งของปลายกระจก (A) และความเข้มของไอออน (B) โดยสารทดสอบคือ Cocaine .....	22
ภาพที่ 12 ภายในของ Q Exactive Orbitrap Mass Spectrometers (MS).....	24
ภาพที่ 13 box plot แสดงผลความแตกต่างของการทดสอบ spray solvent 2 สูตร.....	24
ภาพที่ 14 แสดงตัวอย่าง Chronogram (ซ้าย), Fragment ions matching (กลาง) และ Isotopic pattern comparison (ขวา) ของเมทแอมเฟตามีน.....	48
ภาพที่ 15 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Methamphetamine ในปัสสาวะและ Area ratio เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Paper spray MS .....	49
ภาพที่ 16 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Methamphetamine ในปัสสาวะและ Area ratio เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Online-SPE-LC- MS/MS.....	49

ภาพที่ 17 ตัวอย่างน้ำดีลำดับที่ 14 ความเข้มข้นต่ำกว่า LODc แต่ตรวจพบพารามิเตอร์ครบทั้ง 3 พารามิเตอร์.....	55
ภาพที่ 18 ตัวอย่างน้ำดีลำดับที่ 16 ความเข้มข้นต่ำกว่า LODc แต่ตรวจพบพารามิเตอร์ครบทั้ง 3 พารามิเตอร์.....	55
ภาพที่ 19 ตัวอย่างน้ำดีลำดับที่ 4 ความเข้มข้นต่ำกว่า LODc พบ Chronogram และ Isotropic pattern .....	56
ภาพที่ 20 ตัวอย่างน้ำดีลำดับที่ 5 ความเข้มข้นต่ำกว่า LODc พบ Chronogram และ Isotropic pattern .....	56
ภาพที่ 21 ตัวอย่างน้ำดีลำดับที่ 15 ความเข้มข้นต่ำกว่า LODc พบ Chronogram ขนาดเล็ก และ Isotropic pattern .....	56
ภาพที่ 22 ตัวอย่างน้ำดีลำดับที่ 2 ความเข้มข้นต่ำกว่า LODc พบ Chronogram เพียงพารามิเตอร์เดียว.....	57
ภาพที่ 23 ตัวอย่างน้ำดีลำดับที่ 6 ความเข้มข้นต่ำกว่า LODc พบ Chronogram ขนาดเล็กเพียงพารามิเตอร์เดียว.....	57
ภาพที่ 24 ตัวอย่างน้ำดีลำดับที่ 13 ความเข้มข้นต่ำกว่าLODc พบ Chronogram ขนาดเล็กเพียงพารามิเตอร์เดียว.....	58
ภาพที่ 25 แสดงตัวอย่าง Chronogram (ซ้าย), Fragment ions matching (กลาง) และ Isotopic pattern comparison (ขวา) ของคีตามีน.....	63
ภาพที่ 26 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคีตามีนในปัสสาวะและ Area ratio เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Paper spray-MS .....	65
ภาพที่ 27 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคีตามีนในปัสสาวะและ Area ratio เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Online-SPE-LC-MS/MS.....	65
ภาพที่ 28 แสดงรายงานผลการตรวจตัวอย่างหมายเลข 23 ด้วยวิธี Paper spray-MS พบพารามิเตอร์ทั้งสามครบถ้วนคือ พบ Chronogram (ซ้าย), Fragment ions matching (กลาง) และ Isotopic pattern comparison (ขวา) .....	72

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหาการเสพติดและใช้ยาในทางที่ผิดของ วัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท เช่น เคตามีน (Ketamine) ไดอะซีแพม (Diazepam), อัลปราโซแลม (Alprazolam) , หรือยาเสพติดเช่น พืชกระท่อม (Kratom; Mitragynine) และโดยเฉพาะเมทแอมเฟตามีน (Methamphetamine) เป็นปัญหาทางด้านสังคมและเศรษฐกิจระดับชาติสำหรับประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เมทแอมเฟตามีนทั้งในรูปแบบเม็ด (ยาบ้า) หรือรูปแบบผลึก (ยาไอซ์) จัดเป็นยาเสพติดให้โทษ ตามความหมายในพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ.2522 หมายถึง สารเคมีหรือวัตถุชนิดใด ๆ ซึ่งเมื่อผ่านการเสพเข้าสู่ร่างกายไม่ว่าจะโดยรับประทาน ฉีด สูบ ตม หรือด้วยวิธีการเสพติดใด ๆ แล้วทำให้เกิดผลกระทบต่อร่างกายและจิตใจในลักษณะสำคัญ เช่น มีความต้องการเสพทั้งร่างกายและจิตใจอย่างรุนแรงอยู่ตลอดเวลา ต้องเพิ่มขนาดการเสพเรื่อย ๆ มีอาการถอนยาเมื่อขาดยา และสุขภาพโดยรวมของผู้ที่เสพจะทรุดโทรมลง แล้วยังรวมไปถึงพืชบางชนิดหรือส่วนของพืชที่เป็นหรือสามารถให้ผลผลิตเป็นยาเสพติดให้โทษหรืออาจใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเป็นยาเสพติดให้โทษ และสารเคมีตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตยาเสพติดให้โทษดังกล่าวด้วย ทั้งนี้ตามที่รัฐมนตรีประกาศในราชกิจจานุเบกษา แต่ทั้งนี้ไม่หมายความถึงยาสามัญประจำบ้านบางตำรับตามกฎหมายว่าด้วยยาที่มียาเสพติดให้โทษผสมอยู่

โดยยาไอซ์หรือยาบ้าจัดอยู่ในยาเสพติดให้โทษประเภทที่ 1 ซึ่งตามมาตรา 57 ในพระราชบัญญัตินี้ ความว่า “ห้ามมิให้ผู้ใดเสพยาเสพติดให้โทษในประเภท 1 หรือประเภท 5” และ มาตรา 58/1 ในกรณีจำเป็นและมีเหตุอันควรเชื่อได้ว่ามีบุคคลหรือกลุ่มบุคคลใดเสพยาเสพติดให้โทษไม่ว่าจะเป็นประเภท 1 ประเภท 2 หรือประเภท 5 อันเป็นความผิดตามพระราชบัญญัติ ภายในเคหสถาน รวมถึงสถานที่ใด ๆ หรือยานพาหนะที่ใช้ขับขี่ ให้พนักงานฝ่ายปกครอง หรือตำรวจ หรือพนักงานเจ้าหน้าที่ตามพระราชบัญญัติตามที่กล่าว มีอำนาจตรวจ ทดสอบ หรือสั่งให้ผู้เข้าข่ายสงสัยรับการตรวจหรือทดสอบว่าบุคคลหรือกลุ่มบุคคลนั้นมียาเสพติดให้โทษดังกล่าวอยู่ในร่างกายหรือไม่ วิธีการตรวจหรือการทดสอบตามวรรคหนึ่งให้เป็นไปตามหลักเกณฑ์วิธีการ และเงื่อนไขที่คณะกรรมการกำหนดโดยประกาศในราชกิจจานุเบกษา



ดังนั้นหากยึดถือตามพระราชบัญญัตินี้แล้วการเสพเมทแอมเฟตามีนจึงเป็นคดีอาญาที่เป็นความผิดตามกฎหมาย และเจ้าพนักงานตามกฎหมายสามารถจับกุมและให้มีการทดสอบเมทแอมเฟตามีนในร่างกายตามที่กฎหมายบัญญัติไว้ได้

ในขณะเดียวกันผู้เสพบางคนถูกจับกุมในลักษณะเป็นผู้เสพหรือครอบครองไว้เพื่อเสพ ซึ่งถือเป็นอาชญากรรมที่ไม่มีผู้เสียหาย (Victimless Crime) ผู้เสพยาเสพติดมีสภาพเป็นผู้ป่วยอย่างหนึ่งเมื่อตัวเองเสพยาเข้าไปแล้วตัวผู้เสพเป็นผู้ได้รับผลร้าย มิใช่อาชญากรปกติ กรณีนี้จำเป็นต้องมีการฟื้นฟูบำบัด จึงมีกฎหมายอีกฉบับคือ พระราชบัญญัติฟื้นฟูสมรรถภาพผู้ติดยาเสพติด พ.ศ. 2545 ตามมาตรา 19 ของพระราชบัญญัตินี้ ความว่า ผู้ใดต้องหาว่ากระทำความผิดฐานเสพยาเสพติด เสพและมีไว้ในครอบครอง เสพและมีไว้ในครอบครองเพื่อจำหน่าย หรือเสพและจำหน่ายยาเสพติดตามลักษณะ ชนิด ประเภท และปริมาณที่กำหนดในกฎกระทรวง ถ้าไม่ปรากฏว่าต้องหาหรืออยู่ในระหว่างถูกดำเนินคดีในความผิดฐานอื่นซึ่งเป็นความผิดที่มีโทษจำคุกหรืออยู่ในระหว่างรับโทษจำคุกตามคำพิพากษาของศาล ให้พนักงานสอบสวนนำตัวผู้ต้องหาไปศาลภายในสี่สิบแปดชั่วโมงนับแต่เวลาที่ผู้ต้องหานั้นมาถึงที่ทำการของพนักงานสอบสวน เพื่อให้ศาลพิจารณามีคำสั่งให้ส่งตัวผู้ต้องหาไปตรวจพิสูจน์การเสพหรือการติดยาเสพติด เว้นแต่เกิดเหตุสุดวิสัยหรือมีเหตุจำเป็นอย่างอื่นที่เกิดจากตัวผู้ต้องหานั้นเอง หรือจากพฤติการณ์ที่เกิดเปลี่ยนแปลงไปซึ่งทำให้เจ้าหน้าที่ผู้ควบคุมตัวไม่อาจนำตัวผู้ต้องหาไปศาลภายในกำหนดเวลาดังกล่าวได้

ในการดำเนินการตามวรรคหนึ่ง ถ้าผู้ต้องหาไม่อายุไม่ถึงสี่สิบแปดปีบริบูรณ์ ให้พนักงานสอบสวนนำตัวส่งศาลเพื่อมีคำสั่งให้ตรวจพิสูจน์ภายในสี่สิบสี่ชั่วโมงนับแต่เวลาที่ผู้ต้องหานั้นมาถึงที่ทำการของพนักงานสอบสวนการส่งไปตรวจพิสูจน์การเสพหรือการติดยาเสพติด ให้ศาลพิจารณาส่งตัวไปควบคุมเพื่อตรวจพิสูจน์ที่ศูนย์ฟื้นฟูสมรรถภาพผู้ติดยาเสพติด สถานที่เพื่อการตรวจพิสูจน์ การฟื้นฟูสมรรถภาพของผู้ที่ติดยาเสพติดหรือการควบคุมตัวตามที่รัฐมนตรีประกาศกำหนด โดยคำนึงถึงเพศ อายุ และลักษณะเฉพาะบุคคลประกอบด้วย แล้วให้ศาลแจ้งคณะอนุกรรมการฟื้นฟูสมรรถภาพผู้ติดยาเสพติดทราบ

ในระหว่างการตรวจพิสูจน์และการฟื้นฟูสมรรถภาพผู้ติดยาเสพติด ให้พนักงานสอบสวน ดำเนินกระบวนการสอบสวนคดีต่อไป และเมื่อสอบสวนเสร็จให้ส่งสำนวนการสอบสวนไปยังพนักงาน อัยการโดยไม่ต้องส่งผู้ต้องหาไปด้วย และแจ้งให้ทราบว่าผู้ต้องหาถูกควบคุมตัวอยู่ ณ ศูนย์ฟื้นฟู สมรรถภาพผู้ติดยาเสพติด สถานที่เพื่อการตรวจพิสูจน์ การฟื้นฟูสมรรถภาพผู้ติดยาเสพติด หรือการ ควบคุมตัวอย่างแห่งใด

ในระหว่างที่ผู้ต้องหาถูกควบคุมตามพระราชบัญญัตินี้ พนักงานสอบสวนหรือพนักงานอัยการ ไม่ต้องดำเนินการฝากขังหรือขอผิดฟ้องตามกฎหมาย"

ข้อมูลจากศูนย์อำนวยการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด กระทรวงสาธารณสุข บ่งชี้ว่า ปัญหายาเสพติดในปี 2559 อยู่ระดับรุนแรง คาดมีผู้เสพยาประมาณ 2.7 ล้านคน สถิติคดีฟื้นฟูจาก ฐานข้อมูลระบบสารสนเทศ กรมคุมประพฤติตั้งแต่เดือนต.ค.2558-ก.พ. 2559มีผู้เข้ารับการฟื้นฟูคดี เสพยาบ้า 25,357 ราย และเสพยาไอซ์ 513 ราย สถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ เป็นหนึ่งใน หน่วยงานตามกฎหมายที่กำหนดอำนาจหน้าที่ให้ทำการตรวจพิสูจน์การเสพติดเมแทมเฟตามีนใน มนุษย์เช่นกัน ในปีช่วงก่อนปี 2557 มีสถิติการตรวจคัดกรองยาเสพติดเกือบ 10,000 รายต่อปี โดย แบ่งเป็นการตรวจจากศพ ประมาณ 4000 ศพต่อปีและตรวจจากบุคคลมีชีวิต (ผู้ต้องหา ผู้ถูกกล่าวหา ผู้เสียหาย) ประมาณ 6,000 รายต่อปี

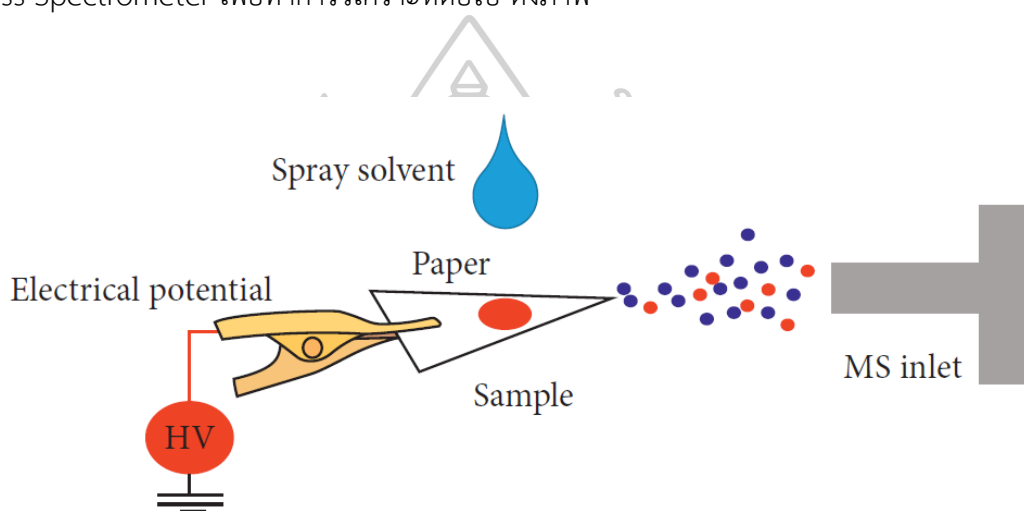
นอกจากนี้การเสพติดเมแทมเฟตามีนยังถูกควบคุมตาม พระราชบัญญัติจรรยาบรรณ พ.ศ. 2522 กล่าวคือ ในมาตรา 43 ห้ามมิให้ผู้ขับขี่รถ (2) ในขณะที่เมาสุราหรือของเมาอย่างอื่น ซึ่งมีการ พยายามบังคับใช้กฎหมายตามมาตรานี้ให้ครบถ้วน โดยมีทั้งการตรวจความเมา (แอลกอฮอล์) และ ตรวจปัสสาวะหาสารเสพติดซึ่งถือเป็น “ของเมาอย่างอื่น” ในผู้ขับขี่ที่ถูกเรียกตรวจหรือจับกุม แต่ พบว่าในทางปฏิบัติยังไม่สามารถบังคับใช้กฎหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเกิดปัญหาใน ลักษณะเดียวกันคือ หน่วยงานตรวจพิสูจน์สารเสพติดในมนุษย์ไม่สามารถออกรายงานการตรวจ พิสูจน์ได้อย่างรวดเร็ว จนทำให้การเป็นภาระต่อการทำงานคดีเนื่องจากบางข้อกล่าวหา มี ระยะเวลาในการควบคุมตัวผู้ต้องหาและระยะเวลาในการทำสำนวนจำกัด หากล่วงเลยเวลาจะมีบท กำหนดโทษไว้ด้วย

จากการตรวจสอบพบว่า ปัญหาผลตรวจพิสูจน์ล่าช้าอาจเกิดจากเหตุ 2 ประการ คือ 1 ปัญหา work load จากการที่เจ้าหน้าที่นักนิติวิทยาศาสตร์ผู้ตรวจพิสูจน์มีน้อย ในขณะที่ปริมาณงานมีมาก และเครื่องมือไม่เพียงพอ 2 เกิดจากปัญหาเทคนิคการตรวจสารเสพติดในมนุษย์ ซึ่งจำเป็นต้องตรวจในระดับยืนยัน (confirmation) จึงจะสามารถนำผลตรวจไปใช้เป็นหลักฐานประกอบสำนวนคดีได้ ซึ่งการตรวจยืนยันจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี เช่น Thin layer Chromatography, Liquid Chromatography หรือ Gas Chromatography ซึ่งเครื่องมือหรือวิธีการตรวจเหล่านี้จำเป็นต้องใช้เวลาเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์อย่างน้อย 30 นาที ต่อตัวอย่างขึ้นกับแต่ละวิธีการ ดังนั้นจึงสามารถวิเคราะห์ได้เต็มที่ไม่เกิน 48 รายต่อ 24 ชั่วโมง (วัน)

แนวทางในการแก้ปัญหา work load ซึ่งทำให้บังคับใช้กฎหมายไม่ได้ คือการปรับแก้กฎหมาย เช่นการนำรายชื่อสารเมทแอมเฟตามีนออกจากการเป็นยาเสพติดให้โทษตามกฎหมาย หรือกระบวนการทางกฎหมายอื่นที่สามารถ ลดปริมาณงานลง ตัวอย่างที่เห็นเป็นรูปธรรมคือ ประกาศคณะกรรมการทางกฎหมายอื่นที่สามารถ ลดปริมาณงานลง ตัวอย่างที่เห็นเป็นรูปธรรมคือ ประกาศคณะกรรมการรักษาความสงบแห่งชาติ ฉบับที่ 108/2557 เรื่อง การปฏิบัติต่อผู้ต้องสงสัยว่ากระทำความผิดตามกฎหมายเกี่ยวกับยาเสพติด “ข้อ 1 ในกรณีที่ผู้ใดต้องสงสัยว่ากระทำความผิดฐานเสพยาเสพติด หรือเสพและมียาเสพติดไว้ในครอบครองตามลักษณะ ชนิด ประเภท และปริมาณที่กำหนดตามบัญชีท้ายประกาศนี้ ถ้าไม่ปรากฏว่าผู้นั้นเป็นผู้ต้องหาหรืออยู่ในระหว่างถูกดำเนินคดีในความผิดฐานอื่นซึ่งเป็นการผิดที่มีโทษจำคุกหรืออยู่ในระหว่างรับโทษจำคุกตามคำพิพากษาของศาล และไม่มีพฤติกรรมการอาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้อื่นหรือสังคม หากผู้นั้นยินยอมเข้ารับการบำบัดฟื้นฟู ให้เจ้าหน้าที่ตามกฎหมายเกี่ยวกับยาเสพติดดำเนินการให้ผู้นั้นเข้ารับการบำบัดฟื้นฟู” ผลจากประกาศฯ ฉบับนี้ทำให้ผู้ที่ครอบครองยาเสพติดจำนวนน้อยและไม่เคยมีประวัติ สามารถเลี้ยงคดีอาญาและเข้าสู่กระบวนการบำบัดแทน ทำให้ไม่ต้องผ่านกระบวนการตรวจพิสูจน์สารเสพติดในร่างกาย มาตรา 58/130 แห่งพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ.2522 หลังประกาศฯ ฉบับนี้มีผลบังคับใช้ สถาบันนิติเวชวิทยามีงานตรวจพิสูจน์สารเสพติดในปีสภาวะ ในปี 2559 เหลือเพียง 2,600 รายเท่านั้น

แนวทางแก้ปัญหาที่ 2 คือ การพัฒนาเครื่องมือตรวจพิสูจน์ที่สามารถทำงานตรวจได้รวดเร็ว มีความแม่นยำ เชื่อถือได้ ทำให้ปริมาณงานตรวจต่อวันเพิ่มมากขึ้นและผู้ตรวจพิสูจน์ไม่เหนื่อยล้าจนเกินไป เครื่อง Paper spray Mass Spectrometry หรือ Paper spray-MS เป็นเครื่องมือวิเคราะห์สารที่ถูกพัฒนาขึ้นจนได้เครื่อง ต้นแบบในปี 2010 และสามารถตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์สารโดยใช้ความสามารถของเครื่อง Mass Spectrometer เป็นหลัก เครื่อง Paper spray-MS ไม่

จำเป็นต้องเตรียมสารก่อน ดังนั้นกระบวนการ Solid Phase Extraction หรือ Liquid-liquid extraction ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายสูงจะถูกตัดทิ้งไป โดยสามารถหยดหรือป้ายตัวอย่างเลือดหรือปัสสาวะลงบนแผ่นกระดาษใน cartridge จากนั้นนำไปเข้าเครื่องวิเคราะห์ได้เลย เครื่องจะ spray ตัวทำละลาย (solvent) ลงในส่วนของ sample zone และ solvent zone จากนั้นจะมีการให้ศักย์ไฟฟ้าประมาณ 3 – 5 kV แก่ paper cartridge ผ่าน spray ball ทำให้เกิด ionization เป็นผลให้เกิด ion เคลื่อนที่ออกจากปลายกระดาษของ paper cartridge เข้าไปยังเครื่อง Mass Spectrometer เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป ดังภาพ



ภาพที่ 1 แสดงกลไกการทำงานของระบบ Paper spray

ที่มา: Mogollón NGS, Quiroz-Moreno CD, Prata PS, de Almeida JR, Cevallos AS, Torres-Guérrez R and Augusto F. (2018). New Advances in Toxicological Forensic Analysis Using Mass Spectrometry Techniques. J Anal Methods Chem. Aug 29; 2018:4142527.[1]

เครื่อง Paper spray-MS ไม่มีส่วนของ Liquid Chromatography ดังนั้นจึงไม่มีส่วนแยกสารซึ่งใช้เวลานาน โมเลกุลหรือชิ้นส่วนโมเลกุลของสารจะถูกตรวจวัดและพิสูจน์เอกลักษณ์พร้อม ๆ กันทุกสารด้วยเครื่อง Mass Spectrometer ดังนั้นส่วนนี้จะต้องเป็น MS ที่มีความละเอียดสูงมาก (High resolution MS) ที่ได้รับความนิยมคือ แบบ Triple Quadrupolesที่มีการแตกมวลต่อประจุ ( $m/z$ ) 2 ครั้ง ทำให้พิสูจน์เอกลักษณ์ได้ชัดเจนแม่นยำลดข้อด้อยของการไม่มีส่วน chromatography ลง

ข้อดีของการวิเคราะห์ด้วย Paper spray-MS คือ ไม่มีการปนเปื้อน (No carry-over), ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย (ไม่เกิน 20  $\mu\text{L}$ ), ใช้ปริมาณ solvent น้อย (ประมาณ 100  $\mu\text{L}$  /sample), ไม่มีการเตรียมตัวอย่าง ทำให้ลดความคลาดเคลื่อนจากการเตรียมได้, ไม่มีปัญหาในเรื่องของ Chromatography และวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว ไม่เกิน 2 นาที ส่วนข้อด้อยคือ ต้องทราบค่า m/z ของสารที่ต้องการวิเคราะห์ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (LOQ) ให้ผลได้ไม่ดีเท่ากับการวิเคราะห์ด้วย Liquid Chromatography-MS

เทคนิค Paper spray-MS นี้ถูกพัฒนาต่อเนื่องมาเป็นลำดับ มีรายงานการศึกษาทยอยออกมาเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เครื่องนี้สามารถตรวจได้ตั้งแต่สารโมเลกุลหรือโครงสร้างใหญ่ไปจนถึงสารโมเลกุลเล็กๆ ได้แก่ ไขมัน ฮอร์โมน มีการนำมาใช้ตรวจระดับยาในเลือดในระหว่างการรักษา (Therapeutic drugs monitoring Analysis) การตรวจยาบางชนิด และล่าสุดมีการทดลองนำมาใช้ตรวจสารเสพติดบางชนิด เช่นการศึกษาของ Ryan D. Espy et al. (2012) [2] ทำการศึกษาการใช้ Paper spray-MS เป็นเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์วัตถุเสพติด 8 ชนิดในครั้งเดียวจากตัวอย่างเลือด วัตถุเสพติด ทั้ง 8 ได้แก่ amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxy amphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine (MDEA), morphine, cocaine, and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) ผลการศึกษาพบว่าเครื่อง Paper spray-MS สามารถตรวจสารทั้ง 8 ชนิดนี้ได้จากตัวอย่างเลือดเพียง 10 ไมโครลิตรที่ spiked สารมาตรฐานวัตถุเสพติดทั้ง 8 ลงไป ภายในเวลาเพียง 2 นาที นักวิจัยกลุ่มนี้สรุปว่า วิธีการตรวจด้วย Paper spray-MS ใช้เวลาน้อยมากในการวิเคราะห์ (rapid and high-throughput assays) ซึ่งมีความเป็นไปได้หากต้องการนำไปใช้ตรวจแบบ on-site multi-compound quantitative screening of illicit drug อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเทคนิค Paper spray-MS เป็นนวัตกรรมใหม่ในการตรวจสารทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งไม่เป็นที่รู้จักกันแพร่หลาย และไม่เคยมีการนำมาศึกษาหรือใช้งานจริงในประเทศไทยมาก่อน ในขณะเดียวกัน Paper spray-MS ก็มีศักยภาพเพียงพอที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารเชิงปริมาณในทางพิษวิทยาได้

การศึกษาที่ผ่านมาเป็นการตรวจสอบสารในชีววัตถุจากบุคคลมีชีวิต ได้แก่ เลือดและปัสสาวะ หากสามารถพัฒนาและประยุกต์ใช้ Paper spray-MS ในการตรวจเมทแอมเฟตามีนหรือสารอื่น ๆ จากชีววัตถุผู้เสียชีวิต ซึ่งมีหลากหลาย เช่น ปัสสาวะจากศพ เลือดศพ (postmortem blood) ซึ่งเป็นเลือดเสื่อมสภาพ มีลักษณะแตกต่างจากเลือดจากบุคคลมีชีวิต น้ำดี ซึ่งเป็นชีววัตถุที่สารโมเลกุลใหญ่ โดยเฉพาะสารกลุ่มแอลคาลอยด์จะถูกขับออกจากร่างกายทางน้ำดีมาก แต่มีข้อจำกัดคือมีความมันและหนืดสูง เป็นอุปสรรคต่อการตรวจพิสูจน์ทาง chromatography หรือตัวอย่างอาหารในกระเพาะ ซึ่งมีปริมาณยาและสารเสพติดที่รับประทานเข้าไปตกค้างอยู่ แต่จำเป็นต้องมีการกำจัดไขมันและโปรตีนก่อนการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือทาง chromatography เป็นต้น

หากสามารถพัฒนาค้นหาวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจสอบสารต่างๆ ด้วย Paper spray-MS จากชีววัตถุผู้เสียชีวิตที่มีหลากหลาย ก็จะเป็นประโยชน์กับงานด้านนิติพิษวิทยาและนิติเวชมากรวมถึงจุดเด่นในเรื่องลดเวลาในการตรวจพิสูจน์แต่ละรายลงเหลือประมาณ 2 นาที ทำให้สามารถรองรับงานตรวจได้มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานตรวจเมทแอมเฟตามีน ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทอื่นๆ ในปัสสาวะ และอาจสามารถทำให้การบังคับใช้กฎหมายเกี่ยวกับการตรวจเมทแอมเฟตามีนและอื่นๆ ในพื้นที่รอบสถาบันนิติเวชวิทยา มีความเข้มข้นขึ้น และหากสำเร็จ วิธีการตรวจนี้จะเริ่มต้นแบบในการวิเคราะห์ทางวิทยาศาสตร์ด้วยเครื่องมือ Paper spray-MS แห่งแรกของประเทศ และคงเป็นแห่งแรกของภูมิภาคที่นำเครื่องมือนี้มาใช้งานด้านนิติวิทยาศาสตร์อย่างเป็นทางการ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ Paper spray-MS ในงานตรวจเมทแอมเฟตามีน ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทในปัสสาวะ เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Online-SPE-LC-MS/MS)

1.2.2 เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ Paper spray-MS ในงานตรวจเมทแอมเฟตามีน ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทจากชีววัตถุอื่น เช่น น้ำดี อาหารในกระเพาะ เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Online-SPE-LC-MS/MS)

### 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจสอบสารเมทแอมเฟตามีนจากชีววัตถุผู้เสียชีวิต 3 ประเภท คือ urine, bile และ gastric content ด้วยเทคนิคเพเพอร์สเปรย์ แมสสเปคโตรเมทรี และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีใหม่นี้เทียบกับวิธีมาตรฐาน ลิกวิดโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตรเมทรี (Online-SPE-LC-MS/MS) ในตัวอย่างปัสสาวะที่เป็นชีววัตถุจริง (non-spiked samples) จำนวนไม่น้อยกว่า 20 ตัวอย่าง

ขั้นตอนที่ 2 ทำศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทอื่นๆ เช่น Alprazolam หรือ Ketamine จากชีววัตถุด้วยเทคนิคเพเพอร์สเปรย์ แมสสเปคโตรเมทรีและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีใหม่นี้เทียบกับวิธีมาตรฐาน ลิกวิดโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตรเมทรี

โดยตัวอย่างชีววัตถุผู้เสียชีวิตทั้งหมดเก็บรวบรวมจากสถาบันนิติเวชวิทยา โรงพยาบาลตำรวจ ในช่วงระหว่างเดือนพฤษภาคม 2560 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562

### 1.4 นิยามศัพท์

1.4.1 ยาเสพติด หมายถึง “ยาเสพติดให้โทษ” ตามมาตรา ๔ ในพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ.๒๕๒๒ หมายความว่า สารเคมีหรือวัตถุชนิดใด ๆ ซึ่งเมื่อเสพเข้าสู่ร่างกายไม่ว่าจะโดยรับประทาน ฉีด สูบ ดม หรือเสพเข้าสู่ร่างกายด้วยประการใด ๆ แล้วทำให้เกิดผลกระทบที่รุนแรงต่อร่างกายและจิตใจในลักษณะสำคัญ เช่น ต้องเพิ่มขนาดการเสพยาเสพติดขึ้นเป็นลำดับ มีความต้องการเสพทั้งทางร่างกายและจิตใจอย่างรุนแรงตลอดเวลา มีอาการถอนยาเมื่อขาดยา และสุขภาพโดยทั่วไปจะทรุดโทรมลง และตลอดถึงพืชหรือส่วนของพืชที่เป็นหรือให้ผลผลิตเป็นยาเสพติดให้โทษ หรืออาจใช้ผลิตเป็นยาเสพติดให้โทษและสารเคมีที่ใช้ในการผลิตยาเสพติดให้โทษด้วย ทั้งนี้ตามที่รัฐมนตรีประกาศในราชกิจจานุเบกษา แต่ไม่หมายความถึงยาสามัญประจำบ้านบางตำรับตามกฎหมายว่าด้วยยาที่มียาเสพติดให้โทษผสมอยู่ ได้แก่ เมทแอมเฟตามีน (Methamphetamine) เป็นต้น

1.4.2 วัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท หมายถึง “วัตถุออกฤทธิ์” ตามมาตรา ๔ ในพระราชบัญญัติวัตถุที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท พ.ศ. ๒๕๕๙ หมายความว่า วัตถุที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทที่เป็นสิ่งธรรมชาติหรือที่ได้จากสิ่งธรรมชาติ หรือวัตถุที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทที่เป็นวัตถุสังเคราะห์ ทั้งนี้ ตามที่รัฐมนตรีประกาศกำหนด ได้แก่ คีตามีน (Ketamine) เป็นต้น

1.4.3 ชีววัตถุ หมายถึง สิ่งส่งตรวจที่เก็บจากร่างกายมนุษย์หรือศพ ได้แก่ เลือด ปัสสาวะ น้ำดี อาหารในกระเพาะ (gastric contents)

## 1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

1.5.1 ทำให้ทราบแนวโน้มความเป็นไปได้ในการใช้ Paper spray-MS ในงานตรวจเมทแอมเฟตามีน ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทในปัสสาวะ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Online-SPE-LC-MS/MS)

1.5.2 ทำให้ทราบแนวทางพัฒนาวิธีการตรวจเมทแอมเฟตามีน ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท จากชีววัตถุอื่น เช่น น้ำดี อาหารในกระเพาะ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Online-SPE-LC-MS/MS)

1.5.3 ทำให้สามารถเลือกแนวทางที่เหมาะสมในการลดปัญหาภาระงานล้น (Workload) ที่เกิดจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อรายนาน โดยปรับใช้วิธี Paper spray-MS แทน



## บทที่ 2

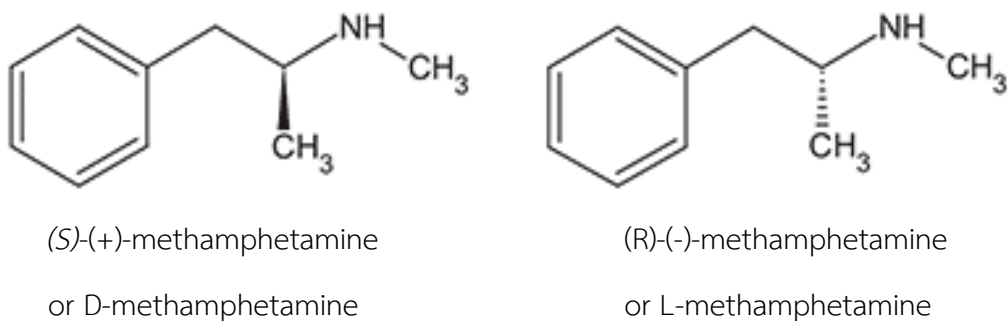
### เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษางานวิจัยเรื่อง “การพัฒนาและประยุกต์ใช้เฟเพอร์ สเปรย์ แมสสเปคโตรเมตรีในการตรวจเมทแอมเฟตามีน ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทจากชีววัตถุผู้เสียชีวิต” เป็นการศึกษาเชิงทดลองเปรียบเทียบ โดยผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องอย่างรอบด้าน สำหรับบทนี้จะกล่าวถึงสารเสพติดที่สนใจ เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาวิจัยนี้โดยเป็นเครื่องมือทางโครมาโตกราฟี และเครื่องมือที่เน้นกระบวนการทางแมส สเปคโตรเมตรี กระบวนการบริหารจัดการชีววัตถุที่จะนำมาศึกษา รวมถึงเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง โดยกำหนดเป็น 7 หัวข้อย่อยดังต่อไปนี้

1. ข้อมูลเกี่ยวกับเมทแอมเฟตามีน
2. ข้อมูลเกี่ยวกับคีตามีน
3. การใช้ Online SPE LC-MS/MS ในงานวิเคราะห์ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท
4. การใช้ Paper spray-MS (Orbitrap) ในงานวิเคราะห์ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท
5. การศึกษาเกี่ยวกับสูตรสารละลายสำหรับฉีดพ่นเป็นละอองฝอยที่เหมาะสม
6. การจัดการชีววัตถุและสิ่งส่งตรวจ (Biological specimen Management)
7. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review)

#### 2.1 ข้อมูลเกี่ยวกับเมทแอมเฟตามีน (Methamphetamine Data)

เมทแอมเฟตามีน (Methamphetamine) ย่อมาจาก N, alpha-dimethylphenethylamine มีสูตรทางเคมีคือ  $C_{10}H_{15}N$  มีน้ำหนักโมเลกุลคือ 149.24 g/mol เมทแอมเฟตามีนที่นิยมนำมาผลิตยาบ้าในประเทศไทยคือ Methamphetamine Hydrochloride มักเสพโดยการรับประทาน นำมาลนไฟแล้วสูดดม หรือฉีดเข้าทางหลอดเลือด ถ้าหากเป็นก้อนผลึกใสจะเรียกว่ายาไอซ์



ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของเมทแอมเฟตามีน

### กลไกการออกฤทธิ์ (Mechanism of action)

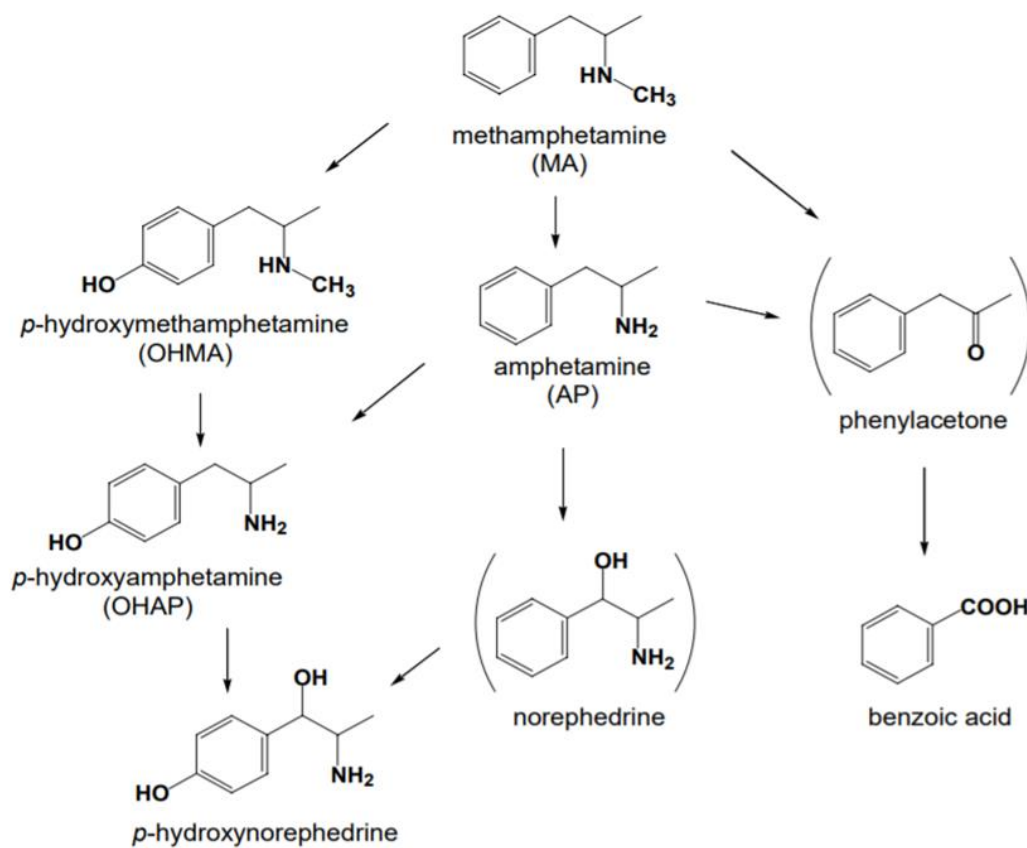
เมทแอมเฟตามีนมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลางรุนแรงกว่าแอมเฟตามีน โดยมีผลต่อสมอง และเป็นตัวกระตุ้นให้มีการหลั่ง Dopamine, Serotonin และ Norepinephrine โดยจะส่งผลอย่างมากต่อ mesolimbic reward pathways นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่ง adrenaline และ noradrenaline ออกจากเซลล์ในปริมาณมากกว่าปกติ และทำให้ vesicle ที่บรรจุ dopamine ในเซลล์ประสาทแตก และปิดกั้นการดูดกลับของสารทำให้มีปริมาณสารเสพติดอยู่จำนวนมาก ซึ่งผลของเมทแอมเฟตามีนจะทำให้เกิดความเคลิบเคลิ้ม (Euphoria) และทำให้เกิดการตอบสนองเกี่ยวกับอัตราการเต้นของหัวใจ อุณหภูมิของร่างกาย ความดันโลหิต ความกระหาย ความสนใจ ใส่ใจ อารมณ์ และการตอบสนองเกี่ยวกับการตื่นตัวและการวางเงื่อนไข และถ้าหากได้รับเมทแอมเฟตามีนในปริมาณมากจะไปกดระบบประสาทและระบบหายใจ [3]

### เภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetic)

เมทแอมเฟตามีน สามารถเสพได้โดยการรับประทาน ฉีดเข้าหลอดเลือด ฟันจุก และสูบ โดยเมทแอมเฟตามีนจะมีค่าครึ่งชีวิต (half life) อยู่ที่ 10 ชั่วโมง และออกฤทธิ์นาน 8 ชั่วโมง เมทแอมเฟตามีนมีค่าความเข้มข้นสูงสุดเมื่อเสพโดยฉีดเข้าทางหลอดเลือดหรือสูบ 1-2.5 ชั่วโมง และหลังรับประทาน 3 ชั่วโมง [4]

เมทแอมเฟตามีนจะมีการกระจายตัวคล้ายกับแอมเฟตามีน เมทแอมเฟตามีนสามารถกระจายไปทั่วทุกส่วนของร่างกาย และเนื่องจากมีความชอบไขมันสูง จึงผ่าน blood brain barrier เข้าสู่สมองได้ สามารถสะสมได้ในน้ำลาย เส้นผม เล็บ ปวด คับ สมอง และไต กระบวนการ metabolism หลักคือ N-demethylation ซึ่งคือการเปลี่ยนเมทแอมเฟตามีนเป็นแอมเฟตามีนด้วย

เอนไซม์ CYP2D6 แต่อย่างไรก็ตาม metabolism นั้นเกิดขึ้นได้น้อยทำให้สามารถตรวจพบเมทแอมเฟตามีนในรูปเดิม



ภาพที่ 3 แสดงการกำจัดออกของเมทแอมเฟตามีน

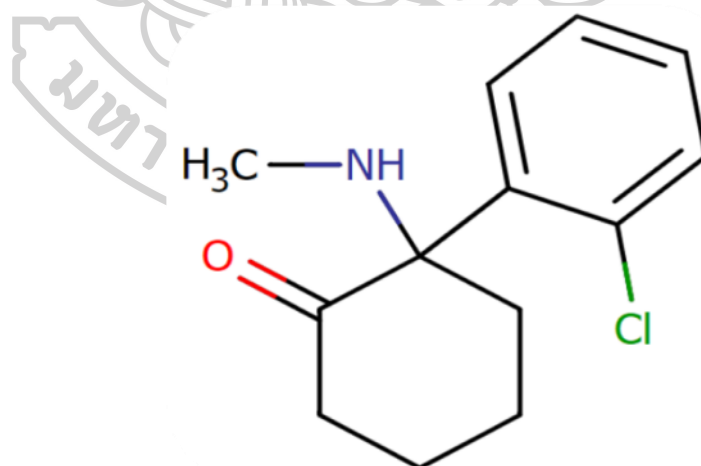
การกำจัดออกจากร่างกาย เมทแอมเฟตามีนจะถูกกำจัดออกทางปัสสาวะใน 24 ชั่วโมง คิดเป็น 70% แต่อย่างไรก็ตาม ถ้าหากเสพปริมาณสูง การกำจัดออกทางปัสสาวะจะลดลงการกำจัดออกที่ตับเป็นส่วนใหญ่ โดย cytochrome isoenzyme, CYP2D6 มี major pathways คือ aromatic hydroxylation เปลี่ยนรูปเป็น *p*-hydroxymetamphetamine และ N-demethylation เปลี่ยนรูปเป็น amphetamine มีเมทแอมเฟตามีนเพียงบางส่วนที่เปลี่ยนรูปผ่าน minor pathways ได้ norephedrine, *p*-hydroxyamphetamine, *p*-hydroxynorephedrine, และ benzoic acid [5]

จากภาพที่ 3 แสดงการกำจัดออกของเมทแอมเฟตามีนจะพบว่า เมทแอมเฟตามีนสามารถเปลี่ยนไปเป็นแอมเฟตามีนได้ ดังนั้น ผู้ที่ใช้เมทแอมเฟตามีน ก็อาจตรวจพบแอมเฟตามีนได้ด้วย

## 2.2 ข้อมูลเกี่ยวกับคีตามีน

คีตามีน (Ketamine) จัดเป็นวัตถุออกฤทธิ์ประเภท 2 ตามพระราชบัญญัติวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท พ.ศ. 2559 คีตามีนมีสูตรทางเคมีคือ  $C_{13}H_{16}NOCl$  มวลโมเลกุล 237.725 กรัม/โมล มีคุณสมบัติเป็นสารประกอบกรดอะมิโนประเภทกรดอ่อน (weakly basic amino compound) โดยมากพบในรูปเกลือไฮโดรคลอไรด์ สามารถละลายได้ดีในน้ำและแอลกอฮอล์ เมื่อละลายแล้วจะได้เป็นสารละลายใส ไม่มีสี มีค่าความเป็นกรด - ด่าง ของสารละลายที่ประมาณ 3.5 - 4.1 จากโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์สัมพันธ์กับสารเสพติด Phencyclidine (PCP) และถูกนำมาใช้ในทางที่ผิด

ปัจจุบันคีตามีนสามารถพบได้ทั้งในรูปแบบผง และสารละลาย รูปแบบผงสามารถเสพโดยวิธี Snorted หรือ smoked หรือการผสมในเครื่องดื่ม ส่วนรูปแบบที่เป็นสารละลายสามารถเสพโดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำหรือกล้ามเนื้อ (Intravenous or intramuscular injection) หรือเสพโดยวิธีผสมในเครื่องดื่มได้เช่นกัน

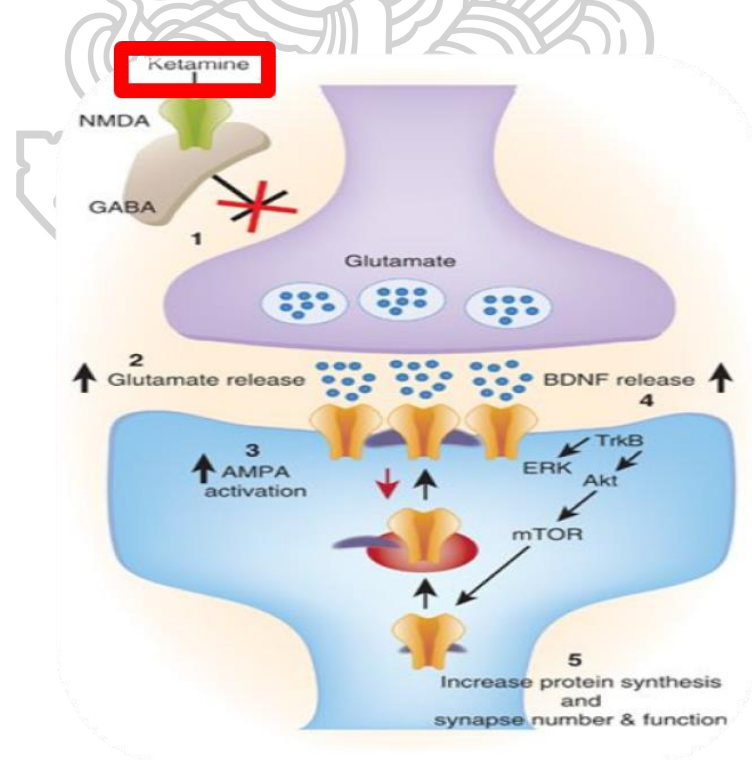


ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของคีตามีน

### เภสัชพลศาสตร์ (Pharmacodynamics)

คีตามีน เป็นยานำสลบที่ออกฤทธิ์ไว ในกลุ่ม NMDA (N-Methyl-D-aspartic acid หรือ N-Methyl-D-aspartate) ที่ใช้ในทางการแพทย์เพื่อเป็นยาสลบหรือนำสลบ โดยใช้ในรูปยาฉีดเข้ากล้ามเนื้อ หรือทางหลอดเลือดดำ ซึ่งออกฤทธิ์เร็ว มีสูตรคล้าย LSD (Lysergic acid diethylamide) และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเหมือนกับ PCP (Phencyclidine) คือ มีฤทธิ์ระงับปวด และทำให้เกิดภาวะ dissociative anesthesia ซึ่งมีอาการทาง คือ ทำให้ร่างกายสลบ ไม่เคลื่อนไหว สูญเสียความทรงจำชั่วคราว (Transient Global Amnesia) ไม่รู้สึกเจ็บปวด แต่คีตามีนมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของระบบไหลเวียนโลหิต จึงอาจทำให้ผู้ที่เข้ายาที่มีความดันโลหิต และอัตราการเต้นหัวใจเพิ่มเล็กน้อย [6]

มีกลไกในการออกฤทธิ์ คือ คีตามีนจะออกฤทธิ์ที่ตัวรับ (Receptor) ในสมอง ดังแสดงในภาพที่ 5 และยับยั้งสารสื่อประสาทที่ชื่อว่า กลูตาเมต (Glutamate) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เซลล์สมองตื่นตัว ส่งผลให้เกิดการปรับสมดุลของสารสื่อประสาท และได้ฤทธิ์ของการสงบประสาท ระงับอาการปวด โดยมีระยะเวลาของการออกฤทธิ์ประมาณ 5 - 10 นาทีในกรณีที่ฉีดยาเข้าหลอดเลือดดำ หรือประมาณ 12 - 25 นาทีในกรณีที่ฉีดยาเข้ากล้ามเนื้อ [7]



ภาพที่ 5 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของคีตามีนในการจับกับตัวรับในสมอง

เภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetic)

การดูดซึม (absorption)

คีตามีนถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้อย่างรวดเร็ว มีค่า Bioavailability ประมาณ 93% แต่หลังจากเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตับภายในร่างกายครั้งแรก (first pass metabolism) จะเหลือค่า Bioavailability ประมาณร้อยละ 17 ของขนาดยาที่รับเข้าสู่ร่างกายในตอนแรก ด้วยจับกับโปรตีนในร่างกายร้อยละ 53.5 มีค่าความเข้มข้นสูงสุดใน plasma ที่  $0.75 \mu\text{g/mL}$  ในน้ำไขสันหลัง  $0.2 \mu\text{g/mL}$  และมีค่าครึ่งชีวิต 186 นาที

การกระจาย (distribution)

คีตามีน มีการกระจายตัวอย่างรวดเร็ว มีปริมาตรการกระจายตัวใน central compartment 371.3 มิลลิลิตร/กิโลกรัม มีปริมาตรการกระจายตัวที่ steady-state 4060.3 มิลลิลิตร/กิโลกรัม

การเปลี่ยนแปลงสาร (Metabolism)

การเปลี่ยนแปลงสารคีตามีน มีการแปรสภาพหลักที่ตับ ผ่านระบบไซโตโครมพี 450 ชนิด CYP3A4, CYP2B6 และ CYP2C9 ได้สารเมตาโบไลต์ที่น่าสนใจสองชนิดคือหนึ่งผ่านกระบวนการ N-demethylation ได้ active metabolite คือ นอร์คีตามีน (Norketamine) สองผ่านกระบวนการ Dehydrogenation ได้สาร ดีไฮดรอนอร์คีตามีน (Dehydronorketamine)

การขจัดออก (excretion)

คีตามีนถูกขับออกทางปัสสาวะ ประมาณ 85 – 95% และถูกขับออกบางส่วนทางน้ำดีและอุจจาระ มีอัตราการขจัดออกจากร่างกาย 95 ลิตร/ชั่วโมง/น้ำหนักตัว 70 กิโลกรัม

อาการข้างเคียงจากการใช้สารคีตามีน จะทำให้มีอาการง่วง เห็นภาพลวงตา ฝันกลางวัน หรือประสาทหลอน ซึ่งอาการเหล่านี้จะพบภายหลังที่พ้นจากสลบ ถ้าให้ทางหลอดเลือดดำจะทำให้หัวใจเต้นเร็วขึ้น ความดันโลหิตสูงขึ้น กตการหายใจเล็กน้อย การเสพยาเป็นเวลานาน จะทำให้ผู้เสพยาต่อฤทธิ์ยา ต้องใช้ยาในปริมาณที่เพิ่มขึ้นถึงจะออกฤทธิ์เท่าเดิม จึงอาจก่อให้เกิดการอาเจียน ชัก สมอ และกล้ามเนื้อขาตึงออกซิเจนได้ และการใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้เกิดการติดยาทั้งทางร่างกาย และจิตใจ

พิษวิทยา

ชายอายุ 46 ปีได้รับบาดเจ็บสาหัส ที่ห้องผ่าตัดเขาได้รับคีตามีน 100 mg ทางเส้นเลือดดำ ก่อนผ่าตัดและต่อมาอีก 40 นาทีจึงเสียชีวิตลง ซึ่งเมื่อส่งตรวจที่นิติเวช ผลตรวจคีตามีนทางพิษวิทยา พบว่า ในเลือดพบ 3.0  $\mu\text{g/mL}$  ในสมองพบ 4.0  $\mu\text{g/mL}$  ตับ 0.8  $\mu\text{g/mL}$  และไต 0.6  $\mu\text{g/mL}$  [8]

หญิงอายุ 31 ปี พบเสียชีวิตจากการฉีดยาคีตามีน 900 mg เข้าหลอดเลือดดำตนเอง ซึ่งเมื่อส่งตรวจที่นิติเวช ผลตรวจคีตามีนทางพิษวิทยา พบว่า ในเลือดพบ 7.0  $\mu\text{g/mL}$  ในตับพบ 6.3  $\mu\text{g/mL}$  และไต 3.2  $\mu\text{g/mL}$

### 2.3 การใช้ Online SPE LC MS/MS ในงานวิเคราะห์ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท

เครื่อง Online SPE LC MS/MS (Online Solid phase extraction - Liquid chromatography - Mass spectroscopy/Mass spectroscopy) เป็น Hyphenated techniques หมายถึง การนำเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับงานวิเคราะห์มาเชื่อมต่อกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการวัดหรือวิเคราะห์โดยนำเทคนิคสามส่วนมาเชื่อมกัน ได้แก่ Sample preparation techniques คือ Solid phase extraction เชื่อมกับ Separations techniques คือ Liquid chromatography และเชื่อมกับ Detections techniques นั่นคือ MS/MS

Solid phase extraction (SPE) หรือ การสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งการสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็งเป็นเทคนิคที่ทำให้ สารตัวอย่างไหลผ่านตัวดูดซับที่บรรจุอยู่ในคาร์ทริดจ์ (SPE Cartridge) หรือแผ่นดูดซับ (SPE Disk) สารที่สนใจวิเคราะห์จะเกิดอันตรกิริยากับตัวดูดซับ แล้วถูก ชะออกจากตัวดูดซับด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ก่อนการนำไปวิเคราะห์ SPE มีข้อดีที่ เหนือกว่าการสกัดด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction, LLE) คือใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในปริมาณน้อยกว่า จึงลดการเกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมและยังสามารถประยุกต์ใช้ต่อกับเครื่องมือตรวจวัดได้ง่าย เช่น เชื่อมต่อกับเทคนิค HPLC เป็นต้น ซึ่งตัวดูดซับน้ำมีหลายชนิดด้วยกันตามความเหมาะสมในการใช้งาน และได้มีการศึกษาหาของแข็งที่บรรจุในแท่งหรือคอลัมน์ที่เหมาะสมที่ต่างกัน เช่น C18, 3-(2-aminoethylamino) propyltrimethoxysilane (AAPT) ตรึงบนซิลิกาเจล, Amberlite XAD-16-acetylacetone และ Zincon-Si-MNPs เป็นต้น ซึ่งในงานวิจัยนี้เลือกใช้ตัวดูดซับของแข็งชนิด C18

เนื่องจากได้รับความนิยมมากใน การนำมาใช้เพื่อเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ทั้งระบบออนไลน์ และออฟไลน์

**Liquid chromatography หรือ LC** คือ เครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ โดยที่สารตัวอย่างเป็นได้ทั้งของแข็งและของเหลว โดยอาศัยหลักการคือ สารแต่ละตัวเคลื่อนผ่านอนุภาคของแข็งด้วยความเร็วที่แตกต่างกัน หากตัวอย่างละลายได้ดีใน mobile phase จะออกมาเร็ว ส่วนสารที่มีความเป็นขี้ดต่ำ จะออกจาก column ช้า ตัวอย่างจะถูกบีบเข้าสู่คอลัมน์ซึ่งภายในบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งขนาดเล็ก การแยกเกิดขึ้นบนคอลัมน์ สารที่แยกได้จะออกจาก column ในเวลาที่ต่างกัน (retention time ต่างกัน) จากนั้นจะถูกส่งเข้าไปในส่วนของMS/MS เพื่อทำการวิเคราะห์ว่าเป็นสารใดต่อไป สำหรับเครื่อง Online SPE LC MS/MS มีส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้



ภาพที่ 6 ส่วนประกอบของเครื่อง LC



และมี condition ดังนี้ Column : C<sub>18</sub> length 10 cm อุณหภูมิ column เท่ากับ 55°C

mobile phase :

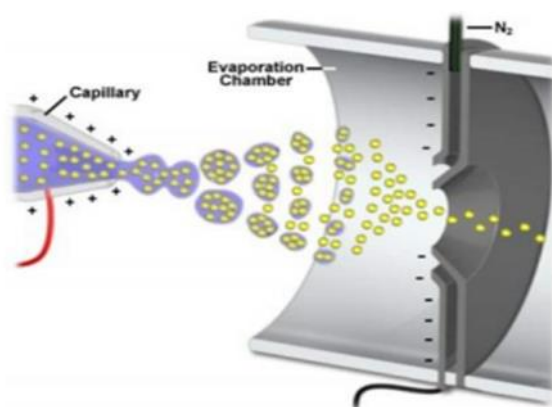
A : 0.5% formic acid in water

B : 0.5% formic acid in ACN

ในอัตราส่วน A : B = 90:10

**Mass spectroscopy หรือ MS** คือ เทคนิคการตรวจวัดที่ใช้หลักการคัดแยกมวลต่อประจุ ( $m/z$ ) โดยการแยกที่เกิดขึ้นนี้จะแสดงผลออกมาในรูปของสเปกตรัมของมวล (mass spectrum) ซึ่ง **Mass Spectrometer** มีส่วนประกอบสามส่วน คือ

1. Ion sources ทำหน้าที่เปลี่ยน sample ที่เป็นสารละลายให้เป็น gas ion ที่มีประจุบวก หรือเป็น radical cation แล้วเข้าไปสู่ส่วนต่อไปของเครื่อง ion sources มีหลายชนิด ชนิดที่ใช้ในเครื่อง Online SPE LC MS/MS คือ Electrospray ionization (ESI) ลักษณะเป็นเข็มเล็กๆ ทำหน้าที่พ่น solutions ออกมาเป็น droplet เล็กๆ และจะให้กระแสไฟฟ้าเข้าไปทำให้ droplet มีประจุจากนั้นจะให้ nitrogen gas ช่วยในการระเหยแห้ง ทำให้ droplet มีขนาดเล็กลงเรื่อยๆ ประจุใน droplet ที่เป็นประจุ เดียวกันจะอยู่ใกล้กันมากขึ้น จะเกิดแรงผลักรันจนแตกออกเป็นฝอยเล็กๆ เรียกว่าปรากฏการณ์นี้ว่า Coulombic fission



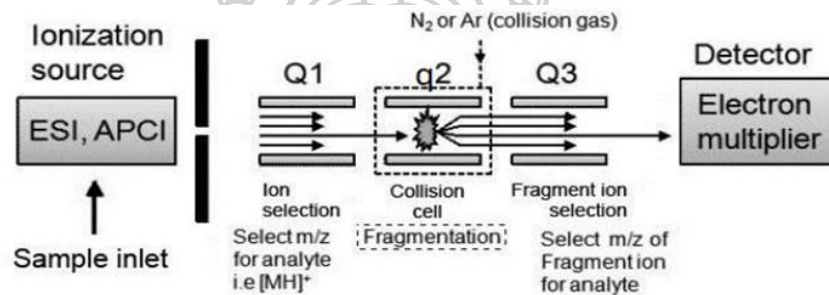
ภาพที่ 7 Electrospray ionization (ESI)

2. ส่วนของ Mass analyzer ชนิดที่ใช้ในเครื่อง Online SPE LC MS/MS คือ Triple quadrupole (QqQ) เป็น quadrupole 3 อันต่อกัน โดย

Q1 : เป็นส่วน ion selection โดยจะเลือกเฉพาะ ion ที่สนใจ (precursor ion/parent ion) ให้เข้า q2

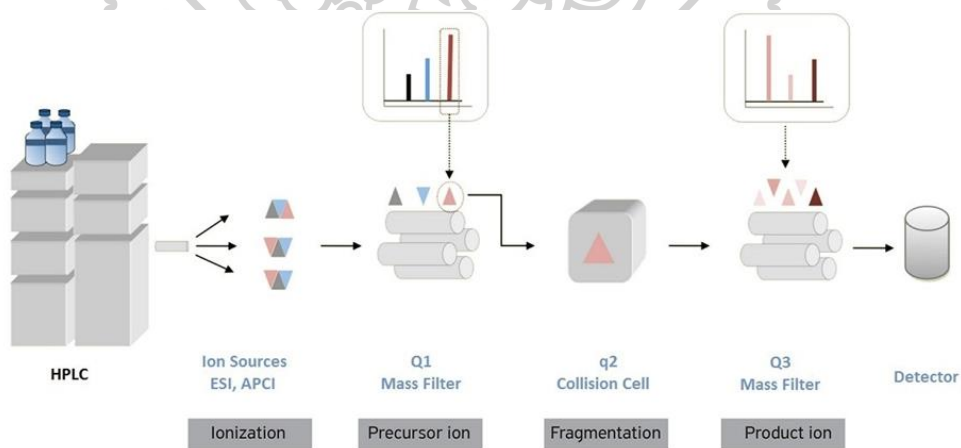
q2 : เป็นส่วน collision cell มีการให้พลังงานเข้าไป ทำให้เกิดการแตกตัวของ ion (fragmenting)

Q3 : ส่วน fragment ion selection โดยจะเลือก ion ที่แตกมาแล้ว (production/daughter ion) ที่สนใจให้เข้าไปยัง detector เนื่องจากมี ion selection 2 ครั้ง จึงเรียกเทคนิคนี้ว่า MS/MS



ภาพที่ 8 Triple quadrupole (QqQ)

3. ส่วนสุดท้ายคือ Detector



ภาพที่ 9 การทำงานของเครื่อง liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

ที่มา: creative-proteomics

สรุปการทำงานของ LC-MS/MS คือ LC ทำหน้าที่เป็นส่วนแยกสารแล้วส่ง fraction ที่น่าสนใจให้ส่วน MS วิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ

การตรวจยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตประสาทในเชิงปริมาณ (Quantitative Analysis) โดยสากลใช้เทคนิค Liquid Chromatography with Mass Spectrometer ชนิด Triple Quadrupole เนื่องจากมีความสามารถในวัดปริมาณสูงกว่า MS ชนิดอื่น ถือเป็น gold standard ในงานวิเคราะห์เชิงปริมาณ แต่ในงานวัดปริมาณนั้น ส่วนสำคัญที่สุดมีได้อยู่ที่กระบวนการวัด แต่อยู่ที่กระบวนการสกัดสารออกจากชีววัตถุ หากใช้กระบวนการที่ประสิทธิภาพจะประสบความสำเร็จสูง ปัจจุบันนิยมใช้เทคนิค Solid-Phase Extraction (SPE)

SPE เป็นเทคนิคการเตรียมและทำความสะอาดสารตัวอย่างในชีววัตถุ เช่น เลือด ปัสสาวะ หรือน้ำดี ให้สะอาดขึ้น ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอื่นต่อไปเช่น GC-MS หรือ LC-MS/MS ในการวิเคราะห์ทางพิษวิทยา ซึ่งหลักการของเทคนิค SPE นั้นจะเป็นการแยกสารปนเปื้อนต่าง ๆ ออกโดยให้สารตัวอย่างที่ต้องการดูดซับอยู่บนวัสดุบางชนิดใน cartridge แล้วทำการชะล้างสารที่ไม่ต้องการออก จากนั้นทำการเติมตัวทำละลายเพื่อดึงเอาสารผสมที่สนใจที่เกาะอยู่บนตัวดูดซับออกเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป นอกจากนั้นการเลือกใช้ชนิดตัวดูดซับจะขึ้นอยู่กับ  $pK_a$  ของสารตัวอย่างที่สนใจ

เนื่องจากกระบวนการทำ SPE เป็นงานที่ต้องทำด้วยมือในห้องปฏิบัติการจึงอาจเกิดความไม่แน่นอนหรือผิดพลาดจากมนุษย์ (human error) จึงมีการพัฒนาเครื่อง Automate SPE ขึ้น แต่ปัจจุบันมีการพัฒนาส่วน Online SPE ขึ้นเพื่อต่อกับส่วน inlet ของเครื่อง LC ทำให้ประหยัดเวลาสกัดสารและลดการสูญเสีย yield จากการสกัดด้วยมือได้ เรียกเทคโนโลยีนี้ว่า Online SPE-LC-MS/MS

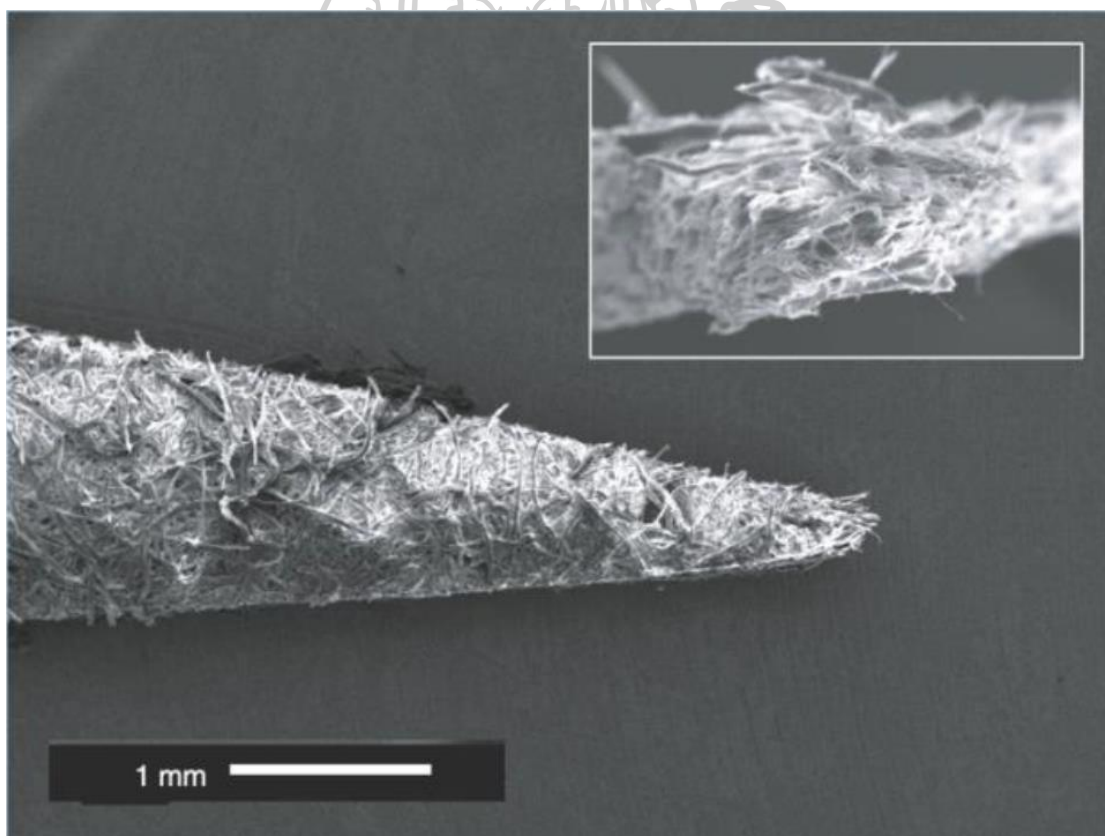
## 2.4 การใช้ Paper spray-MS ในงานวิเคราะห์ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท

โดยทั่วไปในการวิเคราะห์หาสารเสพติดให้โทษและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท นิยมใช้เทคนิค Immuno-chromatographic assay ในการตรวจคัดกรองเบื้องต้น ซึ่งตรวจได้เฉพาะสารหรือกลุ่มสารที่มีสารมาตรฐานหรือชุดตรวจสอบรองรับเท่านั้น และ LC-MS/MS หรือ GC-MS/MS ในการตรวจเพื่อยืนยันผล แต่เนื่องจากสารตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วย เครื่อง LC-MS/MS หรือ GC-MS/MS จะต้องผ่านการเตรียมตัวอย่างและการแยกก่อนการวิเคราะห์ จึงทำให้ใช้เวลาในได้รับการวิเคราะห์ในหนึ่งตัวอย่างค่อนข้างนาน ไม่เหมาะใช้กับตัวอย่างที่มีจำนวนมากและต้องการผล

วิเคราะห์ในเวลาที่รวดเร็ว นอกจากนั้นยังต้องใช้ปริมาณตัวอย่างและสารละลายต่าง ๆ ในปริมาณมากอีกด้วย และในบางครั้งเมื่อมีงานวิเคราะห์จำนวนมาก และต้องออกผลในเวลาอันสั้นหรือบางครั้งปริมาณตัวอย่างก็น้อยมาก การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Paper spray MS ซึ่งเป็นเทคนิคใหม่ที่ใช้เวลาและปริมาณตัวอย่างน้อยมากจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์ในงานลักษณะนี้

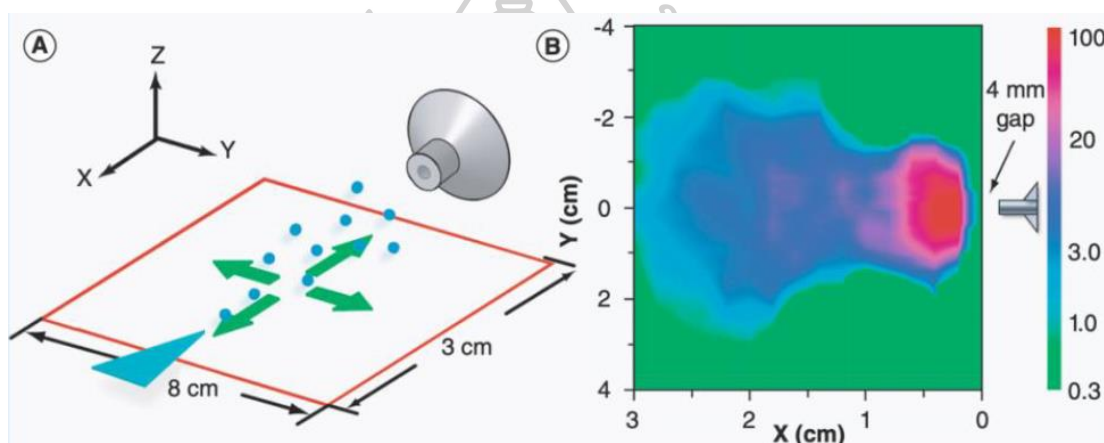
#### 2.4.1 Paper spray

ส่วนประกอบของ Paper-spray ที่ผลิตโดย Prosolia, Inc. ประกอบไปด้วย Cartridge ซึ่งเป็นพลาสติกที่บรรจุกระดาษกรอง (Whatman chromatography paper, grade 31ET-Chr) ที่มีลักษณะเป็นรูปท่อน (ภาพที่ 9) รูปปร่างเป็นสามเหลี่ยมคล้ายหยดน้ำขนาด 6 ตารางเซนติเมตร และมีลูกบอลเหล็กสำหรับการทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าอยู่ตรงกลางระหว่างช่องใส่ solvent และ sample ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 กระดาษโครมาโตกราฟีรูปสามเหลี่ยมภายใต้ Scanning electron microscope (SEM) ภายในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงภาพจากมุมสูงของปลายของสามเหลี่ยม

ปัจจัยที่มีผลต่อผลวิเคราะห์ได้แก่ ความแหลมของปลายสามเหลี่ยม ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการแตกตัวเป็นไอออน (Ionization efficiency) ลักษณะกระดาษ ไม่ว่าจะเป็นกระดาษกรอง (Filter paper) ที่มีรูพรุนขนาดต่าง ๆ กระดาษกรองแก้ว (Glass filter paper) หรือกระดาษโครมาโตกราฟี (Chromatography paper) มีการศึกษาหนึ่งได้กล่าวไว้ว่าในการวิเคราะห์หา Cocaine กระดาษกรองแก้วมีประสิทธิภาพต่ำสุดสำหรับการวิเคราะห์ และมีประสิทธิภาพดีสุดเมื่อใช้กระดาษโครมาโตกราฟี ในส่วนของตำแหน่งการวางของปลายแหลมของกระดาษนั้นไม่มีความสัมพันธ์กับความเข้มของไอออนในระยะ  $5 \times 10$  mm (x-y plane) จาก Ion transfer tube เมื่อสารทดสอบคือ Cocaine ดังที่แสดงในภาพที่ 11



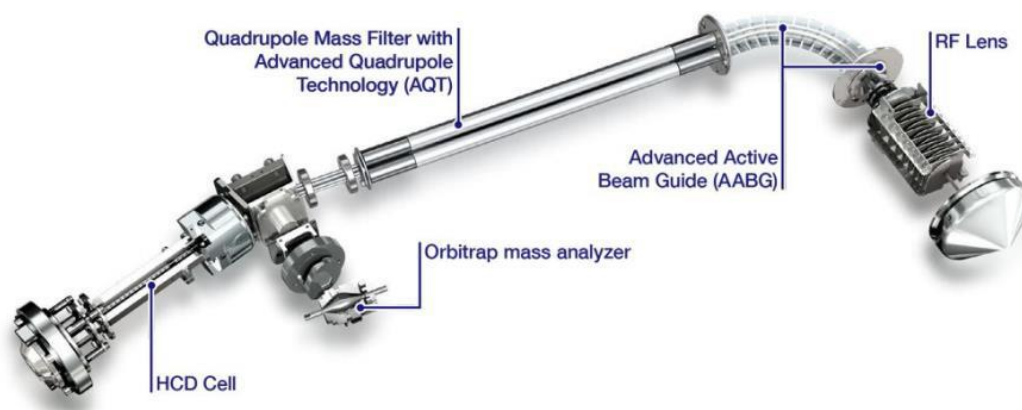
ภาพที่ 11 ตำแหน่งของปลายกระดาษ (A) และความเข้มของไอออน (B) โดยสารทดสอบคือ Cocaine

ในด้านการใช้งานเริ่มจากการหยดตัวอย่างลงบนกระดาษปริมาตร 2-10  $\mu\text{L}$  โดยเคยมีการกล่าวไว้ว่ากระดาษจะไม่เสียรูปเมื่อมีการทำให้เปียกด้วยสารละลายปริมาตร 10  $\mu\text{L}$  หลังจากนั้นนำ Cartridge ไปอบเพื่อทำให้แห้ง แล้วทำไปใส่ใน Magazine เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการวิเคราะห์ เมื่อสิ่งวิเคราะห์ตัวทำละลายจะถูกฉีดไปบนกระดาษเพื่อชะสารที่ต้องการให้เคลื่อนที่ไปที่ปลายกระดาษ และลูกเหล็กจะได้รับกระแสไฟฟ้าเพื่อทำให้เกิด Ionization จากนั้นไอออนจะเคลื่อนที่เข้าสู่แมส สเปกโตรมิเตอร์เพื่อการวิเคราะห์ผลต่อไป ข้อดีของการใช้ Paper spray คือ สะดวก รวดเร็ว เนื่องจากไม่ต้องเตรียมตัวอย่าง นอกจากนั้นยังใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย ใช้ตัวทำละลายในปริมาณน้อย [9], [10]

## 2.4.2 Mass Spectrometers

Mass Spectrometers ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นชนิด Orbitrap รุ่น Q Exactive Focus™ MS มีความรวดเร็ว ความละเอียด และความแม่นยำในระดับ High Resolution MS ซึ่งเหมาะสำหรับวิเคราะห์สารหลากหลายชนิด สามารถตรวจคัดกรองสารเป้าหมายและสารอื่น ๆ ได้ ซึ่ง MS รุ่นนี้ ประกอบไปด้วย 7 ส่วนหลักด้วยกันดังนี้ (ภาพที่ 12) ได้แก่

1. Radio frequency (RF) Lens: ช่วยทำให้อิออนเคลื่อนเป็นลำแสงที่มีความหนาแน่นสูง หลังจากการเกิด Ionization ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มความไวต่อการวิเคราะห์
2. Bent flatpole ion guide: ช่วยคัตอิออนที่เป็นกลางออกไปก่อนเข้า Quadrupole ซึ่งจะช่วยลด Noise ได้
3. Advanced active beam guide (AABG): ช่วยลด Noise และยืดระยะเวลาการบำรุงรักษาเครื่อง
4. Quadrupole mass filter with advanced quadrupole technology (AQT): เป็นตัวคัดกรองมวลที่ต้องการ
5. HCD cell ช่วยแตก fragment ของอิออนโดยแก๊ส nitrogen
6. C-trap: มีหน้าที่ในการรวมอิออน หรือ fragment ก่อนฉีดไปยัง Orbitrap mass analyzer
7. Orbitrap mass analyzer: เป็นเครื่องวิเคราะห์มวลที่มีความละเอียดสูง และแม่นยำ (High resolution accurate mass; HRAM) โดยการวัด rotational frequencies ของอิออนและแปลงข้อมูลกลับมาเป็น  $m/z$  ด้วย Fast Fourier transforms (FFTs) อิออนที่มีมวลน้อยก็จะเคลื่อนที่เร็วกว่าและมีรัศมีในการเคลื่อนที่เป็นวงแคบกว่า ในทางกลับกันอิออนที่มีมวลมากก็จะเคลื่อนที่ช้ากว่าและมีรัศมีในการเคลื่อนที่เป็นวงกว้างกว่า



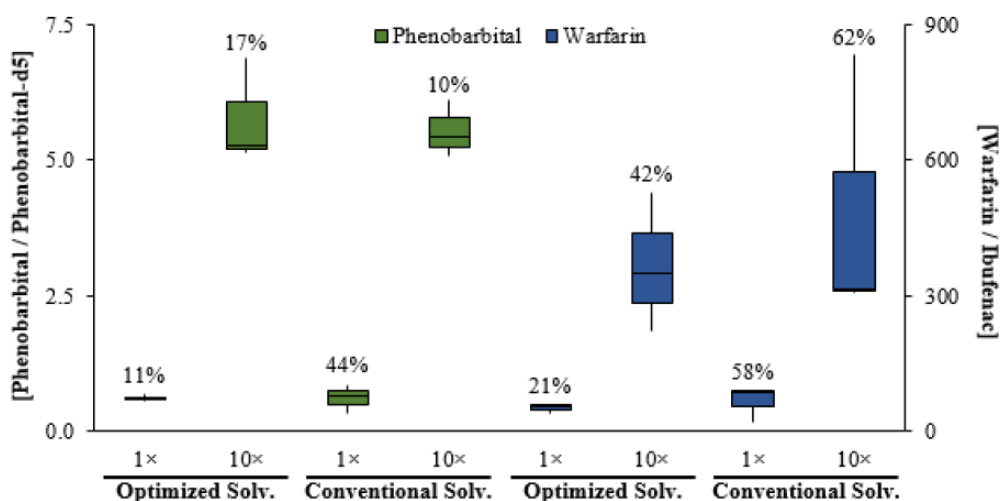
ภาพที่ 12 ภายในของ Q Exactive Orbitrap Mass Spectrometers (MS)

## 2.5 การศึกษาเกี่ยวกับสูตรสารละลายสำหรับฉีดพ่นเป็นละอองฝอยที่เหมาะสม

Josiah Michael McKenna, 2017 ศึกษาเกี่ยวกับสูตรสารละลายสำหรับฉีดพ่นเป็นละอองฝอยที่เหมาะสม (Spray Solvent Optimization) โดยเปรียบเทียบสูตรสารละลาย 2 สูตรคือ

1. optimized solvent (90: 10: 0.01 methanol:  $\text{CCl}_4$ :  $\text{NH}_4\text{OH}$ )
2. conventional PS solvent (95: 5: 0.01 methanol: water: acetic acid)

โดยทดสอบกับสารละลายยา 2 ชนิด คือ Phenobarbital และ Warfarin ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 10 เท่าที่ spike ลงในเลือด ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ได้ผลการศึกษาดังภาพ



ภาพที่ 13 box plot แสดงผลความแตกต่างของการทดสอบ spray solvent 2 สูตร

จากภาพ Josiah Michael McKenna สรุปว่าสูตรสารละลาย optimized Solvent เป็นสูตรที่เหมาะสมกว่าสูตร conventional PS solvent ในความเข้มข้นต่ำ แต่จากการพิจารณารูปภาพแล้วพบว่าในความเข้มข้นสูง สูตร conventional PS solvent ให้ความแปรปรวนต่ำกว่า และเมื่อพิจารณาด้านความปลอดภัยด้านสารเคมีแล้ว สูตรที่เป็น conventional PS solvent มีความปลอดภัยสูงกว่า เมื่อเทียบกับสูตร optimized Solvent ของ Josiah Michael McKenna เนื่องจากไม่ใช้  $\text{CCl}_4$  ซึ่งมีความเป็นพิษสูงเป็นส่วนประกอบ [9]

## 2.6 การจัดการชีววัตถุและสิ่งส่งตรวจ (Biological specimen Management)

การบริการจัดการชีววัตถุและสิ่งส่งตรวจเป็นขั้นตอนสำคัญก่อนการวิเคราะห์ [11] ซึ่งผู้ศึกษาต้องทำความเข้าใจกับสิ่งส่งตรวจ (specimen) การเก็บสิ่งส่งตรวจ การส่งสิ่งส่งตรวจทางนิติเวช รวมไปถึงการทำลายสิ่งส่งตรวจนั้นๆ เมื่อสิ้นสุดการทำงานแล้ว โดยมีหัวข้อที่น่าสนใจดังต่อไปนี้

2.6.1 สิ่งส่งตรวจ หมายถึง สิ่งที่เกิดขึ้นมาจากศพ, คน และวัตถุพยานอื่น ๆ แบ่งได้เป็น 3 ประเภทใหญ่คือ

1 สิ่งส่งตรวจจากคน หรือผู้ป่วยที่ยังมีชีวิตอยู่ ได้แก่

- 1.1 อาเจียน
- 1.2 น้ำล้างกระเพาะ
- 1.3 เลือด
- 1.4 ปัสสาวะ

2 สิ่งส่งตรวจจากศพ ได้แก่

- 2.1 อาหารในกระเพาะ หรือกระเพาะอาหารผูกขั้วหัวท้าย
- 2.2 ตับ
- 2.3 เลือด
- 2.4 ปัสสาวะ
- 2.5 กล้ามเนื้อบริเวณที่มีรอยเข็มฉีดยา
- 2.6 น้ำดี

3 วัตถุอื่นๆ ที่สงสัยว่าเป็นสารพิษ หรือมีสารพิษเจือปน ได้แก่ยารักษาโรค สารเคมี อาหารเครื่องดื่ม ต่างๆ ที่พบบริเวณใกล้เคียงผู้ป่วยหรือศพ



## 2.6.2 การเก็บสิ่งส่งตรวจ

2.6.2.1 เก็บสิ่งส่งตรวจตามจำนวนและชนิด พร้อมทั้งรักษาคุณภาพของสิ่งส่งตรวจตามที่ระบุไว้ในรายละเอียด การเก็บสิ่งส่งตรวจ

2.6.2.2 ชนิดของภาชนะบรรจุสิ่งส่งตรวจให้ใช้ตามความเหมาะสมของขนาดและปริมาณ ตามที่ระบุไว้ในรายละเอียดการเก็บสิ่งส่งตรวจ ทั้งนี้ควรแห้ง สะอาด และมีฝาปิดสนิท

2.6.2.3 มีฉลากระบุ ชื่อหรือรหัสของสิ่งส่งตรวจ ชนิดสิ่งส่งตรวจ ตำแหน่งที่เก็บสิ่งส่งตรวจ หน่วย/ผู้ส่งตรวจ วันที่และชื่อผู้เก็บสิ่งส่งตรวจ บนภาชนะบรรจุสิ่งส่งตรวจทุกตัวอย่าง อย่างชัดเจน

2.6.2.4 ควรนำส่งห้องปฏิบัติการทันที แต่ถ้าไม่สามารถทำได้ ต้องเก็บไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 2-8 °C เพื่อรอการนำส่งยังห้องปฏิบัติการ

2.6.2.5 การเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อวิเคราะห์หาสารพิษต่าง ๆ จากศพ

2.6.2.5.1 สิ่งส่งตรวจที่เป็นอาหารในกระเพาะ เก็บจากกระเพาะอาหาร วิธีเก็บ: ใส่ขวดแก้วปากกว้าง ขนาด 200 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท แช่เย็น ปริมาณที่เก็บ: เก็บให้ได้มากที่สุด

2.6.2.5.2 สิ่งส่งตรวจที่เป็นปัสสาวะ เก็บจากกระเพาะปัสสาวะวิธีเก็บ: ใส่กระบอกปิดฝาสนิท แช่เย็น ปริมาณที่เก็บ: ไม่น้อยกว่า 30 มิลลิลิตร หรือให้ได้มากที่สุด

2.6.2.5.3 สิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด เก็บจากเส้นเลือดโคนขา หรือสมอง วิธีเก็บ: ใส่หลอดแก้วปิดจุกยางสนิท แช่เย็น ปริมาณที่เก็บ: ไม่น้อยกว่า 10 มิลลิลิตร

2.6.2.5.4 สิ่งส่งตรวจที่เป็นน้ำในลูกตา เก็บจากลูกตา วิธีเก็บ: ใส่หลอดแก้วปิดจุกยางสนิท แช่เย็น ปริมาณที่เก็บ: เก็บทั้งหมดที่มี

2.6.2.5.5 สิ่งส่งตรวจที่เป็นน้ำดี เก็บจากถุงน้ำดี วิธีเก็บ: ใส่หลอดแก้วปิดจุกยางสนิท แช่เย็น ปริมาณที่เก็บ: เก็บทั้งหมดที่มี

2.6.2.5.6 สิ่งส่งตรวจที่เป็นตับ เก็บจากตับ วิธีเก็บ: ใส่ขวดแก้วปากกว้าง ขนาด 200 มล.ปิดฝาให้สนิท แช่แข็ง ปริมาณที่เก็บ: หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ บรรจุเต็มขวด (ประมาณ 500 กรัม)

### 2.6.2.6 การเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อวิเคราะห์หาสารพิษต่าง ๆ จากคนเป็น

2.6.2.6.1 สิ่งส่งตรวจที่เป็นอาเจียน / น้ำล้างกระเพาะ เก็บจากอาเจียน/น้ำล้างกระเพาะวิธีเก็บ: ใส่ขวดแก้วปากกว้าง ขนาด 200 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท แช่เย็น ปริมาณที่เก็บ: เก็บทั้งหมด

2.6.2.6.2 สิ่งส่งตรวจที่เป็นปัสสาวะ เก็บจากน้ำปัสสาวะ วิธีเก็บ: ใส่กระบอกปิดฝาสนิท แช่เย็น ปริมาณที่เก็บ: เก็บให้ได้มากที่สุด (30-60 มิลลิลิตร)

2.6.2.6.3 สิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด เก็บจากเส้นเลือดข้อพับแขน วิธีเก็บ: ใส่หลอดแก้วปิดจุกยางสนิท แช่เย็น ปริมาณที่เก็บ: ประมาณ 10-15 มิลลิลิตร

### 2.6.2.7 การเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อวิเคราะห์หาสารเสพติดจากศพ

2.6.2.7.1 สิ่งส่งตรวจที่เป็นปัสสาวะ เก็บจากกระเพาะปัสสาวะ วิธีเก็บ: ใส่กระบอกปิดฝาสนิท แช่เย็น ปริมาณที่เก็บ: ไม่น้อยกว่า 30 มิลลิลิตร หรือให้ได้มากที่สุด

2.6.2.7.2 สิ่งส่งตรวจที่เป็นน้ำดี เก็บจากถุงน้ำดี วิธีเก็บ: ใส่หลอดแก้วปิดจุกยางสนิท แช่เย็น ปริมาณที่เก็บ: เก็บทั้งหมดที่มี

2.6.2.7.3 สิ่งส่งตรวจที่เป็นตับ เก็บจากตับ วิธีเก็บ: ใส่ขวดแก้วปากกว้าง ขนาด 200 มล. ปิดฝาให้สนิท แช่แข็ง ปริมาณที่เก็บ: หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ บรรจุเต็มขวด (ประมาณ 500 กรัม)

2.6.2.7.4 สิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด เก็บจากเส้นเลือดโคนขาหรือสมอง วิธีเก็บ: ใส่หลอดแก้วปิดจุกยางสนิท แช่เย็น ปริมาณที่เก็บ: ไม่น้อยกว่า 10 มิลลิลิตร

### 2.6.2.8 การเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อวิเคราะห์หาสารเสพติดจากคนเป็น

2.6.2.8.1 สิ่งส่งตรวจที่เป็นปัสสาวะ เก็บจากน้ำปัสสาวะ วิธีเก็บ: ใส่กระบอกปิดฝาสนิท แช่เย็น ปริมาณที่เก็บ: ไม่น้อยกว่า 30 มิลลิลิตรหรือให้ได้มากที่สุด

2.6.2.8.2 สิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด เก็บจากเส้นเลือดข้อพับแขน วิธีเก็บ: ใส่หลอดแก้วปิดจุกยางสนิท แช่เย็น ปริมาณที่เก็บ: ประมาณ 10 มิลลิลิตร

### 2.6.2.9 ลำดับการเลือกเก็บตัวอย่างชีววัตถุ

2.6.2.9.1 ตรวจกลุ่ม Opiates เก็บ 1. ปัสสาวะ 2. น้ำดี 3. ตับ (กรณีเก็บข้อ 1, 2 ไม่ได้) 4. เลือด (กรณีตายคาเข็ม หรือพบ Body packer)

2.6.2.9.2 ตรวจกลุ่ม Amphetamines เก็บ 1. ปัสสาวะ 2. เลือด (กรณีพบ Body packer) 3. น้ำดี

#### 2.6.2.10 ฉลาก

สิ่งส่งตรวจทุกชนิดต้องมีฉลากกำกับ

- ระบุชื่อผู้ป่วย/ศพ เจ้าของเรื่อง สถานที่เก็บสิ่งส่งตรวจ ชนิดสิ่งส่งตรวจ ตำแหน่งที่เก็บสิ่งส่งตรวจลายมือชื่อผู้เก็บ วันที่เก็บ

- กรณีที่เป็นคดี ควรมีลายมือชื่อกำกับ พร้อมอุปกรณ์พินิกภาษาชนะ เพื่อป้องกันการสับเปลี่ยนตัวอย่าง

- ฉลากพิมพ์หรือเขียนด้วยวัสดุกันน้ำ ให้ชัดเจน

- ติดบนภาชนะในตำแหน่งที่เหมาะสม

#### 2.6.3 การส่งสิ่งส่งตรวจ

2.6.3.1 บรรจุสิ่งส่งตรวจในภาชนะให้มิดชิด เพื่อป้องกันการสูญสลายหรือเสื่อมสภาพ ควรรักษาสภาพของตัวอย่างโดยแช่เย็น/น้ำแข็งระหว่างการนำส่ง/ขนส่ง

2.6.3.2 แยกใบส่งวิเคราะห์ตัวอย่างและหนังสือนำส่ง (จากส่วนราชการ/หน่วยงาน) ไม่ให้ปนเปื้อนกับภาชนะบรรจุสิ่งส่งตรวจ เช่นใส่ถุงพลาสติก ป้องกันการซึมเปียกของน้ำแข็ง

#### 2.6.4 การรับและการเก็บรักษาสิ่งส่งตรวจ

2.6.4.1 กำหนดผู้มีหน้าที่ตรวจรับและเก็บสิ่งส่งตรวจจากผู้นำส่ง และตรวจรับตามที่ระบุไว้ในรายละเอียดการเก็บสิ่งส่งตรวจแนบท้าย

2.6.4.2 คำนึ่งถึงห่วงโซ่พยาน (chain of custody) โดยผู้นำส่งลงนามชื่อผู้ส่ง วันที่ เวลาส่ง และผู้มีหน้าที่ตรวจรับลงนามชื่อผู้รับตัวอย่าง วันที่ และเวลา หลังจากตรวจสอบความสมบูรณ์และความถูกต้องของตัวอย่าง ตามที่ระบุในหนังสือส่งตรวจ

2.6.4.3 ผู้ตรวจรับมีการบันทึก สภาพสิ่งส่งตรวจลงในหนังสือส่งตรวจ

2.6.4.4 ผู้ตรวจรับแจ้งนักวิเคราะห์ เพื่อพิจารณาว่า ต้องทำหรือควรจะทำ การตรวจวิเคราะห์อย่างรวดเร็ว สำหรับกรณีเป็นผู้ป่วย

2.6.4.5 เก็บรักษาสิ่งส่งตรวจไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 2-8 ° C ในห้องเก็บวัตถุพยาน โดยแยกเก็บตามตู้เย็นของนักวิเคราะห์เจ้าของคดีนั้นๆ และมีระบบรักษาความปลอดภัย โดยคล้องด้วยกุญแจประจำตัว

## 2.6.5 การส่งวนสิทธิ์ปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ

ห้องปฏิบัติการอาจปฏิเสธสิ่งส่งตรวจ และการตรวจได้ ในกรณีดังนี้

2.6.5.1 กรอกรายละเอียดไม่ชัดเจน ไม่ครบถ้วนหรือ ไม่ตรงกับฉลาก

2.6.5.2 การเก็บรักษาสิ่งส่งตรวจไม่ถูกต้อง

2.6.5.3 เก็บสิ่งส่งตรวจไว้นานก่อนส่งห้องปฏิบัติการ เช่น แอลกอฮอล์ สารระเหย เกิน 1 วันทำการ หรือซีวัตถุอื่น เกิน 3 วันทำการ

2.6.5.4 มีหลักฐานว่าผ่านการตรวจลักษณะเดียวกันมาแล้ว เว้นแต่มีเหตุผลสำคัญในการให้ตรวจซ้ำ

2.6.5.5 เกินความสามารถของห้องปฏิบัติการที่จะรับตรวจ เช่น บางการวิเคราะห์ที่ยังตรวจไม่ได้ ต้องส่งต่อห้องปฏิบัติการอื่น (subcontracted) หรือมีงานวิเคราะห์มากเกินไป (caseload)

## 2.6.6 การทำลายสิ่งส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจหากครบกำหนดเก็บรักษา สามารถทำลายทิ้งได้อย่างปลอดภัย โดยคำนึงถึงการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อโรคเป็นสิ่งสำคัญ โดยนักวิเคราะห์ทำบันทึกในสมุดจำหน่ายสิ่งส่งตรวจถึงหัวหน้าห้องปฏิบัติการขออนุมัติจำหน่ายสิ่งส่งตรวจที่ครบกำหนด เมื่อได้รับอนุมัติแล้ว นักวิเคราะห์จะนำสิ่งส่งตรวจดังกล่าวออกมาจากตู้เย็นเก็บสิ่งส่งตรวจ เพื่อให้พนักงานสถานที่นำไปจำหน่าย โดยการใส่ในถุงขยะสำหรับขยะติดเชื้อ (ถุงสีแดง) แล้วนำไปรวมไว้ในบริเวณสำหรับทิ้งขยะติดเชื้อของโรงพยาบาลตำรวจ เพื่อรอกำจัดอย่างถูกวิธีต่อไป ส่วนภาชนะที่ใช้ซ้ำได้ให้ดำเนินการดังนี้

- หลอดแก้ว : ให้ล้างหลอด โดยแช่น้ำยาฆ่าเชื้อนาน 1 วัน และอบแห้งก่อนนำมาใช้ซ้ำ
- จุกยาง : ให้ล้างโดยแช่น้ำยาฆ่าเชื้อนาน 1 วัน ตากให้แห้งก่อนนำมาใช้ซ้ำ
- กระบอกพลาสติกบรรจุปัสสาวะ : ใส่ถุงแดงปิดมิดชิด ฝากมูลนิธิ ดำเนินการกำจัดแทน
- ขวดแก้วปากกว้างขนาด 200 มิลลิลิตร : ให้ล้าง โดยแช่น้ำยาฆ่าเชื้อนาน 1 วัน อบแห้งก่อนนำมาใช้

## 2.7 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review)

Liu J. et al. (2010) [12] ทำการศึกษาเรื่อง Development, characterization, and application of paper spray ionization. การพัฒนา เอกลักษณ์และการประยุกต์ใช้ Paper Spray

ionization โดยทดลองใช้กระดาษ Whatman 6 ชนิดที่มีความต่างในเรื่องขนาดของรูพรุนและเนื้อกระดาษ และทดสอบกับ Spiked Heroin และ โคเคนใน Bovine whole blood โดยใช้น้ำยาสูตร Methanol/water solution (1:1, v/v) สำหรับการวิเคราะห์แบบ positive mode ใช้ voltage 4.5 kV และ -3 kV สำหรับการวิเคราะห์แบบ negative mode. ผลการศึกษาสรุปได้ว่า กระดาษแบบ glass fiber paper ไม่เหมาะสมกับการตรวจด้วย Paper spray-MS และพบว่าสามารถตรวจ Heroin และ Cocaine ได้

Ryan D. Espy *et al.* (2012) [2] ทำการศึกษาการใช้ Paper spray-MS เป็นเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์วัตถุเสพติด 8 ชนิดในครั้งเดียวจากตัวอย่างเลือด วัตถุเสพติดทั้ง 8 ได้แก่ amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine (MDEA), morphine, cocaine, and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) โดยการทำให้ spiked blood ตามวิธีของ Ryan D. Espy คือ เตรียม working drug solutions ตามความเข้มข้นที่ต้องการแล้ว spiked ในเลือดในอัตราส่วน 1:20 (10  $\mu\text{L}$  into 190  $\mu\text{L}$  blood) และปั่น 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ผลการศึกษาพบว่าเครื่อง Paper spray-MS สามารถตรวจสอบทั้ง 8 ชนิดนี้ได้จากตัวอย่างเลือดเพียง 10 ไมโครลิตรที่ spiked สารมาตรฐานวัตถุเสพติดทั้ง 8 ลงไป ภายในเวลาเพียง 2 นาที นักวิจัยกลุ่มนี้สรุปว่า วิธีการตรวจด้วย Paper spray-MS ใช้เวลาน้อยมากในการวิเคราะห์ (rapid and high-throughput assays) ซึ่งมีความเป็นไปได้หากต้องการนำไปใช้ตรวจแบบ on-site multi-compound quantitative screening of illicit drugs

Nicholas E. Manicke และ Michael Belford (2015) [13] ทำการศึกษาเรื่อง การใช้ Paper Spray-MS แบบ high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) ในการแยก Opiate Isomers (morphine, hydromorphone, and norcodeine) ผลการศึกษาสรุปได้ว่าสามารถใช้งานได้จริง

Yun Zhang *et al.* (2014) [14] ศึกษาเรื่อง Paper Spray Ionization of Noncovalent Protein Complexes ได้ข้อสรุปว่า Paper spray-MS สามารถใช้ตรวจ hemoglobin tetramer ซึ่งเป็น noncovalent protein complexes ที่มีความยุ่งยากในการตรวจ

Qian Yang *et al.* (2012) [15] ทำการศึกษาการใช้ Paper spray ionization devices ในงาน biomedical analysis ผลการศึกษาพบว่า การหยดตัวอย่างลงบนกระดาษควรทำให้สมดุลสมมาตร และปลายกระดาษยิ่งแหลมยิ่งดี ทำให้เก็บประจุได้มาก

Anyin Lia *et al.* (2011) [16] ศึกษาเรื่องการตรวจสอบสารมีขั้ว polar analytes โดยใช้สูตรน้ำยาแบบ non-polar Solvents.พบว่าเฮกเซน ซึ่งเป็นตัวทำละลายแบบไม่มีขั้ว สามารถนำมาใช้ตรวจ drugs, peptides, nucleotides and phospholipids as solids from paper ได้

การศึกษาของ Wang J. S. *et al.* (2015) [17] เรื่อง The Use of a Beveled Porous-Polypropylene Hollow Fiber for Liquid- Liquid Microextraction in Paper Spray- Mass Spectrometry ทำการศึกษาการใช้เฟเพอร์สเปรย์โดยเพิ่มเทคนิคการสกัดด้วยหลอดไฟเบอร์แบบไมโครเอ็กแทรกชัน (SPME fiber) ซึ่งหลังจากสกัดแล้วจึงนำแท่งไฟเบอร์มาตัดแล้วเข้ากระบวนการฉีดเข้าเครื่องเปรียบเทียบกับวิธีเฟเพอร์สเปรย์ปกติที่ไม่มีการสกัดสารมาก่อน โดยตรวจจาก spiked urine samples โดย spiked สาร 3 ชนิดคือ p-Chloroamphetamine, ketamine, 3,4-methylenedioxymethylamphetamine (3,4-MDMA) ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพค่า LOD ได้ แต่มีขั้นตอนที่ยุ่งยากมากขึ้น

การศึกษาของ Zhang C. และ Manicke NE. (2015) [18] เรื่อง Development of a Paper Spray Mass Spectrometry Cartridge with Integrated Solid Phase Extraction for Bio-analysis. เปรียบเทียบการตรวจสอบสาร carbamazepine, atenolol, sulfamethazine, diazepam และ alprazolam จากตัวอย่างพลาสติก เปรียบเทียบกับวิธีเฟเพอร์สเปรย์ปกติ พบว่าผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพค่า LOD ได้ แต่มีขั้นตอนที่ยุ่งยากมากขึ้น

การศึกษาของ Robert K. *et al.* [19] เรื่อง Unintentional Fatal Intoxications with Mitragynine and O-Desmethyltramadol from the Herbal Blend Krypton. รายงานอุบัติการณ์การเสียชีวิตจากการใช้สารไมทราโกนินร่วมกับ ترامาดอลจำนวน 9 ราย โดยพบปริมาณสารไมทราโกนินในเลือดในช่วง 0.02 - 0.18  $\mu\text{g/g}$  และสาร O-desmethyltramadol ในช่วง 0.4 - 4.3  $\mu\text{g/g}$ . โดยวิธี LC-MS/MS เขาสรุปว่าการเสียชีวิตเกิดจากการเสริมฤทธิ์กระตุ้น mu-receptor agonist อย่างแรงของทั้งไมทราโกนินและ ترامาดอล ซึ่งการใช้ไมทราโกนินหรือ ترامาดอลในรูปแบบเดี่ยวมีความเสี่ยงน้อยกว่า

### บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

ในบทที่ 3 ของการวิจัยเรื่อง การพัฒนาและประยุกต์ใช้เฟเพอร์ สเปรย์ แมสสเปคโตรเมทรี ในการตรวจเมทแอมเฟตามีน ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทจากชีววัตถุผู้เสียชีวิต ประกอบด้วยหัวข้อที่เกี่ยวข้องกับระเบียบวิธีวิจัยจำนวน 10 หัวข้อดังต่อไปนี้

- 3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ
- 3.2 สารเคมี
- 3.3 วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีน (stock solution) ความเข้มข้น 4000 ng/mL
- 3.4 วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีน 14 ความเข้มข้น spot บน Sample cartridges
- 3.5 วิธีการเตรียมสารละลายแบบลบล้าง (Blank solution) ปริมาตร 1000  $\mu\text{L}$  spot บน Sample cartridges
- 3.6 วิธีการเตรียม Spray solvent สำหรับ เครื่อง Paper spray-MS
- 3.7 Condition สำหรับการทำงานเครื่อง Paper spray-MS
- 3.8 หลักเกณฑ์การแปลผลการวิเคราะห์
- 3.9 Condition สำหรับการทำงานเครื่อง Online-SPE-LC-MS/MS (TSQ Quantiva™)
- 3.10 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.1.1 Autopipette 100-1000  $\mu\text{L}$  (Gilson)
- 3.1.2 Autopipette 10- 100, 0.5-10  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Research)
- 3.1.3 Autopipette tip 1000, 200  $\mu\text{L}$  (Hycon)
- 3.1.4 Autopipette tip 0.5-10  $\mu\text{L}$  (AXYGEN, T-300)
- 3.1.5 1.5 mL Short tread amber vial (Thermo Fisher Scientific)

- 3.1.6 9 mm PP Short thread vial cap (Thermo Fisher Scientific)
- 3.1.7 Vortex mixer (VORTEX-2 GENIE, Scientific Industries)
- 3.1.8 ปีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 150 และ 250 มิลลิลิตร (DURAN, Germany)
- 3.1.9 หลอดเหวี่ยงเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร (AXYGEN, SCT-15ML-25-S)
- 3.1.10 หลอดไมโครเหวี่ยงเหวี่ยง (Microcentrifuge tube) ขนาด 2 mL (AXYGEN, MCT-150-C)
- 3.1.11 อลูมิเนียม ฟอยล์ (Aluminum foil) (Firm Foil, Massmarketing)
- 3.1.12 เครื่องชั่งสำหรับงานวิเคราะห์ (Analytical balance) 4 ตำแหน่ง (Adventurer, DHAUS)
- 3.1.13 ตู้ดูดอากาศ (Prolab, Dac 2005 Plus)
- 3.1.14 ตู้เย็น 2 - 8 องศาเซลเซียส
- 3.1.15 ตู้อบความร้อน (Hot air oven) (BINDER)
- 3.1.16 PaperSpray cartridge (Prosolia, C21061-C21110)
- 3.1.17 เครื่อง Paper spray-MS ชนิด Prosolia Velox 360™ PaperSpray™ with Orbitrap (Thermo Scientific™ Q-Exactive Focus™, Thermo Fisher Scientific)
- 3.1.18 เครื่อง Online-SPE-LC-MS/MS (TSQ Quantiva™, Thermo Fisher Scientific)

## 3.2 สารเคมี

- 3.2.1 กรดแอสติก (Acetic acid) (EMSURE®, Merck KGaA)
- 3.2.2 น้ำปราศจากไอออน (De-ionized water) (ผลิตจาก SARTORIUS ARIUM 61315 และ SARTORIUS 611VF)
- 3.2.3 ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether) (EMSURE®, Merck KGaA)
- 3.2.4 เมทานอล (Methanol) (EMSURE®, Merck KGaA)
- 3.2.5 30% โซเดียม ไฮดรอกไซด์ (30% NaOH) (CARLO ERBA, 480507)
- 3.2.6 ไตรมิพรามิน (Trimipramine, Internal standard) 100 ng/mL



3.2.7 อะซิโตนไนไตรล์ (Acetonitrile) (Honeywell, Burdick&Jackson<sup>®</sup>, AH015-4)

3.2.8 สารมาตรฐานเมทแอมเฟตามีน (กรมวิทยาศาสตร์บริการ)

3.2.9 สารมาตรฐานคีตามีน (กรมวิทยาศาสตร์บริการ)

3.2.10 Drug Free Urine, Human Donor as Blank

### 3.3 วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีน (stock solution) ความเข้มข้น 4000 ng/mL

3.3.1 ปิเปต Drug Free Urine 1500  $\mu$ L ลงใน vial ขนาด 1.5 mL

3.3.2 ปิเปต Drug Free Urine 6  $\mu$ L ออกจาก vial ขนาด 1.5 mL

3.3.3 ปิเปต standard Metamphetamine 6  $\mu$ L ลงใน vial ขนาด 1.5 mL

3.3.4 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เก็บในตู้เย็น 2 - 8 องศาเซลเซียส

### 3.4 วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีน 14 ความเข้มข้น spot บน Sample cartridges

3.4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายดังต่อไปนี้ 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, และ 2000 ng/mL โดยการปิเปต Stock Methamphetamine Standard ลงใน vial ขนาด 1.5 mL หลังจากนั้น ปิเปต 10  $\mu$ g/mL Trimipramine ลงใน vial ขนาด 1.5 mL ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10000 ng/mL และสุดท้ายเจือจางด้วยการปิเปต Drug Free Urine ลงใน vial ขนาด 1.5 mL ด้วยปริมาตรตามตาราง 1 และผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณสารเพื่อเตรียมสารมาตรฐานเมทแอมเฟตามีน จำนวน 14 ความเข้มข้น

ความเข้มข้น สุดท้าย	ปริมาตร Methamphetamine standard stock solution ( $\mu\text{L}$ )	ปริมาตร Trimipramine ( $\mu\text{L}$ )	ปริมาตร Drug Free Urine ( $\mu\text{L}$ )	ปริมาตรรวม ( $\mu\text{L}$ )
1	0.50	200.00	1799.50	2000.00
5	0.50	40.00	359.50	400.00
10	0.50	20.00	179.50	200.00
25	1.25	20.00	178.25	200.00
50	2.50	20.00	177.50	200.00
100	5.00	20.00	175.00	200.00
250	12.50	20.00	167.50	200.00
500	25.00	20.00	155.00	200.00
750	37.50	20.00	142.50	200.00
1000	50.00	20.00	130.00	200.00
1250	62.50	20.00	117.50	200.00
1500	75.00	20.00	105.00	200.00
1750	87.50	20.00	92.50	200.00
2000	100.00	20.00	80.00	200.00

3.4.2 นำ sample cartridges มาวางบน Glass sheet

3.4.3 ปิเปตสารมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนแต่ละความเข้มข้น 10  $\mu\text{L}$  spot ลงบน sample cartridge ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ

3.4.4 นำ sample cartridges อบที่ 40 °C เป็นเวลา 15 นาทีด้วย Hot air oven

3.4.5 นำ sample cartridges ไปเรียงบน magazine พร้อมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Paper spray-MS

### 3.5 วิธีเตรียมสารละลายแบลนด์ (Blank solution) ปริมาตร 1000 $\mu\text{L}$ spot บน Sample cartridges

- 3.5.1 ปิเปต Drug Free Urine 900  $\mu\text{L}$  ลงใน vial ขนาด 1.5 mL
- 3.5.2 ปิเปต 10  $\mu\text{g/mL}$  Trimipramine 100  $\mu\text{L}$  ลงใน vial ขนาด 1.5 mL
- 3.5.3 ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer
- 3.5.4 นำ sample cartridges มาวางบน Glass sheet
- 3.5.5 ปิเปต blank solution 10  $\mu\text{L}$  ลงบน sample cartridge 4 ซ้ำ
- 3.5.6 นำ sample cartridges อบที่ 40 °C เป็นเวลา 15 นาทีด้วย Hot air oven
- 3.5.7 นำ sample cartridges ไปเรียงบน magazine พร้อมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Paper-spray- MS

### 3.6 วิธีเตรียม Spray solvent สำหรับ เครื่อง Paper spray-MS

วิธีเตรียม Acetonitrile : Water : 10 M Acetic acid (90 : 10 : 0.01, v/v) ปริมาตร 50 mL

- 3.6.1 เท Acetonitrile ใส่บีกเกอร์ขนาด 50 mL
- 3.6.2 ตวง Acetonitrile จากบีกเกอร์ลงในกระบอกตวงขนาด 50 mL ให้ได้ปริมาตร 45 mL
- 3.6.3 เทน้ำกลั่นใส่บีกเกอร์ขนาด 50 mL
- 3.6.4 เทน้ำกลั่นจากบีกเกอร์ลงในกระบอกตวงให้ได้ปริมาตรรวม 50 mL
- 3.6.5 เท 10 M Acetic acid ใส่บีกเกอร์ขนาด 50 mL
- 3.6.6 ปิเปต 10 M Acetic acid ปริมาตร 5  $\mu\text{L}$  ลงในกระบอกตวง
- 3.6.7 เทสารละลายในกระบอกตวงใส่ขวด Duran
- 3.6.8 นำไป sonicate เพื่อขจัดฟองอากาศ

### 3.7 Condition สำหรับการดำเนินงานเครื่อง Paper spray-MS

#### 3.7.1 Paper-Spray (Prosolia Velox 360™)

Acquisition time	1 minute
Sample volume	10 $\mu\text{L}$ of urine containing standards and internal Standard
Solvent	ACN : H <sub>2</sub> O : 10M Acetic acid (90 : 10 : 0.01)
Solvent dispense volume	60 $\mu\text{L}$

#### 3.7.2 Orbitrap Mass spectrometer (Q Exactive Focus™)

##### 3.7.2.1 General

Polarity	Positive
dd-MS2	Confirmation

##### 3.7.2.2 Full MS

Resolution (FWHM)	70000
Scan range	50 to 500 m/z
AGC target	$3e^6$
Maximum IT	50 ms

##### 3.7.2.3 dd-MS2 Confirmation

Resolution (FWHM)	35000
Isolation window	1.0 m/z
(N)CE / stepped (N)CE	n <sub>ce</sub> : 15, 45, 60
Fixed first mass	50.0 m/z
AGC target	$2e^4$
Minimum AGC target	$1.00e^4$

### 3.8 หลักเกณฑ์การแปลผลการวิเคราะห์

#### 3.8.1 หลักเกณฑ์การแปลผล LOD (Limit of detection)

- ตรวจพบ Chronogram Mass error: NMT  $\pm 5$  ppm

#### 3.8.2 หลักเกณฑ์การแปลผล LODc (Limit of detection confirmed)

ตรวจพบพารามิเตอร์ต่อไปนี้อย่างน้อย 2 ใน 3 เช่น 1 & 2 หรือ 1 & 3 หรือพบทั้ง 3

พารามิเตอร์ ได้แก่

(1) ตรวจพบ Chronogram Mass error: NMT  $\pm 5$  ppm

(2) ตรวจพบ Fragment ions matching Mass error: NMT  $\pm 5$  ppm and Minimum of fragments needed:  $\geq 2$

(3) ตรวจพบ Isotopic pattern comparison Mass error: NMT  $\pm 5$  ppm and Matching score:  $> 80\%$

### 3.9 Condition สำหรับการทำงานของเครื่อง Online-SPE-LC-MS/MS (TSQ Quantiva™)

ค่าเบื้องต้นในการสั่งการให้เครื่อง Online-SPE-LC-MS/MS (TSQ Quantiva™) ทำการสกัดและแยกสารประกอบด้วยชุดโปรแกรมสำหรับตัวเครื่องลิควิดโครมาโตกราฟีตามหัวข้อที่ 3.9.1 และชุดโปรแกรมสำหรับสั่งการให้สกัดสารด้วย Fixed Solid Phase Extraction ตามหัวข้อ 3.9.2 และข้อกำหนดสำหรับส่วนตรวจวัด MS ตามหัวข้อ 3.9.3

3.9.1 LC conditions ข้อกำหนดสำหรับส่วนแยกสารเครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี ให้ตั้งโปรแกรมตามตารางด้านล่าง โดยเลือกและใส่ตัวเลขตามที่ตารางกำหนด

LC	Ultimate 3000™
Analytical column	Hypersil Gold PFP 1.9 $\mu\text{m}$ 2.1x100 mm
Column temperature	55 °C
SPE Column	Hypersep Retain PEP Online SPE 2.1x20 mm
Injection volume	20 $\mu\text{L}$
Runtime	11 minutes

3.9.2 Pump condition ข้อกำหนดสำหรับส่วนสกัดสารด้วย Fixed SPE ให้ตั้งโปรแกรมตามตารางด้านล่าง โดยใส่ตัวเลขตามที่ตารางกำหนด

Pump Left				Pump Right		
Pump left (analytical column) A: 0.5% FA in water B: 0.5% FA in ACN				Pump right (SPE column) A: 2mM Ammonium acetate in water : MeOH (85:15)		
Time (min)	Flow (mL/min)	% A	% B	Time (min)	Flow (mL/min)	Value position
0.0	0.900	90	10	0.0	3.000	Load
1.3	0.900	90	10	1.5	3.000	Inject
3.1	0.900	0	100	2.5	0.300	Inject
5.5	0.900	0	100	5.0	0.300	Inject
5.6	0.900	90	10	6.0	3.000	Load
11	0.900	90	10	11.0	3.000	Load

3.9.3 MS condition ข้อกำหนดสำหรับส่วนตรวจวัด Mass Spectrometry ให้ตั้งโปรแกรมตามตารางด้านล่าง โดยเลือกและใส่ตัวเลขตามที่ตารางกำหนด

MS	TSQ Quantiva™
Ionization mode	Heated Electrospray (HESI)
Polarity	Positive
Spray voltage	3500 V
Sheath gas and Aux gas	50 Arb and 15 Arb
Ion transfer tube temperature	350 °C
Vaporizer temperature	400 °C
CID gas	1.5 mTorr
Dwell time	10 ms
Q1, Q3 resolution (FWHM)	0.7

3.9.4 m/z condition ค่ามวลต่อประจุสำหรับสารเมทแอมเฟตามีน คีตามีน และสารมาตรฐานภายใน ไตรมิพรามีน ให้ใส่ตัวเลขตามที่ตารางกำหนด

Compound	Precursor m/z	Targeted m/z	Confirming m/z	CE (V)
Methamphetamine	150.15	91.11	119.11	19, 10
Ketamine	238.350	220.056	125.389	34, 24
Trimipramine (ISTD)	295.28	100.17	58.17	18, 31

### 3.10 วิธีดำเนินการวิจัย

3.10.1 ทดสอบความเหมาะสมของสูตรสารละลายสำหรับฉีดพ่นเป็นละอองฝอยที่เหมาะสม (Spray Solvent Optimization) เปรียบเทียบระหว่างสูตร Conventional PS solvent (95 : 5 : 0.01 methanol : water : acetic acid) กับสูตรที่ปรับปรุง (90 : 10 : 0.01 Acetonitrile : water : 10 M acetic acid)

3.10.2 คัดเลือกสูตรสารละลายสำหรับฉีดพ่นเป็นละอองฝอยที่เหมาะสม โดยใช้สถิติ Paired t-Test

3.10.3 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดค่าเมทแอมเฟตามีนได้ (Limit of detection: LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ในระดับยืนยัน (Limit of detection confirmed: LODc) โดยทำการทดลองเพื่อสังเกตพารามิเตอร์ที่เป็นเกณฑ์ตัดสิน โดยทดสอบกับสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีน 14 ความเข้มข้น คือ 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, และ 2000 ng/mL

3.10.4 การสร้างกราฟมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนด้วยเครื่อง Paper spray MS

3.10.5 นำปัสสาวะตัวอย่างจากศพที่เก็บรวบรวมไว้ 25 ตัวอย่าง โดยเป็นการเก็บแบบสุ่ม ทดสอบหาปริมาณด้วยเครื่อง Paper spray-MS

3.10.6 การสร้างกราฟมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนด้วยเครื่อง Online SPE-LC-MS/MS

3.10.7 นำปัสสาวะตัวอย่างจากศพที่เก็บรวบรวมไว้ 25 ตัวอย่าง ตามข้อ 3.10.5 ทดสอบหาปริมาณด้วยเครื่อง Online SPE-LC-MS/MS ซึ่งผลที่ได้ใช้เป็นค่าอ้างอิง เนื่องจากวิธีนี้เป็น gold standard method

3.10.8 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะที่วัดได้จากเครื่องมือทั้งสอง โดยใช้สถิติ เช่น Paired t-Test

3.10.9 ทำการทดสอบการหาปริมาณเมทแอมเฟตามีนในชีววัตถุที่เป็นน้ำดี โดยเป็นการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มจำนวน 17 ตัวอย่าง โดยวิธี Paper spray-MS โดยตัวอย่างน้ำดีดังกล่าวผ่านการตรวจยืนยันว่าพบเมทแอมเฟตามีนด้วยวิธี LC-MS/MS แล้ว

3.10.10 ทำการทดสอบการหาปริมาณเมทแอมเฟตามีนในชีววัตถุที่เป็นอาหารในกระเพาะ โดยเป็นการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มจำนวน 17 ตัวอย่าง โดยวิธี Paper spray-MS โดยตัวอย่างอาหารในกระเพาะดังกล่าวผ่านการตรวจยืนยันว่าพบเมทแอมเฟตามีนด้วยวิธี LC-MS/MS

3.10.11 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดค่าคีตามีนได้ (Limit of detection: LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ในระดับยืนยัน (Limit of detection confirmed: LODc) โดยทำการทดลองเพื่อสังเกตพารามิเตอร์ที่เป็นเกณฑ์ตัดสิน โดยทดสอบกับสารละลายมาตรฐานคีตามีน 9 ความเข้มข้น คือ 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 ng/mL

3.10.12 การสร้างกราฟมาตรฐานคีตามีนด้วยเครื่อง Paper-spray MS

3.10.13 นำปัสสาวะตัวอย่างจากผู้ต้องหาที่เก็บรวบรวมไว้ 20 ตัวอย่างโดยเป็นการเก็บแบบสุ่ม ทดสอบหาปริมาณด้วยเครื่อง Paper spray-MS

3.10.14 การสร้างกราฟมาตรฐานคีตามีนด้วยเครื่อง Online SPE-LC-MS/MS

3.10.15 นำปัสสาวะตัวอย่างจากผู้ต้องหาที่เก็บรวบรวมไว้ 20 ตัวอย่าง ทดสอบหาปริมาณด้วยเครื่อง Online SPE-LC-MS/MS

3.10.16 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเข้มข้นคีตามีนในปัสสาวะที่วัดได้จากเครื่องมือทั้งสอง โดยใช้สถิติ เช่น Paired t-Test

3.10.17 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัยทั้งหมด



## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิจัยเรื่อง การพัฒนาและประยุกต์ใช้เฟเซอร์ สเปรย์ แมสสเปคโตรเมทรีในการตรวจเมทแอมเฟตามีน ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทจากซีวีวัตถุผู้เสียชีวิต เป็นการศึกษาเชิงทดลอง ผลการศึกษาประกอบด้วยหัวข้อทั้งหมด 4 หัวข้อ ตามลำดับดังนี้

4.1 ผลการศึกษาเกี่ยวกับสูตรสารละลายสำหรับฉีดพ่นเป็นละอองฝอยที่เหมาะสม (Spray Solvent Optimization)

4.2 ผลการประยุกต์ใช้ Paper spray MS ในการตรวจยาเสพติด (เมทแอมเฟตามีน)

4.3 ผลการประยุกต์ใช้ Paper spray MS ในการตรวจวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท (คีตามีน)

4.4 การเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างซีวีวัตถุด้วยวิธี Paper spray MS และ Online-SPE-LC-MS/MS

#### 4.1 ผลการศึกษาเกี่ยวกับสูตรสารละลายสำหรับฉีดพ่นเป็นละอองฝอยที่เหมาะสม (Spray Solvent Optimization)

สารละลายสำหรับฉีดพ่นเป็นละอองฝอย ทำหน้าที่ชะสารที่สนใจให้หลุดออกจากแผ่นกระดาษ (Paper) และถูกดูดเข้าสู่ระบบวัดมวลสารเพื่อการวิเคราะห์เอกลักษณ์ต่อไป ดังนั้น Spray solvent นี้จึงมีความสำคัญและเป็นปัจจัยหนึ่งที่บ่งชี้ว่าการวิเคราะห์ด้วย Paper spray MS จะสำเร็จหรือไม่ หากเลือก Spray solvent ที่ไม่เหมาะสมก็จะกระทบต่อการวิเคราะห์นั้นๆ Spray solvent ที่นำมาทดสอบมี 2 สูตร คือ

สูตรที่ 1 Conventional PS solvent (95 : 5 : 0.01 methanol : water : acetic acid)

สูตรที่ 2 เป็นสูตรที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ (90 : 10 : 0.01 Acetonitrile : water : 10 M acetic acid)

ทดสอบโดย spike เมทแอมเฟตามีนความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 ng/mL ใน blank urine และใช้สาร Trimipramine ความเข้มข้น 5,000 ng/mL เป็น Internal standard วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Paper spray MS แล้ววัดค่า response area ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงอัตราส่วน Response area

ความเข้มข้น (ng/mL)		Response area Methamphetamine		Response area Trimipramine		Ratio Response area of Methamphetamine /Trimipramine	
		สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2
250	ครั้งที่ 1	21636766	26169774	16263756	10891774	0.1330	0.2403
		80	69	207	533		
	ครั้งที่ 2	18916939	21275402	11404558	93953977	0.1659	0.2264
		63	53	993	60		
250	ครั้งที่ 3	10955984	22789810	61154707	67645750	0.1792	0.3369
		21	85	07	05		
	เฉลี่ย	17169896	23411662	11261261	90172490	0.1525	0.2596
		88	69	969	99		
500	ครั้งที่ 1	14847951	20712078	38196257	45689079	0.3887	0.4533
		58	54	57	74		
	ครั้งที่ 2	54527599	31767506	51628533	61892824	0.1056	0.5133
		9	43	03	48		
500	ครั้งที่ 3	12592112	53300920	25081275	11658925	0.5021	0.4572
		63	91	98	534		
	เฉลี่ย	10964274	35260168	38302022	74723719	0.2863	0.4719
		73	63	19	85		
1,000	ครั้งที่ 1	18269098	76816900	21681253	10688051	0.8426	0.7187
		73	62	31	128		
	ครั้งที่ 2	29805320	41201236	26704858	49458913	0.1116	0.8330
		9	66	64	84		
1,000	ครั้งที่ 3	50408312	52262763	49199910	52131882	1.0246	1.0025
		91	24	38	25		
	เฉลี่ย	23885981	56760300	32528674	69490435	0.7343	0.8168
		24	17	11	79		

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความแตกต่างของสูตรน้ำยาทั้งสองด้วยสถิติ Paired t-Test

สูตร	n	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	ความแตกต่างรายคู่		t	Sig
				ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน		
Spray solvent							
สูตรที่ 1	9	0.3837	0.34257	-0.14760	0.26283	-1.685	0.131
สูตรที่ 2	9	0.5313	0.26822				

เมื่อทดสอบความแตกต่างของอัตราส่วน Methamphetamine-Response area กับ Trimipramine-Response area ระหว่าง Spray solvent ทั้งสองสูตร โดยใช้สถิติ Paired t Test (ตารางที่ 3) พบว่าสารละลายสำหรับฉีดพ่นเป็นละอองฝอยสูตร 1 (95 : 5 : 0.01 methanol : water : acetic acid) ได้ค่าเฉลี่ย 0.3837 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.34257 ส่วนสูตรที่ 2 (90 : 10 : 0.01 Acetonitrile : water : 10 M acetic acid) ได้ค่าเฉลี่ย 0.5313 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน 0.26822

และเมื่อทดสอบความแตกต่างของอัตราส่วน Methamphetamine-Response area กับ Trimipramine-Response area พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 ดังนั้นจึงสรุปว่าสารละลายสำหรับฉีดพ่นเป็นละอองฝอยทั้งสองสูตรไม่แตกต่างกันเชิงสถิติ

แต่จากตารางที่ 2 พบว่าสารละลายสูตร 2 ให้ค่า Response area สำหรับสารแต่ละชนิดเฉลี่ยสูงกว่าสารละลายสูตร 1 ซึ่งแสดงถึงความไวและความสามารถในการชะสาร ซึ่งมีประโยชน์ต่อการวิเคราะห์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้สารละลายสำหรับฉีดพ่นเป็นละอองฝอย (Spray Solvent Optimization) สูตร 2 ในการศึกษาวิจัยนี้

#### 4.2 ผลการประยุกต์ใช้ Paper spray MS ในการตรวจยาเสพติด (เมทแอมเฟตามีน)

4.2.1 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดค่าเมทแอมเฟตามีนได้ (Limit of detection: LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ในระดับยืนยัน (Limit of detection confirmed: LODc)

วิเคราะห์ค่า LOD และ LODc ของเมทแอมเฟตามีนโดยการเตรียมสารมาตรฐานเมทแอมเฟตามีน 14 ความเข้มข้นดังนี้ 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, และ 2000 ng/mL ใน blank urine โดยใช้ Trimipramine เป็น internal standard และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Paper spray MS ทำ 3 ซ้ำ ได้ผลการวิเคราะห์ดังตาราง 4

ตารางที่ 4 แสดงพารามิเตอร์ที่ตรวจพบในการวัด LOD และ LODc

ความเข้มข้น (ng/mL)	ครั้งที่	Methamphetamine			Trimipramine		
		Chronogram	Fragment ions matching	Isotopic pattern comparison	Chronogram	Fragment ions matching	Isotopic pattern comparison
1	1	P	-	-	P	P	P
	2	P	-	-	P	P	P
	3	P	-	-	P	P	P
5	1	P	-	-	P	P	P
	2	P	-	P	P	P	P
	3	P	-	-	P	P	P
10	1	P	-	P	P	P	P
	2	P	-	P	P	P	P
	3	P	-	-	P	P	P
25	1	P	-	-	P	P	P
	2	P	-	-	P	P	P
	3	P	-	-	P	P	P
50	1	P	-	-	P	P	P
	2	P	-	P	P	P	P
	3	P	-	P	P	P	P

ตารางที่ 4 แสดงพารามิเตอร์ที่ตรวจพบในการวัด LOD และ LODc (ต่อ)

ความเข้มข้น (ng/mL)	ครั้งที่	Methamphetamine			Trimipramine		
		Chronogram	Fragment ions matching	Isotopic pattern comparison	Chronogram	Fragment ions matching	Isotopic pattern comparison
100	1	P	-	-	P	P	P
	2	P	P	P	P	P	P
	3	P	-	P	P	P	P
250	1	P	P	P	P	P	P
	2	P	P	P	P	P	P
	3	P	-	P	P	P	P
500	1	P	P	P	P	P	P
	2	P	P	P	P	P	P
	3	P	P	P	P	P	P
750	1	P	P	P	P	P	P
	2	P	P	P	P	P	P
	3	P	P	P	P	P	P
1,000	1	P	P	P	P	P	P
	2	P	P	P	P	P	P
	3	P	P	P	P	P	P
1,250	1	P	P	P	P	P	P
	2	P	P	P	P	P	P
	3	P	P	P	P	P	P
1,500	1	P	P	P	P	P	P
	2	P	P	P	P	P	P
	3	P	P	P	P	P	P

ตารางที่ 4 แสดงพารามิเตอร์ที่ตรวจพบในการวัด LOD และ LODc (ต่อ)

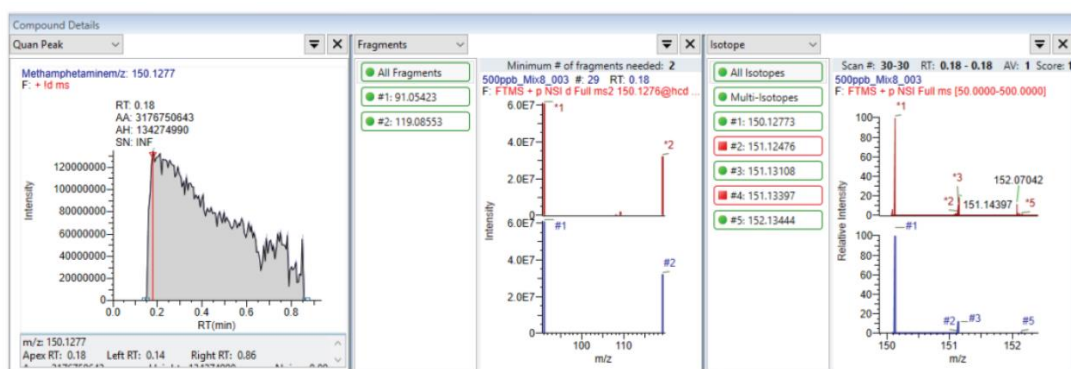
ความเข้มข้น (ng/mL)	ครั้งที่	Methamphetamine			Trimipramine		
		Chronogram	Fragment ions matching	Isotopic pattern comparison	Chronogram	Fragment ions matching	Isotopic pattern comparison
1,750	1	P	P	P	P	P	P
	2	P	P	P	P	P	P
	3	P	P	P	P	P	P
2,000	1	P	P	P	P	P	P
	2	P	P	P	P	P	P
	3	P	P	P	P	P	P

หมายเหตุ P หมายถึง ตรวจพบพารามิเตอร์ตามเกณฑ์ที่กำหนด – หมายถึง ตรวจไม่พบพารามิเตอร์ตามเกณฑ์ที่กำหนด

จากตารางที่ 4 เมื่อแปลผลการวิเคราะห์ค่า LOD ของวิธีตรวจเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะด้วยเครื่อง Paper spray MS ตามวิธีของ McKenna *J et al*, 2018 ซึ่งระบุว่า ค่า LOD คือความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบพีก (Peak detection) หรือพบ Chronogram ที่มีค่า Mass error : NMT ในช่วง  $\pm 5$  ppm ดังนั้นจากการทดลองทำให้ทราบว่าค่า LOD ในการศึกษานี้เท่ากับ 1 ng/mL

เมื่อวิเคราะห์ค่า LODc ของวิธีตรวจเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะด้วยเครื่อง Paper spray MS ตามวิธีของ Kristine *et al*. โดยค่า LODc คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่พบพารามิเตอร์ 2 ใน 3 คือ ตรวจพบ Chronogram ร่วมกับการพบ Fragment ions matching ( $\geq 2$ ) หรือ Isotopic pattern Comparison (Matching score > 80%) ดังนั้นจากการทดลองทำให้ทราบว่าค่า LODc เท่ากับ 250 ng/mL

แต่สำหรับการแปลผลในการศึกษาฉบับนี้ ผู้วิจัยยึดเกณฑ์ที่เข้มงวดคือ LODc คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่พบพารามิเตอร์ทั้งสาม (ภาพที่ 14) ดังนั้นค่า LODc สำหรับการศึกษานี้จึงเท่ากับ 500 ng/mL ซึ่งแสดงว่าหากปัสสาวะมีเมทแอมเฟตามีนสูงกว่า 500 ng/mL การตรวจด้วยเครื่อง Paper spray MS จะให้ผลในระดับยืนยันได้

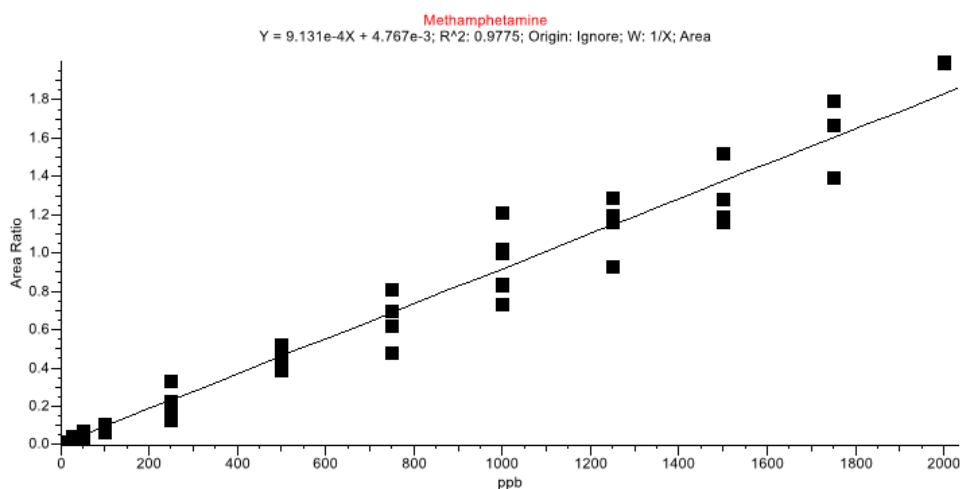


ภาพที่ 14 แสดงตัวอย่าง Chromatogram (ซ้าย), Fragment ions matching (กลาง) และ Isotopic pattern comparison (ขวา) ของเมทแอมเฟตามีน

#### 4.2.2 ผลเปรียบเทียบปริมาณเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะโดยวิธี Paper spray MS และวิธี Online SPE-LC-MS/MS

##### 4.2.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนด้วยเครื่อง Paper spray MS

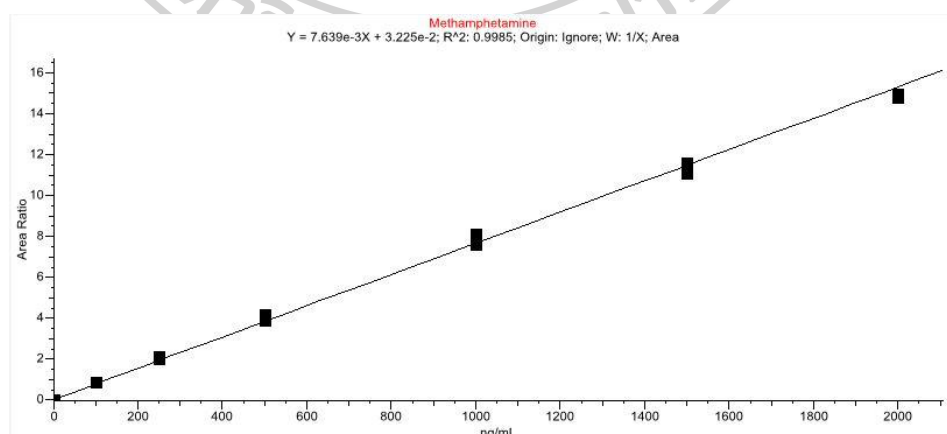
นำสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนจำนวน 14 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, และ 2000 ng/mL ใน blank urine โดยใช้ Trimipramine เป็น internal standard มาทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงด้วยเครื่อง Paper spray MS โดยการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับ Area ratio ที่วัดได้ พบว่าได้สมการของกราฟเส้นตรงคือ  $Y = 9.131e^{-4x} + 4.767e^{-3}$ ;  $R^2$  มีค่าเท่ากับ 0.9775 ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Methamphetamine ในปัสสาวะและ Area ratio เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Paper spray MS

#### 4.2.2.2 การสร้างกราฟมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนด้วยเครื่อง Online SPE-LC-MS/MS

นำสารละลายมาตรฐานเมทแอมเฟตามีนจำนวน 7 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 100, 250, 500, 1000, 1500 และ 2000 ng/mL ใน blank urine โดยใช้ Trimipramine เป็น internal standard มาทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงด้วยเครื่อง Online SPE-LC-MS/MS โดยการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับ Area ratio ได้สมการของกราฟเส้นตรงคือ  $Y = 7.639e^{-3}X + 3.225e^{-2}$  ค่า  $R^2$  มีค่าเท่ากับ 0.9985 ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน Methamphetamine ในปัสสาวะและ Area ratio เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Online-SPE-LC-MS/MS



## 4.2.2.3 ผลการหาปริมาณเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะ

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะที่สุ่มมาทดสอบ 25 ตัวอย่าง

ลำดับ	รหัส	ความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ (ng/mL)		ผลต่าง	ร้อยละ ผลต่าง
		Paper spray MS	Online-SPE-LC- MS/MS		
1	2744	Negative	Negative	-	-
2	2745	Negative	Negative	-	-
3	2746	3321.79	2998.33	-323.46	-10.79
4	2747	57109.01	18364.99	-38744.02	-210.97
5	2748	11747.15	6970.01	-4777.15	-68.54
6	2749	76385.87	21523.74	-54862.13	-254.89
7	2750	19800.55	12993.18	-6807.37	-52.39
8	2751	41054.59	16924.3	-24130.29	-142.58
9	2752	56596.16	22048.05	-34548.11	-156.69
10	2753	Negative	Negative	-	-
11	2789	Negative	Negative	-	-
12	2791	11677.74	6862.77	-4814.97	-70.16
13	2792	46077.05	16349.66	-29727.39	-181.82
14	2793	27231.82	16079.65	-11152.17	-69.35
15	2809	36608.78	14675.36	-21933.42	-149.46
16	2810	27541.84	12755.99	-14785.85	-115.91
17	2811	7961.18	5109.10	-2852.08	-55.82

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะที่สุ่มมาทดสอบ 25 ตัวอย่าง (ต่อ)

ลำดับ	รหัส	ความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ (ng/mL)		ผลต่าง	ร้อยละ ผลต่าง
		Paper spray MS	Online-SPE-LC- MS/MS		
18	2812	76677.21	31500.16	-45177.05	-143.42
19	2813	41321.52	13380.90	-27940.62	-208.81
20	2817	14006.99	8324.54	-5682.45	-68.26
21	2815	1512.69	3108.68	1595.99	51.34
22	2816	33483.85	17640.57	-15843.28	-89.81
23	2814	335.26	545.35	210.09	38.52
24	2820	5172.13	2820.65	-2351.48	-83.37
25	2822	45246.52	18500.63	-26745.89	-144.57
เฉลี่ย		30517.60	12832.22	-17685.39	-137.82

ตัวอย่างทั้งหมด 25 ตัวอย่าง ตรวจพบเมทแอมเฟตามีน 21 ตัวอย่าง จากตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่าง 21 ราย เท่ากับ 30,517.60 ng/mL และ 12,832.22 ng/mL เมื่อตรวจโดยวิธี Paper spray MS และวิธี Online-SPE-LC-MS/MS ตามลำดับ โดยมีผลต่างเฉลี่ยเท่ากับ -17,685.39 ng/mL

พบว่า การตรวจด้วยวิธี Paper spray MS ให้ค่าความเข้มข้นสูงกว่าวิธี Online-SPE-LC-MS/MS ร้อยละ 137.82 ตัวอย่างทั้ง 21 ตัวอย่างที่ตรวจพบด้วยวิธี Paper spray MS ตรวจพบพารามิเตอร์ครบทั้ง 3 พารามิเตอร์

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความแตกต่างของความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยสถิติ

Paired t-Test

วิธี	n	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความแตกต่างรายคู่		t	Sig
				ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
Paper spray-MS	21	30517.60	23571.09				
Online-SPE-LC-MS/MS	21	12832.22	7844.23	17685.39	16363.59	4.953	0.000

เมื่อทดสอบความแตกต่างของค่าความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะที่ตรวจพบโดยทั้งสองวิธี โดยใช้สถิติ Paired t Test (ตารางที่ 6) พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01

ตารางที่ 7 สรุปผลการตรวจเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะทั้งสองวิธี

		วิธีมาตรฐาน Online-SPE-LC-MS/MS	
		ตรวจพบ	ตรวจไม่พบ
วิธีที่นำมาทดสอบ	ตรวจพบ	21	0
	ตรวจไม่พบ	0	4

คำนวณค่า true positive rate

จากสูตร true positive rate = True Positive/True Positive + False Negative

เมื่อแทนค่าได้เท่ากับ 1 หมายความว่า การตรวจเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยวิธี Paper spray MS มี อัตราการตรวจได้ผลบวกที่แท้จริง ร้อยละ 100 ซึ่งแสดงถึง Sensitivity ของวิธีนี้ เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน gold standard (Online-SPE-LC-MS/MS)

คำนวณค่า true negative rate

จากสูตร true negative rate = True Negative/True Negative + False Negative

เมื่อแทนค่าได้เท่ากับ 1 หมายความว่า การตรวจเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะด้วยวิธี Paper spray MS มีอัตราการตรวจได้ผลลบที่แท้จริง ร้อยละ 100 ซึ่งแสดงถึง ความจำเพาะ (Specificity) ของวิธีนี้ เมื่อเทียบกับวิธี gold standard (Online-SPE-LC-MS/MS)

#### 4.2.3 ผลการหาปริมาณเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างชีววัตถุอื่น

##### 4.2.3.1 การหาปริมาณเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างน้ำดี

เมื่อนำตัวอย่างน้ำดีที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าพบเมทแอมเฟตามีนจำนวน 17 ตัวอย่าง ทดสอบซ้ำด้วยวิธี Paper spray-MS ได้ผลการศึกษาตามตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลตรวจเมทแอมเฟตามีนในน้ำดี

ลำดับ	ความเข้มข้น เมทแอมเฟตามีน ในน้ำดี (ng/mL)	Paper spray MS			จำนวน พารามิเตอร์ ที่พบ	ผล LC- MS/MS
		Chrono- gram	Fragment ions matching	Isotopic pattern comparison		
1	6708.17	P	P	P	3	ตรวจพบ
2	29.01	P		-	1	ตรวจพบ
3	756.18	P	P	P	3	ตรวจพบ
4	24.99	P	-	P	2	ตรวจพบ
5	184.19	P	-	P	2	ตรวจพบ
6	3.87	P	-	-	1	ตรวจพบ
7	1170.58	P	P	P	3	ตรวจพบ
8	807.94	P	P	P	3	ตรวจพบ
9	5326.70	P	P	P	3	ตรวจพบ

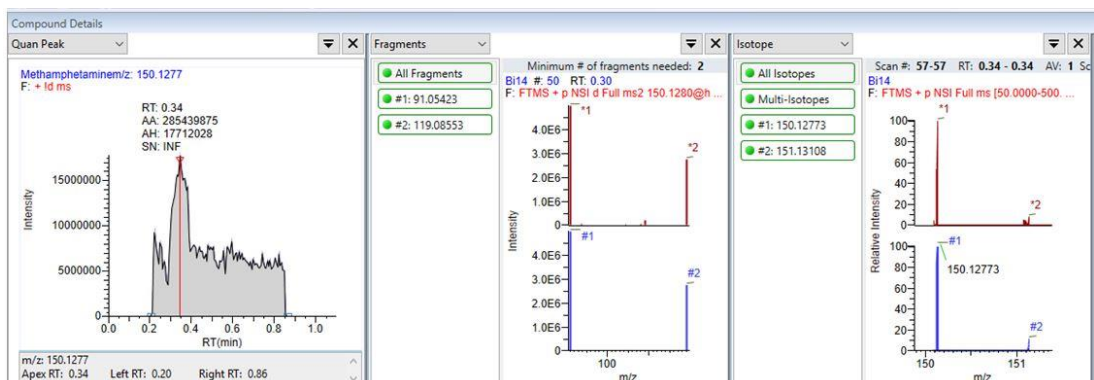
ตารางที่ 8 ผลตรวจเมทแอมเฟตามีนในน้ำดี (ต่อ)

ลำดับ	ความเข้มข้น เมทแอมเฟตามีน ในน้ำดี (ng/mL)	Paper spray MS				ผล LC- MS/MS
		Chrono- gram	Fragment ions matching	Isotopic pattern comparison	จำนวน พารามิเตอร์ ที่พบ	
10	1243.68	P	P	P	3	ตรวจพบ
11	3930.15	P	-	P	2	ตรวจพบ
12	2143.26	P	P	P	3	ตรวจพบ
13	N/A	P	-	-	1	ตรวจพบ
14	398.98	P	P	P	3	ตรวจพบ
15	247.41	P	-	P	2	ตรวจพบ
16	304.76	P	P	P	3	ตรวจพบ
17	1869.19	P	P	P	3	ตรวจพบ

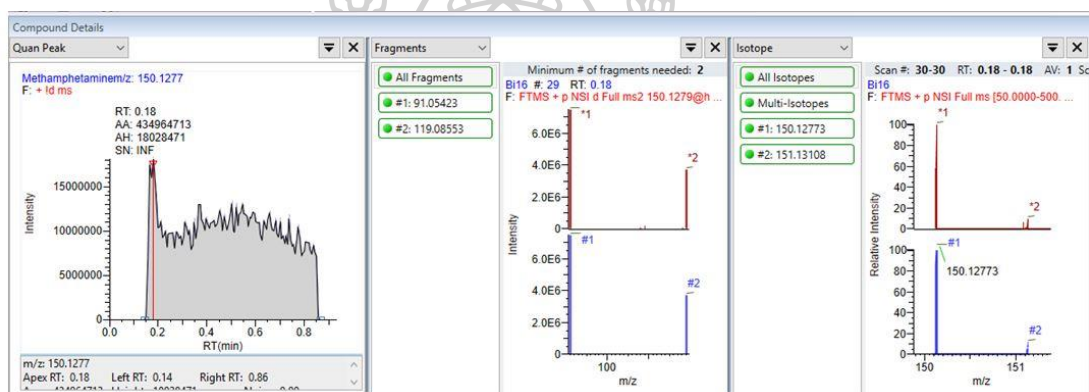
หมายเหตุ P หมายถึง ตรวจพบพารามิเตอร์ตามเกณฑ์ที่กำหนด, - หมายถึง ตรวจไม่พบพารามิเตอร์ตามเกณฑ์ที่กำหนด, N/A หมายถึง ไม่สามารถคำนวณผล

จากตารางที่ 8 ผลตรวจเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างน้ำดีจากศพซึ่งได้รับการตรวจยืนยันด้วยวิธี Liquid Chromatography-Mass Spectrometry ว่าตรวจพบเมทแอมเฟตามีน จำนวน 17 ตัวอย่าง พบข้อมูลใน 4 ลักษณะ คือ

1. ตัวอย่างน้ำดีที่ตรวจพบเมทแอมเฟตามีนด้วยวิธี Paper-spray MS ในช่วงความเข้มข้นสูงกว่า 500 ng/mL มี 8 ตัวอย่าง ความเข้มข้นตั้งแต่ 756.18 - 6708.17 ng/mL ซึ่งสูงกว่า LODc ที่ 500 ng/mL พบพารามิเตอร์ครบทั้ง 3 พารามิเตอร์
2. ตัวอย่างน้ำดีที่ตรวจพบเมทแอมเฟตามีนด้วยวิธี Paper-spray MS ในช่วงความเข้มข้นต่ำกว่า LODc ที่ 500 ng/mL แต่พบพารามิเตอร์ครบทั้ง 3 พารามิเตอร์ มี 2 ตัวอย่าง คือน้ำดีลำดับที่ 14 ความเข้มข้น 398.98 ng/mL (ภาพที่ 17) และน้ำดีลำดับที่ 16 ความเข้มข้น 304.76 ng/mL (ภาพที่ 18)

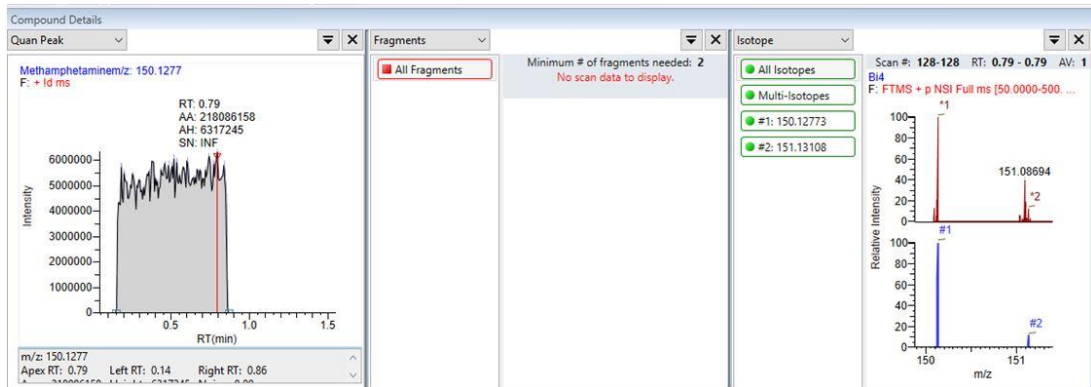


ภาพที่ 17 ตัวอย่างน้ำดีลำดับที่ 14 ความเข้มข้นต่ำกว่า LODc แต่ตรวจพบพารามิเตอร์ครบทั้ง 3 พารามิเตอร์

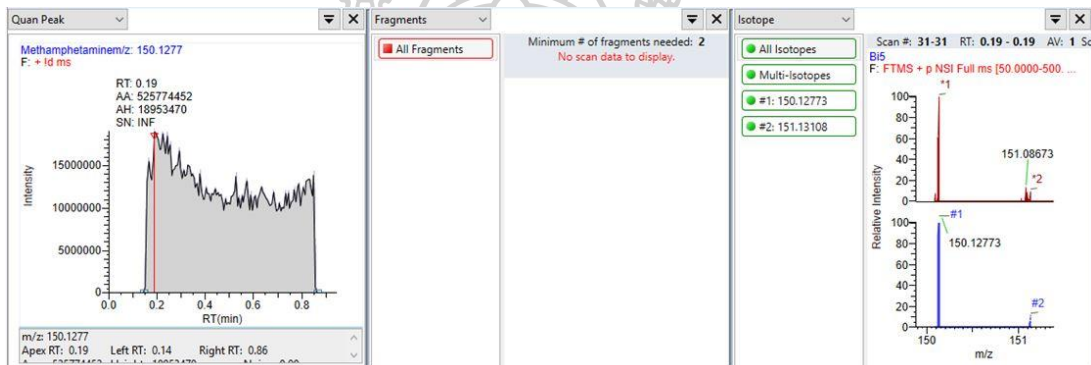


ภาพที่ 18 ตัวอย่างน้ำดีลำดับที่ 16 ความเข้มข้นต่ำกว่า LODc แต่ตรวจพบพารามิเตอร์ครบทั้ง 3 พารามิเตอร์

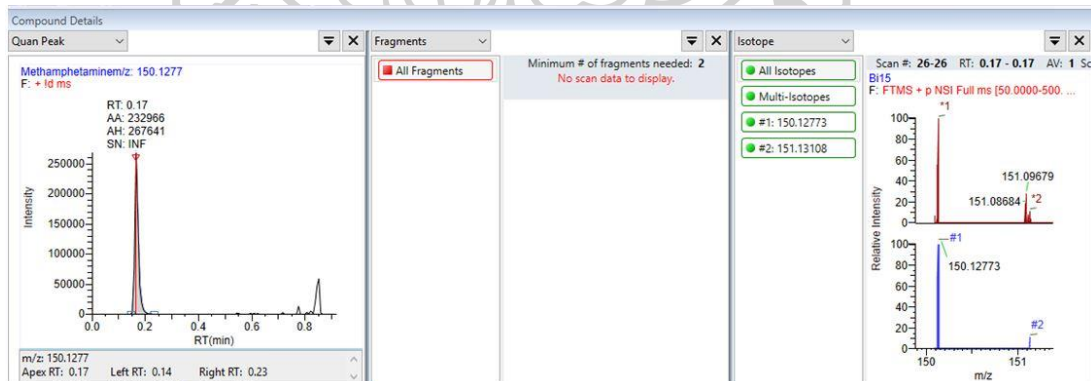
- ตัวอย่างน้ำดีที่ตรวจพบเมทแอมเฟตามีนด้วยวิธี Paper-spray MS ในช่วงความเข้มข้นต่ำกว่า 500 ng/mL แต่พบพารามิเตอร์ 2 พารามิเตอร์คือพบ Chronogram ร่วมกับพบ Isotopic pattern ที่ตรงกัน มี 3 ตัวอย่าง คือน้ำดีลำดับที่ 4 ความเข้มข้น 24.99 ng/mL (ภาพที่ 19) น้ำดีลำดับที่ 5 ความเข้มข้น 184.19 ng/mL (ภาพที่ 20) และน้ำดีลำดับที่ 15 ความเข้มข้น 247.41 ng/mL (ภาพที่ 21) ซึ่งกรณีนี้ถือว่ายังไม่สามารถยืนยันได้ชัดเจน เนื่องจากตรวจพบไม่ครบทั้ง 3 พารามิเตอร์



ภาพที่ 19 ตัวอย่างน้ำดีลำดับที่ 4 ความเข้มข้นต่ำกว่า LODc พบ Chromogram และ Isotopic pattern

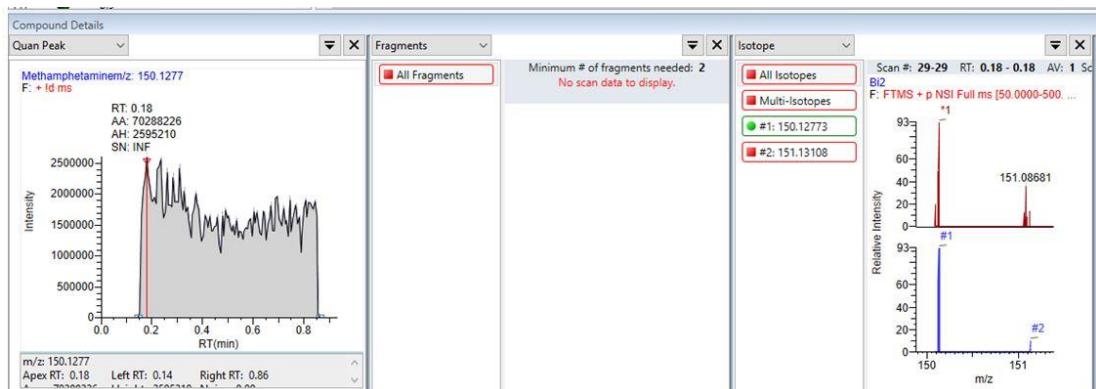


ภาพที่ 20 ตัวอย่างน้ำดีลำดับที่ 5 ความเข้มข้นต่ำกว่า LODc พบ Chromogram และ Isotopic pattern

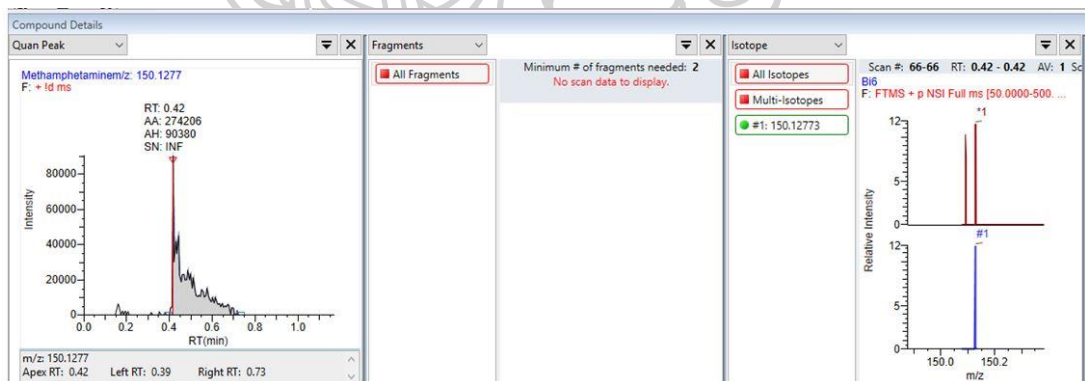


ภาพที่ 21 ตัวอย่างน้ำดีลำดับที่ 15 ความเข้มข้นต่ำกว่า LODc พบ Chromogram ขนาดเล็ก และ Isotopic pattern

4. ตัวอย่างน้ำดีที่ตรวจพบเมทแอมเฟตามีนด้วยวิธี Paper-spray MS ในช่วงความเข้มข้นต่ำ พบ Chromogram ขนาดเล็ก เพียงพารามิเตอร์เดียว มี 3 ตัวอย่าง คือ น้ำดีลำดับที่ 2 ความเข้มข้น 29.01 ng/mL (ภาพที่ 22) น้ำดีลำดับที่ 6 ความเข้มข้น 3.87 ng/mL (ภาพที่ 23) และน้ำดีลำดับที่ 13 ไม่สามารถคำนวณความเข้มข้นได้ (ภาพที่ 24) ซึ่งกรณีนี้ถือว่ายังไม่สามารถยืนยันได้ชัดเจน เนื่องจากตรวจพบไม่ครบทั้ง 3 พารามิเตอร์

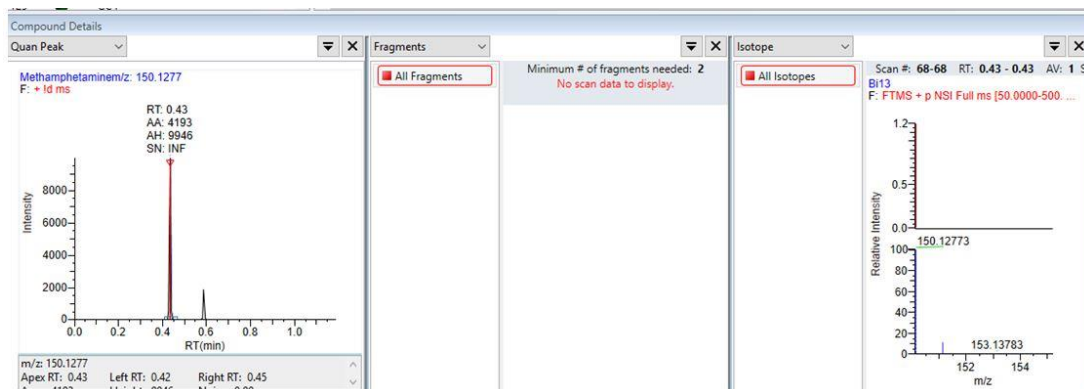


ภาพที่ 22 ตัวอย่างน้ำดีลำดับที่ 2 ความเข้มข้นต่ำกว่า LODc พบ Chromogram เพียงพารามิเตอร์เดียว



ภาพที่ 23 ตัวอย่างน้ำดีลำดับที่ 6 ความเข้มข้นต่ำกว่า LODc พบ Chromogram ขนาดเล็กเพียงพารามิเตอร์เดียว





ภาพที่ 24 ตัวอย่างน้ำดีลำดับที่ 13 ความเข้มข้นต่ำกว่าLODc พบ Chromogram ขนาดเล็กเพียงพารามิเตอร์เดียว

จากข้อมูลตารางที่ 8 สามารถสรุปเป็นตาราง 2X2 ได้ดังนี้ โดยกรณีที่ใช้วิธี Paper spray-MS ตรวจพบทั้ง 3 พารามิเตอร์ถือว่า “ตรวจพบ” ส่วนกรณีที่ตรวจพบไม่ครบทั้ง 3 พารามิเตอร์ ให้สรุปว่า “ตรวจไม่พบ” ได้ผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สรุปผลการตรวจเมทแอมเฟตามีนในน้ำดีทั้งสองวิธี

		วิธีมาตรฐาน Online-SPE-LC-MS/MS	
		ตรวจพบ	ตรวจไม่พบ
วิธีที่นำมาทดสอบ	ตรวจพบ	10	0
Paper spray-MS	ตรวจไม่พบ	7	0

คำนวณค่า true positive rate เท่ากับ 0.588 หมายความว่า การตรวจเมทแอมเฟตามีนในน้ำดีด้วยวิธี Paper spray MS มี อัตราการตรวจได้ผลบวกที่แท้จริง ร้อยละ 58.8

#### 4.2.3.2 การหาปริมาณเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างอาหารในกระเพาะ

เมื่อนำอาหารในกระเพาะที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าพบเมทแอมเฟตามีนจำนวน 17 ตัวอย่าง ทดสอบซ้ำด้วยวิธี Paper spray-MS ได้ผลการศึกษาตามตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลตรวจเมทแอมเฟตามีนในอาหารในกระเพาะ

ลำดับ	ความเข้มข้น เมทแอมเฟตามีน (ng/mL)	Paper spray-MS				ผล LC- MS/MS
		Chrono- gram	Fragment ions matching	Isotopic pattern comparison	จำนวน พารามิเตอร์ ที่พบ	
1	N/A	P	P	P	3	ตรวจพบ
2	N/A	P	-	P	2	ตรวจพบ
3	N/A	P	-	-	1	ตรวจพบ
4	56.77	P	-	P	2	ตรวจพบ
5	6816.85	P	P	P	3	ตรวจพบ
6	9.52	P	-	-	1	ตรวจพบ
7	N/A	P	-	P	1	ตรวจพบ
8	1109.69	P	P	P	3	ตรวจพบ
9	828.39	P	-	P	2	ตรวจพบ
10	3.34	P	-	-	1	ตรวจพบ
11	493.43	P	-	P	2	ตรวจพบ
12	6643.37	P	P	P	3	ตรวจพบ
13	15177.46	P	P	P	3	ตรวจพบ
14	23919.49	P	P	P	3	ตรวจพบ
15	3470.08	P	P	P	3	ตรวจพบ
16	147.17	P	P	P	3	ตรวจพบ
17	348.96	P	P	P	3	ตรวจพบ

หมายเหตุ P หมายถึง ตรวจพบพารามิเตอร์ตามเกณฑ์ที่กำหนด, - หมายถึง ตรวจไม่พบพารามิเตอร์ตามเกณฑ์ที่กำหนด, N/A หมายถึง ไม่สามารถคำนวณผล

จากข้อมูลตารางที่ 10 สามารถสรุปเป็นตาราง 2X2 ได้ดังนี้ โดยกรณีที่วิธี Paper spray-MS ตรวจพบทั้ง 3 พารามิเตอร์ถือว่า “ตรวจพบ” ส่วนกรณีที่ตรวจพบไม่ครบทั้ง 3 พารามิเตอร์ ให้สรุปว่า “ตรวจไม่พบ” ได้ผลดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 สรุปผลการตรวจเมทแอมเฟตามีนในอาหารในกระเพาะทั้งสองวิธี

		วิธีมาตรฐาน Online-SPE-LC-MS/MS	
		ตรวจพบ	ตรวจไม่พบ
วิธีที่นำมาทดสอบ	ตรวจพบ	9	0
	ตรวจไม่พบ	8	0

คำนวณค่า true positive rate จากสูตร  $\text{true positive rate} = \frac{\text{True Positive}}{\text{True Positive} + \text{False Negative}}$  เมื่อแทนค่าได้เท่ากับ 0.529 หมายความว่า การตรวจเมทแอมเฟตามีนในอาหารในกระเพาะด้วยวิธี Paper spray-MS มี อัตราการตรวจได้ผลบวกที่แท้จริง ร้อยละ 52.9 ซึ่งแสดงถึง Sensitivity ของวิธีนี้ เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน gold standard (Online-SPE-LC-MS/MS)

#### 4.3 ผลการประยุกต์ใช้ Paper spray-MS ในการตรวจวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท (คีตามีน)

##### 4.3.1 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดค่า (Limit of detection: LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ในระดับยืนยัน (Limit of detection confirmed: LODc) สำหรับคีตามีนในปัสสาวะ

วิเคราะห์ค่า LOD และ LODc ของคีตามีนโดยการเตรียมสารมาตรฐานคีตามีน 9 ความเข้มข้นดังนี้ 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 ng/mL ใน blank urine โดยใช้ Trimipramine เป็น internal standard และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Paper spray-MS ทำ 2 ซ้ำ ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงใน ตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงพารามิเตอร์ที่ตรวจพบในการวัด LOD และ LODc

ความเข้มข้น (ng/mL)	ครั้งที่	Ketamine				Trimipramine			
		Chromatogram	Fragment ions matching	Isotopic pattern comparison	Response area	Chromatogram	Fragment ions matching	Isotopic pattern comparison	Response area
1	1	-	-	-	272	P	P	P	881109
	2	-	-	-	23842	P	P	P	1676062 81
5	1	-	-	-	15545	P	P	P	1016982 9395
	2	-	-	-	26993	P	P	P	1332851 9695
10	1	-	-	-	39455	P	P	P	4458903 69
	2	-	-	-	27295	P	P	P	1334729 143
25	1	P	-	-	85880	P	P	P	1060725 6032
	2	P	-	-	62223	P	P	P	9369366 410
50	1	P	P	-	93856	P	P	P	7010949 896
	2	P	P	-	22421	P	P	P	2854286 642

ตารางที่ 12 แสดงพารามิเตอร์ที่ตรวจพบในการวัด LOD และ LODc (ต่อ)

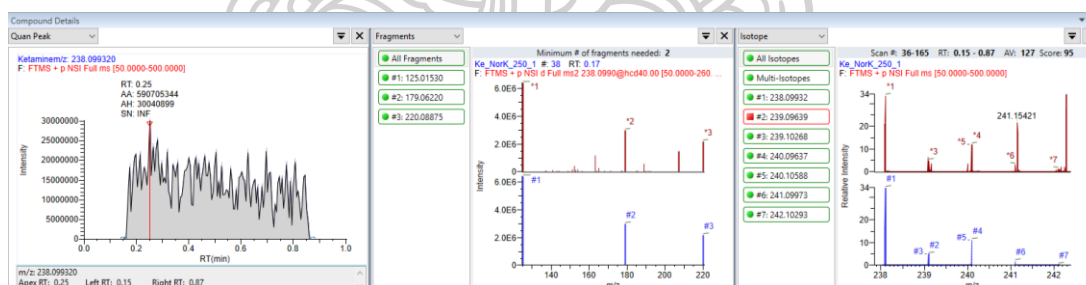
ความเข้มข้น (ng/mL)	ครั้งที่	Ketamine				Trimipramine			
		Chromatogram	Fragment ions matching	Isotopic pattern comparison	Response area	Chromatogram	Fragment ions matching	Isotopic pattern comparison	Response area
100	1	P	P	-	27471 0504	P	P	P	1144949 1054
	2	P	P	P	63015 1090	P	P	P	1523186 8087
250	1	P	P	P	59070 5344	P	P	P	4298858 24
	2	P	P	P	36064 9175	P	P	P	5914945 301
500	1	P	P	P	13354 90751	P	P	P	1022986 3398
	2	P	P	P	12601 49016	P	P	P	1027261 4221
1,000	1	P	P	P	30182 76572	P	P	P	1025620 4758
	2	P	P	P	16653 95882	P	P	P	4899406 332

หมายเหตุ P หมายถึง ตรวจพบพารามิเตอร์ตามเกณฑ์ที่กำหนด, - หมายถึง ตรวจไม่พบพารามิเตอร์ตามเกณฑ์ที่กำหนด,

จากตารางที่ 12 เมื่อแปลผลการวิเคราะห์ค่า LOD ของวิธีตรวจคีตาามีนในตัวอย่างปัสสาวะ ด้วยเครื่อง Paper spray-MS ตามวิธีของ McKenna *J et al*, 2018 ซึ่งระบุว่า ค่า LOD คือความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจพบพีก (Peak detection) หรือพบ Chronogram ที่มีค่า Mass error : NMT ในช่วง  $\pm 5$  ppm ดังนั้นจากผลการทดลองทำให้ทราบว่าค่า LOD ในการศึกษานี้เท่ากับ 25 ng/mL

เมื่อวิเคราะห์ค่า LODc ของวิธีตรวจคีตาามีนในตัวอย่างปัสสาวะด้วยเครื่อง Paper spray-MS ตามวิธีของ Kristine *et al*. โดยค่า LODc คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่พบพารามิเตอร์ 2 ใน 3 คือ ตรวจพบ Chronogram ร่วมกับการพบ Fragment ions matching ( $\geq 2$ ) หรือ Isotopic pattern Comparison (Matching score  $> 80\%$ ) ดังนั้นจากผลการทดลองทำให้ทราบว่าค่า LODc เท่ากับ 50 ng/mL

แต่สำหรับการแปลผลในการศึกษานี้ ผู้วิจัยยึดเกณฑ์ที่เข้มงวดคือ LODc คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่พบพารามิเตอร์ครบทั้งสามพารามิเตอร์ (ภาพที่ 25) ดังนั้นค่า LODc สำหรับการศึกษานี้จึงเท่ากับ 250 ng/mL ซึ่งแสดงว่าหากปัสสาวะมีคีตาามีนสูงกว่า 250 ng/mL การตรวจด้วยเครื่อง Paper spray-MS จะให้ผลในระดับยืนยันได้



ภาพที่ 25 แสดงตัวอย่าง Chronogram (ซ้าย), Fragment ions matching (กลาง) และ Isotopic pattern comparison (ขวา) ของคีตาามีน

#### 4.3.2 เปรียบเทียบปริมาณคีตามีนในปัสสาวะโดยวิธี Paper spray-MS และวิธี Online SPE-LC-MS/MS

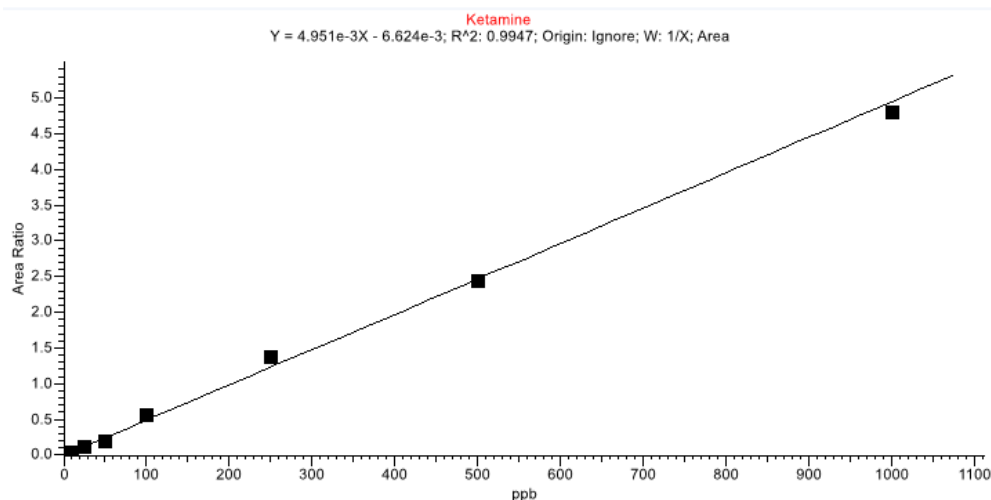
##### 4.3.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานคีตามีนด้วยเครื่อง Paper spray-MS

นำสารละลายมาตรฐานคีตามีนจำนวน 9 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 ng/mL ใน blank urine โดยใช้ Trimipramine เป็น internal standard มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Paper-Spray MS/MS ทำ 3 ซ้ำ ได้ผลดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงความเข้มข้นของสารมาตรฐานคีตามีนกับค่า Ratio of Response area

ความเข้มข้น (ng/mL)	Ratio of Response area		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1	4.34	3.15	3.00
5	14.18	10.34	9.06
10	29.78	22.42	19.87
25	50.97	49.02	45.66
50	99.67	97.23	86.93
100	187.78	179.42	173.65
250	451.89	439.86	415.54
500	840.70	823.78	788.92
1000	1473.16	1440.16	1380.17

จากนั้นนำผลมาทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงด้วยเครื่อง Paper spray-MS โดยการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับ Area ratio ที่วัดได้ พบว่าได้กราฟเส้นตรง สมการเส้นตรงคือ  $Y = 4.951e^{-3x} - 6.624e^{-3}$  ได้ค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9947

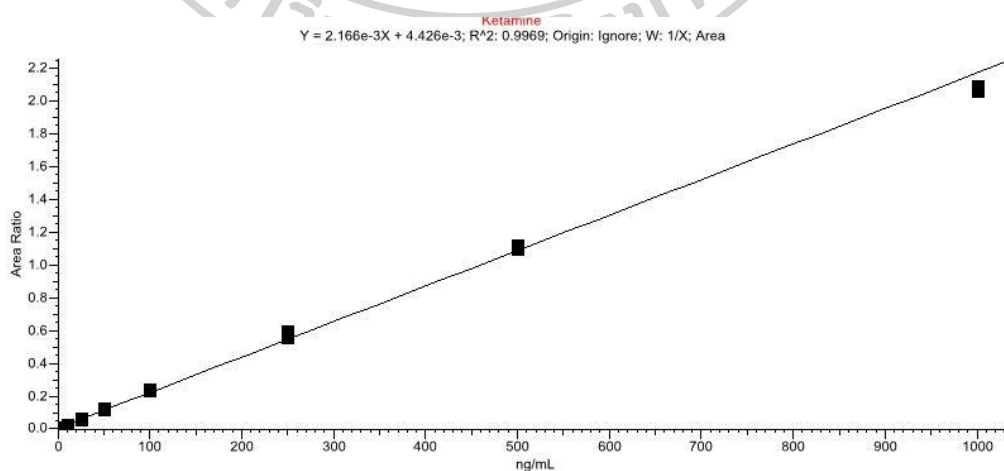


ภาพที่ 26 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคีตามีนในปัสสาวะและ Area ratio เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Paper spray-MS

#### 4.3.2.2 การสร้างกราฟมาตรฐานคีตามีนด้วยเครื่อง Online SPE-LC-MS/MS

นำสารละลายมาตรฐานคีตามีนจำนวน 9 ความเข้มข้น ได้แก่ 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 ng/mL ใน blank urine โดยใช้ Trimipramine เป็น internal standard มาทดสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงด้วยเครื่อง Online SPE-LC-MS/MS โดยการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับ Area ratio ที่วัดได้ พบว่าได้กราฟเส้นตรง สมการเส้นตรงคือ  $Y = 2.166e^{-3}X + 4.426e^{-3}$ ; R<sup>2</sup> เท่ากับ 0.9969 ภาพที่

27



ภาพที่ 27 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานคีตามีนในปัสสาวะและ Area ratio เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Online-SPE-LC-MS/MS



## 4.3.2.3 ผลการหาปริมาณคีตาบินในตัวอย่งปัสสาวะ

ตารางที่ 14 ความเข้มข้นคีตาบินในปัสสาวะที่สุ่มมาทดสอบ 20 ตัวอย่าง

ลำดับ	Paper spray-MS				ความเข้มข้น Online-SPE-LC-MS/MS (ng/mL)
	ความเข้มข้น (ng/mL)	Chronogram	Fragment ions matching	Isotopic pattern comparison	
1	513.51	P	P	P	479.94
2	6853.21	P	P	P	4092.86
3	1524.8	P	P	P	2580.56
4	110.82	P	P	P	206.96
5	174.38	P	P	P	354.91
6	182.47	P	P	P	250.99
7	472.78	P	P	P	844.17
8	110.38	P	P	P	845.13
9	692.52	P	P	P	939.18
10	3241.22	P	P	P	6001.51
11	169.69	P	P	P	322.54
12	118.72	P	P	P	1105.32
13	29.99	P	P	P	209.34
14	235.16	P	P	P	1088.52
15	2628.84	P	P	P	7755.95
16	24.73	P	P	P	261.73
17	44.84	P	P	P	46.43
18	34.57	P	P	P	59.66
19	167.94	P	P	P	2529.23
20	27.46	P	P	P	273.39
ค่าเฉลี่ย	867.90				1512.42

หมายเหตุ P หมายถึง ตรวจพบพารามิเตอร์ตามเกณฑ์ที่กำหนด

จากตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นคีตาามีนในตัวอย่าง 20 ราย เท่ากับ 867.90 ng/mL และ 1512.42 ng/mL เมื่อตรวจโดยวิธี Paper spray-MS และวิธี Online-SPE-LC-MS/MS ตามลำดับ โดยมีผลต่างเฉลี่ยเท่ากับ 646.01 ng/mL โดยค่าที่ตรวจด้วยวิธี Paper spray-MS ให้ค่าความเข้มข้นต่ำกว่าวิธี Online-SPE-LC-MS/MS ร้อยละ 51.54

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบความแตกต่างของความเข้มข้นคีตาามีนในปัสสาวะด้วยสถิติ Paired t-Test

วิธี	n	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความแตกต่างรายคู่		t	Sig
				ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน		
Paper spray-MS	20	867.90	1667.48				
Online-SPE-LC-MS/MS	20	1512.42	2070.11	-644.51	1496.82	-1.926	0.069

เมื่อทดสอบความแตกต่างของค่าความเข้มข้นคีตาามีนในปัสสาวะที่ตรวจพบโดยทั้งสองวิธี โดยใช้สถิติ Paired t Test (ตารางที่ 15) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01

#### 4.4 การเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างชีววัตถุด้วยวิธี Paper spray-MS และ Online-SPE-LC-MS/MS

ในการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก หากวิธีการวิเคราะห์นั้นๆ ใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างนานจะทำให้เกิดปัญหางานล้น (workload) ดังนั้นการปรับปรุงและพัฒนาวิธีวิเคราะห์จึงจำเป็นต้องเปรียบเทียบระยะเวลาวิเคราะห์ต่อตัวอย่าง ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างชีววัตถุด้วยวิธี Paper spray MS และ Online-SPE-LC-MS/MS

วิธี	ชนิดตัวอย่าง	สารที่วิเคราะห์	จำนวนตัวอย่าง	เวลาที่ใช้ต่อตัวอย่าง (นาที)	เวลาที่ใช้ทั้งหมด (นาที)	ร้อยละความถูกต้อง
Online-SPE-LC-MS/MS	ปัสสาวะ	เมทแอมเฟตามีน	25	30	750	100
Paper-Spray MS/MS	ปัสสาวะ	เมทแอมเฟตามีน	25	2	50	100
Online-SPE-LC-MS/MS	น้ำดี	เมทแอมเฟตามีน	17	30	510	100
Paper-Spray MS/MS	น้ำดี	เมทแอมเฟตามีน	17	2	34	58.8
Online-SPE-LC-MS/MS	อาหารในกระเพาะ	เมทแอมเฟตามีน	17	30	510	100
Paper-Spray MS/MS	อาหารในกระเพาะ	เมทแอมเฟตามีน	17	2	34	52.9
Online-SPE-LC-MS/MS	ปัสสาวะ	คีตามีน	20	30	600	100
Paper-Spray MS/MS	ปัสสาวะ	คีตามีน	20	2	40	100

จากตารางที่ 16 พบว่าการใช้วิธี Paper spray MS ในการวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนและคีตามีนจากปัสสาวะมีประสิทธิภาพในการลดเวลาการทำงานต่อรายลงได้ 15 เท่าเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Online-SPE-LC-MS/MS) ส่วนการวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างน้ำดีและอาหารในกระเพาะยังได้เพียงประมาณร้อยละ 53-59

## บทที่ 5

### สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

การวิจัยเรื่อง การพัฒนาและประยุกต์ใช้เฟเพอร์ สเปรย์ แมสสเปคโตรเมทรีในการตรวจเมทแอมเฟตามีน ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทจากชีววัตถุผู้เสียชีวิต ประกอบด้วยเนื้อหาย่อย 4 ส่วนดังต่อไปนี้

- 5.1 อภิปรายผลการศึกษา
- 5.2 สรุปผลการศึกษา
- 5.3 ข้อเสนอแนะการวิจัย
- 5.4 ข้อจำกัดในการวิจัยนี้

#### 5.1 อภิปรายผลการศึกษา

การหาสารละลายสำหรับฉีดพ่นเป็นละอองฝอยที่เหมาะสม หรือ Spray solvent optimization เป็นกระบวนการหนึ่งที่สำคัญในการวิเคราะห์ด้วย Paper spray-MS เนื่องจากเป็น Spray solvent ทำหน้าที่สร้างความชุ่มชื้นให้แก่กระดาษที่มีชีววัตถุห้อยอยู่ เมตริกซ์และสิ่งปนเปื้อนที่ผสมอยู่ในชีววัตถุจะจับกับผิวกระดาษ ส่วนสารที่สนใจส่วนหนึ่งจะถูก Spray solvent ชะออกจากชีววัตถุนั้นและถูกทำให้มีประจุขึ้นแล้วถูกดูดเข้าสู่ระบบตรวจวัด Mass Spectrometry ต่อไป ดังนั้นก่อนการวิเคราะห์ด้วย Paper spray-MS จึงจำเป็นต้อง Optimization เพื่อหาข้อยุติว่า สารละลายสูตรใดจึงจะเป็น Spray solvent ที่เหมาะสมสำหรับงานวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการนี้

Josiah Michael McKenna, 2017 ทำการศึกษาในหัวข้อ Spray solvent optimization โดยเปรียบเทียบการตรวจสารละลายยา 2 ชนิด คือ Phenobarbital และ Warfarin ที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 10 เท่า โดย spike ลงในเลือด ทำการทดสอบ 3 ชั่วโมง เปรียบเทียบสารละลาย 2 สูตร เขาสรุปว่า สูตร (90 : 10 : 0.01 methanol : CCl<sub>4</sub> : NH<sub>4</sub>OH) มีความเหมาะสมกว่าสูตร Conventional PS solvent (95 : 5 : 0.01 methanol : water : acetic acid) เมื่อเปรียบเทียบกันทางสถิติ แต่เนื่องจากสูตรของ Josiah Michael McKenna มีการใช้ CCl<sub>4</sub> ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีพิษต่อดับ (hepatotoxicity) และดวงตา [9] ดังนั้นหากยึดเรื่องความปลอดภัยด้านสารเคมีแล้วจึงเห็นควรพิจารณาทางเลือกอื่น โดยปรับสูตร Conventional PS solvent ให้เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการ ซึ่ง

สูตรที่ผู้วิจัยเลือกใช้ในการศึกษานี้คือ สูตร Acetonitrile : water : 10 M acetic acid อัตราส่วน 90 : 10 : 0.01 ซึ่งสูตรนี้มีเพิ่มสัดส่วนของ H<sub>2</sub>O มากขึ้น โดย Ikonomou *et al.*, 1991. [10] อธิบายว่า H<sub>2</sub>O ในสารละลายจะเพิ่มแรงดึงผิวของของผสมในการยึดจับกระตาศ ทำให้ต้องใช้แรงดันไฟฟ้าสูงขึ้น เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดอิเล็กโตรสเปรย์ที่เหมาะสม แต่เนื่องจากการใช้ Acetonitrile ซึ่งเป็น universal solvent ในการสกัดสารอินทรีย์ได้ดีกว่าเมทานอลและช่วยลดความเป็นขี้ของน้ำ ดังนั้นสัดส่วนของ H<sub>2</sub>O ที่เพิ่มขึ้นจึงไม่มีผลต่ออย่างเด่นชัดต่อการตรวจด้วยวิธี Paper spray-MS เห็นได้จากผลการเปรียบเทียบค่า response area ที่ได้จากสารละลายสูตรปรับปรุง มีค่ามากกว่าสูตร Conventional PS solvent อย่างเห็นได้ชัดแม้ว่าเมื่อเทียบ Ratio response area ของสารที่วิเคราะห์ต่อสารมาตรฐานภายในจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกความเข้มข้น (ดูตารางที่ 3)

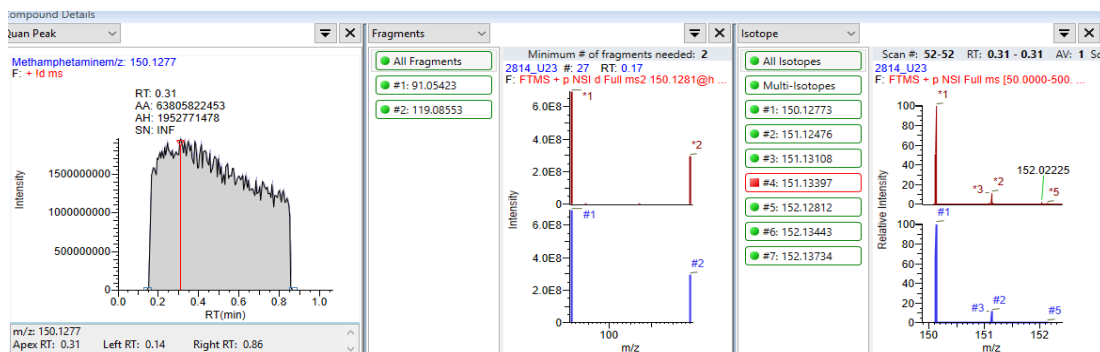
จุดแข็งของวิธี Paper spray-MS คือสามารถตรวจสอบสารได้หลายชนิดโดยไม่ต้องเตรียมตัวอย่างและเป็นการตรวจที่ไม่ผ่านกระบวนการแยกสารด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี จึงช่วยประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ ลดจากมากกว่า 1 ชั่วโมงเหลือเพียงไม่กี่นาที แต่เนื่องจากวิธีนี้เป็นการวัดปริมาณสารและวิเคราะห์เอกลักษณ์สารโดยตรงด้วยเทคนิคการ Mass Spectrometry ปราศจากกระบวนการแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีมาก่อน ดังนั้นหน่วยตรวจวัด (detector unit) จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูง ดังนั้นเครื่อง Paper-Spray จึงจำเป็นต้องต่อเชื่อมกับเครื่อง Mass Spectrometer ที่ ตั้งแต่ระดับ Triple Quadrupole Mass Spectrometer ไปจนถึง High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) จึงจะสามารถลดจุดด้อยจากการปราศจากโครมาโตกราฟีลง ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ Mass Spectrometer ในระดับ High Resolution (Orbitrap)

และเนื่องจากเทคนิคการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค Paper spray-MS เป็นนวัตกรรมใหม่ ซึ่งแตกต่างจากเทคนิคทางโครมาโตกราฟีที่คุ้นเคย เช่น Gas chromatography-Mass Spectrometry หรือ Liquid chromatography-Mass Spectrometry ดังนั้นจึงมีเกณฑ์ในการแปลผลวิเคราะห์ที่แตกต่างจากวิธีทางโครมาโตกราฟีทั่วไป การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดค่าสารได้ (Limit of detection: LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ในระดับยืนยัน (Limit of detection confirmed: LODc) เป็นคำจำกัดความเฉพาะเทคนิคทาง Mass Spectrometry ซึ่งสำหรับการศึกษานี้ใช้เมทแอมเฟตามีน (Methamphetamine) เป็นตัวแทนของกลุ่มสารเสพติด และใช้คีตามีน (Ketamine) เป็นตัวแทนของกลุ่มวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทในการศึกษา

ความสามารถในการประยุกต์ใช้เทคนิค Paper spray-MS ในการตรวจยืนยันชนิดสารในชีววัตถุของมนุษย์

เกณฑ์การพิจารณาว่าตรวจพบสารที่สนใจหรือไม่ พิจารณาจากพารามิเตอร์ 3 พารามิเตอร์ คือ 1. การตรวจพบ Chronogram 2. การตรวจพบ Fragment ions matching และ 3. การตรวจเปรียบเทียบลักษณะของ Isotopic pattern comparison ซึ่งผลการศึกษา LOD ของเมทแอมเฟตามีน (ตารางที่ 4) พิจารณาจากการพบพารามิเตอร์ที่ 1 (พบ Chronogram) เพียงชนิดเดียว พบว่า LOD ของเมทแอมเฟตามีนเท่ากับ 1 ng/mL ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำมาก แต่ยังเป็นระดับที่ยังไม่สามารถยืนยันได้ จนเมื่อปรับค่าความเข้มข้นขึ้นเรื่อยๆ จนถึงระดับ 250 ng/mL ตรวจพบพารามิเตอร์เพิ่มอีก 1 พารามิเตอร์ (Parameter 1 & 2 or Parameter 1 & 3) ซึ่ง McKenna *et al*, 2018 ผู้เชี่ยวชาญประจำบริษัท Thermo Fisher Scientific แนะนำว่าเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดได้ในระดับยืนยัน (Limit of detection confirmed: LODc) แต่สำหรับการศึกษานี้ต้องการยืนยันที่ระดับตรวจพบทั้ง 3 พารามิเตอร์ พบว่าค่า LODc เท่ากับ 500 ng/mL ซึ่งสามารถยืนยันชนิดสารเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะได้อย่างมั่นใจ

เมื่อทดสอบการวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนด้วยเทคนิค Paper spray-MS กับตัวอย่างปัสสาวะจริงจำนวน 25 ตัวอย่าง เทียบผลกับการตรวจด้วยวิธี Online-SPE-LC-MS/MS ซึ่งเป็นวิธี Gold Standard สำหรับการวัดปริมาณเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะ พบว่าตัวอย่างที่ตรวจพบเมทแอมเฟตามีนมีจำนวน 21 ตัวอย่าง โดย 20 ตัวอย่างตรวจพบเมทแอมเฟตามีนในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าค่า LODc เฉพาะตัวอย่างลำดับที่ 23 (ตารางที่ 5) ตรวจพบเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะความเข้มข้น 335.26 ng/mL ซึ่งต่ำกว่าค่า LODc แต่เมื่อพิจารณาข้อมูลดิบ (ภาพที่ 28) พบว่าตรวจพบพารามิเตอร์ครบทั้ง 3 พารามิเตอร์ ซึ่งช่วยยืนยันได้ว่าสารที่พบในปัสสาวะเป็นเมทแอมเฟตามีนจริง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าหากความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนต่ำกว่าค่า LODc ที่ 500 ng/mL แต่ตรวจพบพารามิเตอร์ครบทั้ง 3 พารามิเตอร์ผู้วิเคราะห์ก็สามารถมั่นใจได้ว่าการพิสูจน์เอกลักษณ์สารนั้นพบเป็นเมทแอมเฟตามีนจริง



ภาพที่ 28 แสดงรายงานผลการตรวจตัวอย่างหมายเลข 23 ด้วยวิธี Paper spray-MS พบพารามิเตอร์ทั้งสามครบถ้วนคือ พบ Chronogram (ซ้าย), Fragment ions matching (กลาง) และ Isotopic pattern comparison (ขวา)

การตรวจด้วยวิธี Paper spray-MS จะให้ค่าความเข้มข้นสูงกว่าวิธีตรวจมาตรฐาน Online-SPE-LC-MS/MS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉลี่ยร้อยละ 137.82 กรณีนี้อาจเป็นเพราะวิธี Paper spray-MS ไม่มีขั้นตอนการสกัดสารทำให้ได้ค่าเมทแอมเฟตามีนตามจริง แต่วิธี Online-SPE-LC-MS/MS มีขั้นตอนการสกัดสารซึ่งอาจทำให้สูญเสีย yield ของเมทแอมเฟตามีนทำให้ค่าที่พบต่ำกว่าวิธี Paper spray-MS

ค่า true positive rate เท่ากับ 100% แสดงถึง Sensitivity ของวิธีนี้ เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน ซึ่งกรณีนี้สามารถสรุปได้ว่าเทคนิค Paper spray-MS สามารถนำมาใช้ในการตรวจยืนยันสารเมทแอมเฟตามีนในปัสสาวะได้จริง

การตรวจเมทแอมเฟตามีนในชีววัตถุอื่นด้วยวิธี Paper spray-MS ผู้วิจัยเลือกชีววัตถุ 2 ชนิดที่น่าสนใจคือ น้ำดีและอาหารในกระเพาะ น้ำดีเป็นชีววัตถุที่สามารถตรวจพบเมทแอมเฟตามีนได้เนื่องจากกระบวนการขจัดสารในร่างกาย (excretion process) สารที่มีโครงสร้างโมเลกุลใหญ่และซับซ้อนได้น้อยทางปัสสาวะจะถูกขจัดออกทางน้ำดีแทน ซึ่งยาเสพติดหลายประเภทที่เป็นอัลคาลอยด์ซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญ่จะถูกขับออกทางน้ำดี รวมถึงบางส่วนของเมทแอมเฟตามีนในร่างกายสามารถขับออกทางน้ำดีได้เช่นกัน [11] ส่วนอาหารในกระเพาะสามารถตรวจพบเมทแอมเฟตามีนได้ในกรณีที่เสพโดยการรับประทานหรือกรณีกลืนยาเสพติดในลักษณะ Body packer [3] หรือ Body stuffer [4]

จากตารางที่ 8 พบตัวอย่างน้ำดี 10 ใน 17 ราย พบพารามิเตอร์ครบทั้ง 3 พารามิเตอร์ หรือคิดเป็นร้อยละ 58.8 ได้รับการตรวจแบบยืนยันว่าพบเมทแอมเฟตามีนจริง ถือเป็นค่า true positive rate สำหรับการตรวจด้วยวิธี Paper spray-MS สำหรับตัวอย่างที่เป็นน้ำดี

แต่หากลดเกณฑ์ลง โดยยึดตาม Kristine *et al.* โดยใช้พารามิเตอร์ 2 พารามิเตอร์คือตรวจพบ chromatogram ร่วมกับการพิจารณา Isotopic pattern comparison หรือ Fragment ions matching อย่างไม่อย่างหนึ่ง จะได้ตัวอย่างน้ำดีที่ตรวจพบ เมทแอมเฟตามีนตามเกณฑ์ใหม่นี้ 14 จาก 17 คน หรือคิดเป็นค่า true positive rate เท่ากับ 82.35%

สาเหตุที่ตัวอย่างชีววัตถุที่เป็นน้ำดีเมื่อตรวจด้วยวิธี Paper spray-MS แล้วได้ค่า true positive rate ต่ำกว่าการตรวจเมทแอมเฟตามีนจากปัสสาวะ ซึ่งได้ 100% นั้น น่าจะมีสาเหตุมาจากลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างน้ำดีที่มีเป็นไขมันสูง เคลือบติดกระดาดกรองบน cartridge แล้วสารละลาย Spray solvent จะเมทแอมเฟตามีนออกจากพื้นผิวได้ยากกว่าชีววัตถุที่เป็นปัสสาวะ แนวทางแก้ไขอาจต้องปรับเปลี่ยน Spray solvent ให้เหมาะสมกับชีววัตถุประเภทน้ำดี โดยอาจเพิ่มตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วในอัตราส่วนที่สูงกว่าสูตรที่ใช้ในการศึกษานี้

ตัวอย่างอาหารในกระเพาะศพที่ตรวจพบ เมทแอมเฟตามีน ด้วยวิธี Liquid Chromatography-Mass Spectrometry จำนวน 17 ราย เมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี Paper spray-MS พบว่าทุกรายตรวจพบพารามิเตอร์ Chromatogram ส่วนที่ตรวจพบครบทั้ง 3 พารามิเตอร์ มีจำนวน 9 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 52.9 ซึ่งได้ผลวิเคราะห์ยืนยันว่ามีสารเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างอาหารในกระเพาะจริง เป็นค่า true positive rate สำหรับการตรวจด้วยวิธี Paper spray-MS สำหรับตัวอย่างที่เป็นอาหารในกระเพาะ

และหากลดเกณฑ์ตาม McKenna J *et al.*, 2018 พบว่าค่า true positive rate สำหรับการตรวจด้วยวิธี Paper spray-MS สำหรับตัวอย่างที่เป็นอาหารในกระเพาะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 82.35

เมื่อพิจารณาจาก 4-9 จะเห็นว่าค่าเฉลี่ยความเข้มข้นเมทแอมเฟตามีนที่ในตัวอย่างอาหารในกระเพาะ (4,540.35 ng/mL) สูงกว่าค่าเฉลี่ยที่พบในตัวอย่างน้ำดี (1571.82 ng/mL) ทั้งนี้เนื่องจากการเสพเมทแอมเฟตามีนโดยวิธีรับประทานนั้น เมทแอมเฟตามีนที่ปนอยู่ในอาหารในกระเพาะจะมีปริมาณเป็นมิลลิกรัมซึ่งมากกว่าปริมาณเมทแอมเฟตามีนที่ถูกดูดซึมในร่างกายแล้วขับออกมาทางน้ำดี ซึ่งระดับความเข้มข้นที่พบจะเป็นระดับไมโครกรัมหรือนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



การใช้ Paper spray-MS ในงานตรวจยืนยันคีตาามีนในปัสสาวะพบว่าค่า LOD เท่ากับ 25 ng/mL ส่วนค่า LODc ตามวิธีของ McKenna *J et al*, 2018 เท่ากับ 50 ng/mL ส่วน LODc ที่ตรวจพบทั้งสามพารามิเตอร์ในการทดลองนี้เท่ากับ 250 ng/mL จากตารางที่ 4-13 เมื่อนำตัวอย่างปัสสาวะที่ตรวจพบคีตาามีน 20 ตัวอย่างมาตรวจยืนยันด้วยเครื่อง Paper spray-MS พบว่าทุกรายตรวจพบคีตาามีนเช่นเดียวกับวิธี Online-SPE-LC-MS/MS โดยพบพารามิเตอร์ทั้งสามครบถ้วนชัดเจน แม้ว่าตัวอย่าง 13 ใน 20 หรือร้อยละ 65 จะมีค่าความเข้มข้นของคีตาามีนต่ำกว่าค่า LODc ที่ 250 ng/mL ก็ตาม แสดงให้เห็นว่าการตรวจคีตาามีนในปัสสาวะด้วยวิธี Paper spray-MS สามารถตรวจยืนยันได้ชัดเจนเมื่อดูจากพารามิเตอร์ที่พบ ซึ่งพบว่าค่าความเข้มข้นคีตาามีนที่ตรวจด้วยวิธี Paper spray-MS ให้ค่าต่ำกว่าวิธี Online-SPE-LC-MS/MS ร้อยละ 51.54

## 5.2 สรุปผลการศึกษา

โดยสรุปแล้วสามารถนำเครื่อง Paper spray-MS มาใช้ในงานตรวจเบื้องต้นและตรวจยืนยันผลสารเสพติดเมทแอมเฟตามีนและวัตถุออกฤทธิ์คีตาามีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งในแต่ละครั้งที่ run งานสามารถตรวจสอบได้พร้อมกันกว่า 100 ชนิด จึงทำให้สามารถนำมาใช้ทดแทนเครื่องตรวจประเภท Immunoassay ซึ่งเป็นเครื่องตรวจเบื้องต้นแต่มีค่าใช้จ่ายในการตรวจ ต่อชนิด:ต่อครั้งสูง ซึ่งหากออกแบบให้แต่ละ run ของ Paper spray-MS สามารถตรวจสอบในแบบเดียวกับที่ Immunoassay ตรวจได้จำนวนหลาย ๆ ชนิดสาร ก็จะทำให้ลดต้นทุนการตรวจแบบ Paper spray-MS ลง แต่ได้งานในระดับคุณภาพและกึ่งปริมาณวิเคราะห์ที่ดี สามารถนำผลไปใช้ออกรายงานในระดับ Confirmed ได้ รวมถึงเทคนิค Paper spray-MS สามารถลด Workload จากงานหนักเนื่องจากเครื่องมือวิเคราะห์ระบบเดิม (แบบมาตรฐานใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน ทำให้ปริมาณงานต่อวันต่ำ) โดยพบว่า Paper spray-MS เหมาะกับงานตรวจยืนยันยาเสพติดชนิดเมทแอมเฟตามีนและคีตาามีนในปัสสาวะ ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ สามารถวิเคราะห์เสร็จได้เร็วกว่าวิธีมาตรฐาน Online-SPE-LC-MS/MS 15 เท่า ทำให้สามารถลดปัญหา workload ได้

### 5.3 ข้อเสนอแนะ

สำหรับการวิจัยเรื่อง การพัฒนาและประยุกต์ใช้เพเพอร์ สเปรย์ แมสสเปคโตรเมทรีในการตรวจเมทแอมเฟตามีน ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทจากชีววัตถุผู้เสียชีวิต เมื่อสิ้นสุดการวิจัยแล้ว สามารถประมวลข้อเสนอแนะได้เป็น 3 หัวข้อคือ

#### 5.3.1 ข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย

5.3.1.1. เนื่องจากการศึกษาวิจัยเชิงทดลองมีต้นทุนค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือวิทยาศาสตร์สูง เช่น ค่าวัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่เป็นวัสดุสิ้นเปลือง ค่าน้ำยาเคมี ค่าใช้จ่ายในการปรับแต่งเครื่อง (Calibration and tuning) ค่าซ่อมเครื่องมือ ค่าบำรุงรักษา บางเครื่องมือมีค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษาสูง ดังนั้นการทำวิจัยทั้งผู้วิจัยและผู้อนุมัติการวิจัยจึงต้องประเมินความคุ้มค่าในการศึกษาด้วยทุกครั้ง

5.3.1.2 ผู้วิจัยหรือผู้มีอำนาจในการสั่งทำวิจัยอาจกำหนดงานวิจัยนั้นๆ อยู่ในแผนยุทธศาสตร์การพัฒนายานหน่วยงานเพื่อให้มีงบประมาณและค่าตอบแทนหรือแหล่งทุนที่ถูกต้องเหมาะสมในการศึกษา ซึ่งจะทำให้การศึกษานั้นๆ มีคุณภาพและปราศจากผลประโยชน์ทับซ้อน หรือความขัดแย้งกันระหว่างผลประโยชน์ส่วนตนและผลประโยชน์ส่วนรวม (Conflict of Interest: COI) เป็นประเด็นปัญหาในการบริหารการวิจัยให้มีคุณภาพ และในปัจจุบันยังเป็นบ่อเกิดของปัญหาการทุจริตประพฤติมิชอบในระดับที่รุนแรงขึ้น และยังสะท้อนปัญหาการขาดหลักธรรมาภิบาลขององค์กรและเป็นอุปสรรคต่อการพัฒนางานวิจัยในอนาคต กรณีที่การวิจัยนั้นๆ ไม่มีงบวิจัยและต้องขอทุนวิจัยจากแหล่งทุนเอกชนหรือองค์กร ควรเลือกขอทุนจากองค์กรที่ไม่มี Conflict of Interest และควรระมัดระวังปัญหาการขาดความอิสระ หรือปัญหาการก้าวกายหรือชี้ทิศทางการวิจัย ซึ่งจะทำให้งานวิจัยนั้นด้อยค่าและน่าเชื่อถือน้อยลง

5.3.1.3 หน่วยงานหรือผู้วิจัยอาจทำการวิจัยเชิงบูรณาการร่วมกับหน่วยงานอื่นที่มีเข็มมุ่งในทิศทางเดียวกันหรือหวังผลสัมฤทธิ์จากงานวิจัยร่วมกัน จะช่วยให้งานวิจัยมีขอบเขตงานกว้างขึ้น มีการตีความผลการศึกษาหลากหลายมุมมองมากขึ้น และมีหน่วยงานที่ได้รับประโยชน์จากการศึกษามากขึ้น ซึ่งนโยบายการวิจัยเชิงบูรณาการลักษณะนี้มีโอกาสได้รับการสนับสนุนจากภาครัฐสูง และส่งผลกระทบได้กว้างและมีน้ำหนักมากกว่าการวิจัยเดี่ยว

### 5.3.2 ข้อเสนอแนะเชิงปฏิบัติ

5.3.2.1 เนื่องจากการวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองซึ่งต้องใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีใหม่ คือ Paper spray-MS ซึ่งมีการศึกษาน้อยมาก และมีการนำไปใช้เฉพาะทาง ผู้ปฏิบัติงานวิจัยควรศึกษารอบด้านและทำการวิจัยในบริบทที่สังคมผู้วิจัยรับผิดชอบ เช่น หากผู้วิจัยทำงานในส่วนของยาเสพติด งานวิจัยที่ควรทำควรเป็นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับงานที่ทำ ซึ่งจะช่วยให้ประหยัดทุนเพราะเป็นงานวิจัยในขอบเขตงาน ซึ่งสามารถปรับแต่งให้อยู่ในรูปการวิจัยแบบ R2R (Routine to Research) ซึ่งเป็นงานวิจัยที่ได้ประโยชน์สองทางคือผู้วิจัยได้ประโยชน์คือผลงานวิจัยและองค์กรได้ประโยชน์คือได้องค์ความรู้ใหม่ แนวปฏิบัติใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ในทางกลับกันงานวิจัยแบบ R2R ใช้เวลาในการวิจัยน้อย สามารถทำวิจัยร่วมไปกับการทำงานได้ งานสำเร็จได้เร็ว ผู้วิจัยสามารถมองทิศทางงานวิจัยและตีความผลการวิจัยได้อย่างทะลุปรุโปร่ง เนื่องจากมีความถนัดและมีองค์ความรู้เฉพาะตนสูง สามารถตั้งต้นเป็นองค์กรนำในเรื่องงานวิจัยนั้นๆ และสามารถเป็นผู้ถ่ายทอดผลการวิจัยได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นประโยชน์เชิงรูปธรรมที่ผู้วิจัยมุ่งหวัง

5.3.2.2 กรณีที่หน่วยงานที่รับผิดชอบตรวจยาเสพติดชนิดเมทแอมเฟตามีนและคีตامينในปัสสาวะ ซึ่งมีปริมาณงานเป็นจำนวนมากและใช้วิธีการตรวจยืนยันแบบมาตรฐานด้วย LC-MS/MS หากต้องการลดเวลาในการทำงานลง 15 เท่าและได้ผลตรวจยืนยันที่เชื่อมั่นได้เทียบเท่ากับวิธีเดิม ควรนำเครื่อง Paper spray-MS มาใช้ตรวจแทนซึ่งจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานขึ้น

### 5.3.3 ข้อเสนอแนะในครั้งต่อไป

5.3.3.1 ผู้วิจัยขอเสนอแนะให้ทำการศึกษาการตรวจยาเสพติดหรือวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทในชีววัตถุอื่นๆ เช่น เลือด น้ำลาย เหงื่อ เป็นต้น ด้วยเทคนิค Paper spray-MS ซึ่งมีข้อได้เปรียบในเรื่องความรวดเร็วในการตรวจเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Online SPE LC-MS/MS) เพื่อเป็นแนวทางในการนำชีววัตถุอื่นๆ ที่ยังไม่มีการศึกษามาใช้ในงานด้านนิติเวชวิทยาและนิติวิทยาศาสตร์ต่อไป

5.3.3.2 ในการทำวิจัยครั้งต่อไป การทำวิจัยการตรวจสอบสารกลุ่ม New Psychoactive Substances; NPS ซึ่งกำลังเป็นที่สนใจในแวดวงนิติวิทยาศาสตร์สากลในขณะนี้ เนื่องจากมีแนวโน้มการนำมาใช้ในทางที่ผิดสูงและยังมีการนำเทคนิค Paper spray-MS มาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบสารดังกล่าวนี้กันน้อยมาก ดังนั้นหากมีการทำวิจัยการตรวจสอบสารกลุ่มนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในอนาคต

#### 5.4 ข้อจำกัดในการวิจัยนี้

ข้อจำกัดสำคัญในการวิจัยนี้ แบ่งออกได้เป็น 3 ข้อ ดังนี้

5.4.1 ข้อจำกัดเรื่องจำนวนตัวอย่างชีวิตที่นำมาศึกษามีน้อยและหายาก ทำให้ต้องใช้เวลาในการเก็บตัวอย่างนาน และบางตัวอย่างแม้เก็บได้แต่ก็อยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสม ทำให้ไม่สามารถนำมาศึกษาวิจัยได้ ดังนั้นหากมีการศึกษาวิจัยโดยใช้ชีวิตลักษณะนี้ในอนาคต ควรเพิ่มระยะเวลาการรวบรวมตัวอย่างให้นานเพียงพอที่จะรวบรวมตัวอย่างได้ครบตามขอบเขตการวิจัยที่กำหนด

5.4.2 ข้อจำกัดในเรื่องสารมาตรฐานที่นำมาใช้ศึกษา เนื่องจากสารเคมีสำคัญในงานวิจัยนี้คือ เมทแอมเฟตามีนและคีตามีนเป็นยาเสพติดให้โทษฯ และวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทฯ ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษฯ และพระราชบัญญัติวัตถุที่ออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาทฯ ตามลำดับการนำเข้าสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิของเมทแอมเฟตามีนและคีตามีนเพื่อมีไว้ครอบครองและนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยทำได้ไม่สะดวก ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงใช้สารมาตรฐานทุติยภูมิที่ได้จากการเตรียมขึ้นโดยมีคุณภาพใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิซึ่งได้รับการสนับสนุนจากกรมวิทยาศาสตร์บริการมาใช้ ดังนั้นการเตรียมช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ทำมาศึกษาจึงเตรียมได้ในช่วงไม่กว้างนักเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานระดับปฐมภูมิ ดังนั้นหากมีการเตรียมการวิจัยล่วงหน้าในครั้งต่อไป ผู้วิจัยควรทำเรื่องจัดหาสารเคมีระดับปฐมภูมิล่วงหน้าไว้ก่อนเพื่อให้งานวิจัยสามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5.4.3 ข้อจำกัดในเรื่องทุนการวิจัย การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองซึ่งมีต้นทุนการศึกษาสูง โดยเฉพาะเป็นการศึกษาเปรียบเทียบสองวิธีก็จะมีต้นทุนเพิ่มขึ้นสองเท่า และหากการทดลองใดกำหนดให้ทำการทดลองจำนวนหลายซ้ำหรือใช้จำนวนตัวอย่างศึกษาจำนวนมาก ก็จะเป็นการเพิ่มต้นทุนในการวิจัยให้สูงขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการศึกษาในจำนวนตัวอย่างที่จำกัดและสอดคล้องกับงบประมาณที่มีอยู่ หากมีการศึกษาทำนองนี้ในอนาคตผู้วิจัยต้องหาแหล่งทุนเพื่อสนับสนุนการวิจัยให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

## รายการอ้างอิง

1. Mogollon, N.G.S., et al., *New advances in toxicological forensic analysis using mass spectrometry techniques*. Journal of analytical methods in chemistry, 2018. **2018**.
2. Espy, R.D., et al., *Spray mechanism in paper spray ionization*. International journal of mass spectrometry, 2012. **325**: p. 167-171.
3. Uekusa, K., et al., *Methamphetamine and amphetamine concentrations in survivors of body-packer syndrome in Japan*. Forensic science international, 2013. **227**(1-3): p. 45-47.
4. Bahrami-Motlagh, H., et al., *Correlation of abdominopelvic computed tomography with clinical manifestations in methamphetamine body stuffers*. La radiologia medica, 2018. **123**(2): p. 98-104.
5. พญ.ปรีญาพรรณ เพชรปราน, *Methamphetamine*. วารสารนิติเวชศาสตร์ ปีที่ 4 2554(1).
6. Bokor, G. and P.D. Anderson, *Ketamine: an update on its abuse*. Journal of pharmacy practice, 2014. **27**(6): p. 582-586.
7. Liu, Y., et al., *Ketamine abuse potential and use disorder*. Brain research bulletin, 2016. **126**: p. 68-73.
8. Hartvig, P., et al., *Central nervous system effects of subdissociative doses of (S)-ketamine are related to plasma and brain concentrations measured with positron emission tomography in healthy volunteers*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 1995. **58**(2): p. 165-173.
9. Recknagel, R.O., et al., *Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity*. Pharmacology & therapeutics, 1989. **43**(1): p. 139-154.
10. Ikononou, M.G., A.T. Blades, and P. Kebarle, *Electrospray mass spectrometry of methanol and water solutions suppression of electric discharge with SF 6 gas*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1991. **2**(6): p. 497-505.
11. Dinis-Oliveira, R.J., D.N. Vieira, and T. Magalhães, *Guidelines for collection of biological samples for clinical and forensic toxicological analysis*. Forensic sciences research, 2016. **1**(1): p. 42-51.

12. Liu, J., et al., *Development, characterization, and application of paper spray ionization*. Analytical chemistry, 2010. **82**(6): p. 2463-2471.
13. Manicke, N.E. and M. Belford, *Separation of opiate isomers using electrospray ionization and paper spray coupled to high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2015. **26**(5): p. 701-705.
14. Zhang, Y., et al., *Paper spray ionization of noncovalent protein complexes*. Analytical chemistry, 2014. **86**(3): p. 1342-1346.
15. Yang, Q., et al., *Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry*. International journal of mass spectrometry, 2012. **312**: p. 201-207.
16. Li, A., et al., *Paper spray ionization of polar analytes using non-polar solvents*. Chemical communications, 2011. **47**(10): p. 2811-2813.
17. Wang, J.-S., et al., *The Use of a Beveled Porous-Polypropylene Hollow Fiber for Liquid-Liquid Microextraction in Paper Spray-Mass Spectrometry*. J Chromatogr Sep Tech, 2015. **6**(311): p. 2.
18. Zhang, C. and N.E. Manicke, *Development of a paper spray mass spectrometry cartridge with integrated solid phase extraction for bioanalysis*. Analytical chemistry, 2015. **87**(12): p. 6212-6219.
19. Kronstrand, R., et al., *Unintentional fatal intoxications with mitragynine and O-desmethyltramadol from the herbal blend Krypton*. Journal of analytical toxicology, 2011. **35**(4): p. 242-247.



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พันตำรวจโทวิชวิชัย ตั้งธนานุวัฒน์
วัน เดือน ปี เกิด	31 ตุลาคม 2514
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	เกสัชศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รัฐศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมราชา เกสัชศาสตร์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 75/32 หมู่บ้านมิตรภาพ ปากเกร็ด นนทบุรี 11120

