

การวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะ ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีที่มี เฟลมไอออไนเซชันเป็นตัวตรวจวัด โดยใช้วิธีการเตรียมอนุพันธ์ร่วมกับโซลิดเฟสเอ็กซ์ แทรกชัน และวิธีเฮดสเปซ

Determination of methamphetamine in urine samples by gas chromatography–flame ionization detector (GC-FID) techniques using the derivatization coupled with solid phase extraction and the headspace method

ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง (Sirirat Choosakoonkriang)^{*}

วิบูลวรรณ สร้อยเพชร (Wiboonwan soipetch)^{**}

ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี (Supachai Supaluknari)^{***}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการเปรียบเทียบปริมาณเมทแอมเฟตามีนที่ได้จากวิธีการเตรียมตัวอย่างสองวิธี ได้แก่ การเตรียมอนุพันธ์ (derivatization) ด้วย trifluoroacetic acid (TFA) ร่วมกับโซลิดเฟสเอ็กซ์แทรกชัน (SPE) และวิธีเฮดสเปซ (HS) ในการวิเคราะห์เมทแอมเฟตามีน (MA) ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้เสพสารเสพติด และใช้ diphenylamine (DPA) เป็น internal standard (IS) แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค แก๊สโครมาโทกราฟี ที่มีเฟลมไอออไนเซชันเป็นตัวตรวจวัด (GC-FID) ในการวิเคราะห์ MA วิธีการเตรียมตัวอย่างทั้งสองวิธีให้ความเป็นเส้นตรงที่ดี (r^2 เท่ากับ 0.9952 และ 0.9972) ในช่วงความเข้มข้น 1000-10000 ng/mL วิธีการเตรียมอนุพันธ์มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (LOD) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 116 และ 161 ng/mL ตามลำดับ ในขณะที่การวิเคราะห์ MA ด้วยวิธีเฮดสเปซ (HS) ให้ผลค่า LOD เท่ากับ 45 ng/mL และค่า LOQ เท่ากับ 58 ng/mL ซึ่งเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณตัวอย่างปัสสาวะของผู้เสพสารเสพติด เมื่อนำสองวิธีข้างต้นไปใช้ในการวิเคราะห์หา MA ในตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 10 ตัวอย่าง ที่ได้จากสถาบันนิติเวช โรงพยาบาลตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ พบว่าปริมาณ MA ในตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-FID ที่ใช้วิธีการเตรียมตัวอย่าง 2 วิธีข้างต้นไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังการทดสอบทาง

^{*} อาจารย์ ดร. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม

Lecturer, Dr., Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Mueang, Nakhon Pathom, 73000, Thailand., sirirat_157@yahoo.com

^{**} นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม

Graduate Student, Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Mueang, Nakhon Pathom, 73000, Thailand., w.soipetch@gmail.com, 0982566903

^{***} อาจารย์ ดร. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม

Lecturer, Dr., Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Mueang, Nakhon Pathom, 73000, Thailand., supsupalak@gmail.com

สถิติด้วย paired t-test [t_{stat} (1.39) < t_{critical} (2.26) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05] งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าวิธีการเตรียมอนุพันธ์ร่วมกับโซลิดเฟสเอ็กซ์แทรกชันและวิธีเฮดสเปสเป็นวิธีที่ให้ผลเป็นที่น่าพอใจเมื่อใช้กับการวิเคราะห์หาปริมาณ MA ในตัวอย่างปัสสาวะด้วยเทคนิค GC-FID

คำสำคัญ : เมทแอมเฟตามีน/ ปัสสาวะ/ แก๊สโครมาโทกราฟี/ โซลิดเฟสเอ็กซ์แทรกชัน/ เฮดสเปส

Abstract

Two methods of sample pretreatment namely, the derivatization by trifluoroacetic acid (TFA) coupled with Solid Phase Extraction (SPE) and the Headspace (HS) method have been compared for the analysis of methamphetamine (MA) in urine samples by Gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) technique. Diphenylamine was used as internal standard (IS). The two methods showed good linearity ($r^2 = 0.9952$ and 0.9972) in the range 1000-10000 ng/mL for MA. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) in the derivatization method were 116 and 161 ng/mL respectively while the MA analysis in the HS method resulted in the LOD of 45 ng/mL and the LOQ 58 ng/mL. The methods were applied to determine MA in ten urine samples provided by the Institute of Forensic Medicine, Police General Hospital, Royal Thai Police. The MA contents in the samples determined by the GC-FID technique using the two pretreatment methods were not significantly different as suggested by the statistical testing of paired t-test [t_{stat} (1.39) < t_{critical} (2.26) at a significance level of 0.05]. This study demonstrated that the derivatization coupled with solid phase extraction and the headspace method provided satisfactory results when the methods were used in GC-FID analysis of MA in urine samples.

Keywords: methamphetamine/ urine/ gas chromatography/ solid phase extraction/ headspace

บทนำ

ปัญหาเสพติดในปัจจุบันเป็นปัญหาสังคมที่มีความรุนแรงมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ลักษณะปัญหาก็มีการพัฒนาไปตลอดเวลา รวมทั้งชนิดของสารเสพติดที่ใช้ก็มีความหลากหลายมากขึ้น ยิ่งเป็นการก่อปัญหามากมาย ทั้งปัญหาอาชญากรรม ผลกระทบต่อระบบเศรษฐกิจ โดยมีการลักลอบผลิต นำเข้า และจำหน่าย ซึ่งกลุ่มบุคคลที่มีความเสี่ยงจะเกิดปัญหานี้ คือ กลุ่มผู้ใช้แรงงาน กลุ่มนักเรียนนักศึกษา และกลุ่มคนผู้ว่างงาน ซึ่งปัญหาอาชญากรรมที่เกิดขึ้นในปัจจุบันไม่ว่าจะเป็นคดีลักทรัพย์ ทำร้ายร่างกาย ส่วนหนึ่งเกิดจากการที่ผู้ต้องหาติดยาเสพติด คือ ยาบ้า ซึ่งเป็นยาเสพติดที่มีส่วนประกอบหลักคือสารสังเคราะห์กลุ่มแอมเฟตามีน (Amphetamine, AP) และมีอนุพันธ์หลายชนิด เช่น Methamphetamine (MA), Methylenedioxymethamphetamine (MDMA), Methylenedioxyamphetamine (MDA) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำคาเฟอีน (Caffeine) มาผสมด้วย เพราะมีสารออกฤทธิ์คล้ายกันแต่ไม่รุนแรงเท่า

การตรวจหาสารเสพติดในร่างกายของผู้เสพ สามารถใช้ตัวอย่างชีววัตถุหลายชนิด เช่น ปัสสาวะ (Jurano, Gimenez, Soriano, Menendez, & Repetto, 2000) ซิรัม (Akira et al., 2000) เส้นผม (Musshoff, Junker, Lachenmeier, Kroener, & Madea, 2002) เป็นต้น ปัสสาวะเป็นตัวอย่างชีววัตถุที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายและเป็นที่ยอมรับในกระบวนการยุติธรรมในระดับสากล (Wang et al., 2006) ข้อดีของการใช้ตัวอย่างปัสสาวะคือ เป็นตัวอย่างที่สามารถเก็บได้ง่ายเมื่อเทียบกับสารชีววัตถุอื่นๆ และสามารถเก็บตัวอย่างในปริมาณมากได้ ทำให้มีตัวอย่างเพียงพอที่จะใช้ในการวิเคราะห์ และระยะเวลาที่สามารถตรวจพบสารเสพติดในปัสสาวะค่อนข้างนานหลายวัน แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ตัวอย่างปัสสาวะก็มีข้อเสีย เช่น อาจมีการสับเปลี่ยน หรือปลอมปนตัวอย่าง และรูปแบบของการขับสารเสพติดทางปัสสาวะขึ้นกับค่าความเป็นกรดหรือด่างของปัสสาวะ (Myung et al., 1998) และตามกฎหมายกำหนดผู้ที่มีระดับของ methamphetamine (MA) ในปัสสาวะมากกว่า 1000 ng/ml ถือว่าผิดกฎหมายตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 (สำนักงานคุ้มครองสิทธิและช่วยเหลือทางกฎหมายแก่ประชาชน(สคช).กรมอัยการ, 2533) ซึ่งเป็นปริมาณที่มีน้อยในตัวอย่าง ดังนั้นขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างในการตรวจพิสูจน์จึงมีความสำคัญ ซึ่งมีหลายวิธี เช่น Liquid-Liquid-Liquid Microextraction (LLLME) (He & Kang, 2006), Hollow Fiber (HF) Liquid Phase Microextraction (LPME) (Xiong, Chen, He, & Hu, 2010), Solid-Phase Microextraction (SPME) (Musshoff et al., 2002) และ Solid-Phase Extraction (SPE) (Fuh, Wu, & Lin, 2006; Kumazawa et al., 2007; Myung et al., 1998)

ในการตรวจสอบสารเสพติดแบ่งเป็น 2 ระดับ คือ การตรวจสอบเพื่อคัดกรองขั้นต้น (screening test) เป็นการตรวจทดสอบสารเสพติดเบื้องต้นกับผู้ต้องสงสัยว่าเสพยาเสพติดด้วยอุปกรณ์ชุดตรวจสอบสารเสพติด เช่น ชุดตรวจสอบโดยวิธี Immunoassay (Kraemer, Vernaleken, & Maurer, 1997) ซึ่งมีข้อดีคือ ขั้นตอนการตรวจไม่ยุ่งยาก อ่านผลได้รวดเร็ว ราคาไม่สูงเกินไป สามารถใช้ตรวจคัดแยกตัวอย่างจำนวนมากได้ในระยะเวลาอันสั้น และสามารถนำไปใช้ในสถานที่ต่างๆ นอกห้องปฏิบัติการ (on-site) ได้อย่างสะดวก โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือพิเศษ หรือใช้บุคลากรที่มีความรู้ หรือมีทักษะสูง การตรวจเบื้องต้นนี้สามารถนำผลการตรวจไปใช้ในทางกฎหมายได้ แต่หากจะต้องมีผลการตรวจยืนยัน (confirmation test) (Huang & Zhang, 2003) ด้วย ซึ่งจะเป็นการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ซึ่งสามารถระบุชื่อสารเสพติดแต่ละชนิดได้อย่างชัดเจนและระบุปริมาณที่แน่นอนได้ สำหรับเทคนิควิธีการตรวจยืนยันหาปริมาณ MA ในปัสสาวะที่นิยมใช้ เช่น thin layer

chromatography (TLC) (Derk, 1976) ซึ่งเทคนิคนี้เป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและกึ่งปริมาณ เครื่องมือไม่ซับซ้อน เข้าใจง่าย แต่มีความจำเพาะเจาะจง ความไวและประสิทธิภาพในการแยกต่ำ และยังใช้สารเคมีปริมาณมากอีกด้วย เทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) (Concheiro et al., 2007; Pavlova & Petrovsk– Jovanović, 2007) ซึ่งเทคนิคนี้เป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้ มีความจำเพาะเจาะจง ความไวและประสิทธิภาพในการแยกสูงกว่า TLC สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีมวลโมเลกุลสูงได้ แต่ข้อเสียคือมีความซับซ้อนของเครื่องมือสูง มี waste solvent มาก และ detection limit ต่ำกว่าเทคนิค gas chromatography (GC) (Mitrevski & Zdravkovski, 2005; Xiong et al., 2010) ซึ่งเทคนิค GC นี้สารตัวอย่างที่เข้าสู่คอลัมน์อยู่ในสถานะแก๊ส จึงทำให้ไม่มี waste solvent และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังมีความจำเพาะเจาะจง ความไวและประสิทธิภาพในการแยกสูงกว่า HPLC อีกด้วย วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจหาปริมาณ MA ในปัสสาวะ ตามที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำนักยาและวัตถุเสพติด กระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดใช้เทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) โดยวิธีการเตรียมอนุพันธ์ (derivatization) แล้วสกัดผ่าน solid-phase extraction (SPE) (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2558)

วิธีการเตรียมตัวอย่าง โดยการเตรียมอนุพันธ์ (derivatization) ร่วมกับ SPE เป็นกระบวนการเตรียมสารให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ โดยสารที่เตรียมได้จะมีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายกับสารเดิม แต่เปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่สำคัญในโครงสร้าง เนื่องจากสารประกอบบางชนิดไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC เช่น ความสามารถในการระเหยกลายเป็นไอ ความเสถียรในการตรวจวัด หรือความมีขี้ เป็นต้น หลังจากเตรียมอนุพันธ์แล้ว นำสารละลายนั้นมาสกัดผ่าน SPE ซึ่งอาศัยหลักการ partition ที่เกิดระหว่างของแข็ง ซึ่งก็คือ absorbent ที่อยู่ในแท่ง SPE กับของเหลว (solvent) โดยมีขั้นตอนดังนี้ เริ่มจาก condition เป็นการเตรียม sorbent ที่บรรจุอยู่ในแท่ง SPE ให้พร้อมรองรับตัวอย่าง จากนั้น load ตัวอย่างลงไปเพื่อให้จับกับ sorbent แล้วล้าง (wash) ด้วย solvent เพื่อขจัดเอาสารที่จับกับ sorbent ได้น้อยหรือจับอยู่ที่ส่วนผิวของ sorbent ออก จากนั้นทำการชะ (elution) เป็นการดึงเอาสารที่เราสนใจที่เกาะกับ sorbent ออก เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-FID ต่อไป สำหรับวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี headspace (HS) ใช้สำหรับสารตัวอย่างที่เป็นของแข็งหรือของเหลวที่สามารถระเหยได้ โดยใส่สารตัวอย่างลงในขวดที่ปิดสนิท (sealed vial) แล้วทำให้สารตัวอย่างระเหยด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิคงที่ สารตัวอย่างก็จะกลายเป็นไอจนเกิดสมดุลขึ้น (equilibrium) ระหว่าง gas phase และ sample phase หลังจากนั้นก็ฉีดไอระเหยของตัวอย่างเข้าเครื่อง gas chromatography ต่อไป วิธีนี้เหมาะสมกับตัวอย่างที่ impurity มาก นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยมากๆ ได้ เนื่องจากตัวอย่างที่ฉีดเข้าไปในคอลัมน์อยู่ในสภาพเป็น gas ดังนั้นตัวอย่างที่ไม่สามารถระเหยได้จะไม่ถูกฉีดเข้าไปในคอลัมน์

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบการหาปริมาณ methamphetamine (MA) ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้เสพสารเสพติดที่ได้จากสถาบันนิติเวช โรงพยาบาลตำรวจ สำนักงานตำรวจแห่งชาติ ด้วยเทคนิค gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) โดยการเตรียมตัวอย่าง 2 วิธี คือ วิธี derivatization ร่วมกับ SPE และวิธี headspace (HS) ซึ่งวิธี derivatization ร่วมกับ SPE นิยมใช้ในการหาปริมาณ MA เพื่อกำจัด interference ต่างๆ ในสารละลายตัวอย่าง แต่สำหรับการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิค HS จะลดปริมาณสารเคมีและขั้นตอนที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง ทำให้สะดวก รวดเร็วกว่าอีกด้วย

วิธีวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

สารมาตรฐาน Methamphetamine (MA) Diphenylamine (DPA) จาก Sigma-Aldrich (United States) Trifluoroacetic acid (TFA) และ Sodium hydroxide (NaOH) จาก Merck (Thailand) Acetic acid (CH_3COOH), Ammonium hydroxide (NH_4OH) และ Methanol (CH_3OH) จาก Carlo Erba ซึ่งสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็น analytical grade การเตรียมตัวอย่างโดยการสกัดผ่าน SPE (Oasis HLB SPE cartridge, 1 mL, 30 mg, ยี่ห้อ water บริษัท Sithiporn) เครื่อง Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID) (รุ่น GC-17A ยี่ห้อ SHIMADZU) เครื่อง Headspace Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (HS-GC-FID) (รุ่น TRACE 1300 ยี่ห้อ Thermo SCIENTIFIC)

การวิเคราะห์ด้วยวิธี derivatization ร่วมกับ SPE- GC-FID

เตรียมสารละลายมาตรฐาน MA ความเข้มข้น 0, 1000, 1250, 2500, 5000 และ 10000 ng/mL โดยเตรียมจากสารละลายมาตรฐาน MA เข้มข้น 1 mg/mL แล้วปรับปริมาตรด้วยปัสสาวะที่ไม่มีสารเสพติด จากนั้นเจือจางแบบ series ให้มีความเข้มข้นดังกล่าว แล้วเตรียมสารละลายผ่าน SPE ต่อไป

เตรียมสารละลายโดยใช้ SPE โดยนำสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมา 1 mL เติม TFA 10 μL นำไป vortex 3 นาที และ centrifuge 10 นาที แล้วนำส่วนใสหยดผ่าน SPE (ก่อนใช้ล้างด้วย methanol และ น้ำกลั่นอย่างละ 1 mL) ที่ละลาย จากนั้นล้างด้วย 5:95 (v/v) methanol: 2% ammonium hydroxide 1 mL ตามด้วย 20:80 (v/v) methanol: 2% ammonium hydroxide 1 mL จากนั้น elute ด้วย 20:80 (v/v) methanol: 2% acetic acid 1 mL เก็บส่วนนี้ลงใน eppendorf tube เติม 1 mg/mL diphenylamine (DPA) 100 μL และ 1 M potassium hydroxide 30 μL จากนั้นนำไปพ่น N_2 พร้อมให้ความร้อนที่ 65 °C จนแห้ง แล้วเติม methanol 50 μL เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-FID (Fuh et al., 2006)

สำหรับการเตรียมสารตัวอย่าง โดยใช้สารตัวอย่าง 1 mL แล้วเจือจางให้อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน จากนั้นเติม TFA เพื่อทำ derivatization แล้วเตรียมตัวอย่างผ่าน SPE ทำเช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายมาตรฐาน แล้วนำไปวิเคราะห์ GC-FID

สภาวะการทดลองด้วยเทคนิค GC-FID ใช้คอลัมน์ BPX-5 (30m $\times$ 0.25 i.d.; 5% phenyl/ 95% methyl polysilphenylene เริ่มที่อุณหภูมิ 80 °C จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 20 °C/min จนถึงอุณหภูมิ 270 °C คงที่ 1 min อุณหภูมิ injection 290 °C อุณหภูมิ detector 300 °C ใช้ He เป็น Carrier gas

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HS-GC-FID

เตรียมสารละลายมาตรฐาน MA ความเข้มข้น 1000, 3000, 5000 และ 10000 ng/mL โดยปิเปตปัสสาวะที่ไม่มีสารเสพติด 1 mL ลงในขวดสำหรับเทคนิค HS ขนาด 20 mL จากนั้นปิเปตสารมาตรฐาน MA เข้มข้น 1 mg/mL มา 1, 3, 5, 7 และ 10 μL แล้วเติมสารละลาย DPA 5 μL และ สารละลาย 1M sodium hydroxide 50 μL สุดท้ายเติมเกลือ NaCl ประมาณ 3 g ลงในแต่ละความเข้มข้น จะได้สารละลายมาตรฐาน MA เข้มข้น 1000, 3000, 5000 และ 10000 ng/mL ตามลำดับ เพื่อนำไปวิเคราะห์ HS-GC-FID ต่อไป

เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยปิเปตตัวอย่างปัสสาวะ 1 mL ลงในขวดสำหรับเทคนิค HS ขนาด 20 mL แล้วเติมสารละลาย DPA 5 μ L และสารละลาย sodium hydroxide (6M) 40 μ L จากนั้นเติมเกลือ NaCl ประมาณ 3 g เพื่อนำไปวิเคราะห์ HS-GC-FID ต่อไป

สภาวะการทดลองด้วยเทคนิค HS-GC-FID ใช้คอลัมน์ BPX-5 (30m $\times$ 0.25 i.d.; 5% phenyl/95% methyl polysilphenylene เริ่มที่อุณหภูมิ 80 $^{\circ}$ C จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 20 $^{\circ}$ C/min จนถึงอุณหภูมิ 160 $^{\circ}$ C คงที่ 3 min แล้วเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 20 $^{\circ}$ C จนถึงอุณหภูมิ 270 $^{\circ}$ C อุณหภูมิ Injection 290 $^{\circ}$ C อุณหภูมิ detector 300 $^{\circ}$ C ใช้ He เป็น Carrier gas ที่อัตรา 1 mL/min incubation ที่อุณหภูมิ 90 $^{\circ}$ C นาน 20 min อุณหภูมิ syringe 90 $^{\circ}$ C และฉีดปริมาตร 1.0 mL

การศึกษาค่า Limit of detection (LOD) และค่า Limit of quantitation (LOQ)

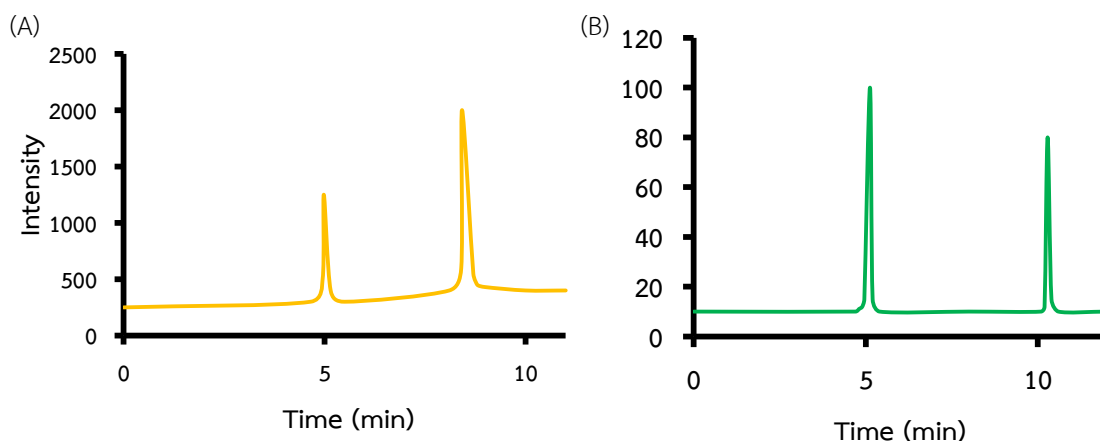
การศึกษาค่า Limit of detection (LOD) คือความเข้มข้นต่ำสุดที่เครื่องสามารถวิเคราะห์ได้ และค่า Limit of quantitation (LOQ) คือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ในตัวอย่าง และอ่านค่าได้อย่างถูกต้อง โดยการวิเคราะห์ปัสสาวะที่ไม่มีสารเสพติดด้วยวิธีเตรียมตัวอย่างแบบ derivatization ร่วมกับ SPE-GC-FID และวิธี HS-GC-FID แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) และค่า standard deviation (SD) ซึ่งได้มาจากการทำการทดลอง 10 ครั้ง แล้วคำนวณค่า LOD (3S/N) และค่า LOQ (10S/N)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหาสาร MA ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้เสพสารเสพติดด้วยวิธี derivatization ร่วมกับ SPE-GC-FID และวิธี HS-GC-FID โดยนำปริมาณ MA ในตัวอย่างปัสสาวะที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างทั้ง 2 วิธี มาทดสอบทางสถิติด้วย paired t-test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($t_{\text{stat}} < t_{\text{critical}}$ ถือว่าผลการวิเคราะห์ของทั้ง 2 วิธี ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ)

ผลการวิจัย

การศึกษาเชิงคุณภาพของสารมาตรฐาน MA และ สารละลาย DPA โดยวิธี derivatization ร่วมกับ SPE-GC-FID และวิธี HS-GC-FID จากการวิเคราะห์สารมาตรฐาน MA ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยใช้สารละลาย DPA ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL เป็น internal standard (IS) สำหรับวิธี derivatization ร่วมกับการสกัดผ่าน SPE-GC-FID ให้ผลดัง chromatogram ในรูปที่ 1 (A) พบว่า retention time ของสารมาตรฐาน MA และสารละลาย DPA อยู่ที่เวลา 4.98 และ 8.42 ตามลำดับ สำหรับวิธี HS-GC-FID ให้ผลดัง chromatogram ในรูปที่ 1 (B) พบว่า retention time ของสารมาตรฐาน MA และสารละลาย DPA อยู่ที่เวลา 5.12 และ 10.29 ตามลำดับ



รูปที่ 1 chromatogram ของสารมาตรฐาน MA ความเข้มข้น 1 mg/mL และ สารละลาย DPA (IS) ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยวิธี derivatization ร่วมกับ SPE- GC-FID (A) และวิธี HS-GC-FID (B)

จากรูปที่ 1 จะเห็นว่าค่า retention time ของสารมาตรฐาน MA และสารละลาย DPA ของทั้งสองวิธีออกจากคอลัมน์ที่เวลาใกล้เคียงกัน เนื่องจากทั้งสองเทคนิคใช้คอลัมน์เดียวกันและสภาวะการทดลองใกล้เคียงกัน ทำให้ค่า retention time ของทั้งสองเทคนิคใกล้เคียงกัน นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่า resolution (R_s) ของทั้งสองวิธี พบว่ามีค่ามากกว่า 1.5 ซึ่งแสดงว่าพีคของสารมาตรฐาน MA และสารละลาย DPA แยกจากกันอย่างชัดเจน ดังนั้นวิธีการเตรียมตัวอย่างของทั้งสองวิธีและสภาวะการทดลองของเทคนิค GC-FID นี้เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณ methamphetamine ในตัวอย่างปัสสาวะ

การสร้าง calibration curve ของสารมาตรฐาน MA โดยวิธี derivatization ร่วมกับ SPE-GC-FID และวิธี HS-GC-FID โดยการวิเคราะห์สารมาตรฐาน MA ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มี DPA เป็น internal standard (IS) สำหรับวิธี derivatization ร่วมกับ SPE-GC-FID จะวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1000-10000 ng/mL และสำหรับวิธี HS-GC-FID จะวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1000-10000 ng/mL จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน MA ต่อพื้นที่ใต้พีคของสารละลาย DPA (IS) ซึ่งได้จากการทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ แล้วนำค่าเฉลี่ยมาสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของ MA ต่อ DPA (IS) และความเข้มข้นของ MA (ng/mL) จะได้สมการเส้นตรงและค่าความเป็นเส้นตรง (r^2) แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สมการเส้นตรงและค่าความเป็นเส้นตรงที่ได้จาก calibration curve ค่า LOD และค่า LOQ ของสารมาตรฐาน MA โดยวิธี derivatization ร่วมกับ SPE-GC-FID และวิธี HS-GC-FID

เทคนิค	วิธี derivatization ร่วมกับ SPE-GC-FID	วิธี HS-GC-FID
สมการเส้นตรง	$y = 0.0002x + 0.0436$	$y = 0.0002x + 0.0347$
ค่าความเป็นเส้นตรง (r^2)	0.9952	0.9972
LOD (ng/mL)	116	45
LOQ (ng/mL)	161	58

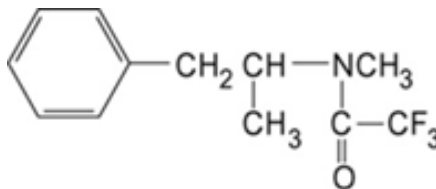
จากตารางที่ 1 พบว่าทั้งสองเทคนิคให้ค่าความเป็นเส้นตรงที่ดี ดังนั้นการหาปริมาณ MA ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้เสพสารเสพติด โดยการเตรียมตัวอย่างและใช้สภาวะการทดลองข้างต้น สามารถวิเคราะห์หาปริมาณ MA ได้ดีในช่วงความเข้มข้น 1000-10000 ng/mL เมื่อพิจารณาค่า LOD และค่า LOQ ของทั้งสองวิธีพบว่าได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้เพียงพอสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ MA ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้เสพสารเสพติด อีกทั้งยังให้ความแม่นยำสูง (%RSD ≤ 10 , n=10) แสดงดังค่า %RSD สำหรับวิธี derivatization ร่วมกับ SPE-GC-FID และวิธี HS-GC-FID เท่ากับ 6.7 และ 4.9 ตามลำดับ เมื่อศึกษา %recovery โดยวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติม MA ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า วิธี Derivatization ร่วมกับ SPE-GC-FID ได้ %recovery อยู่ในช่วง 84.6-97.3% และวิธี HS อยู่ในช่วง 83.8-102.1%

การศึกษาหาปริมาณ MA ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้เสพสารเสพติดที่ได้จากสถาบันนิติเวชโรงพยาบาลตำรวจจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยวิธี derivatization ร่วมกับ SPE-GC-FID และวิธี HS-GC-FID โดยการเตรียมตัวอย่างและสภาวะการทดลองด้วยวิธีที่กล่าวมาข้างต้น ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณความเข้มข้นของ MA ในตัวอย่างปัสสาวะ ($\mu\text{g/mL}$) ของเทคนิค GC-FID และ HS-GC-FID

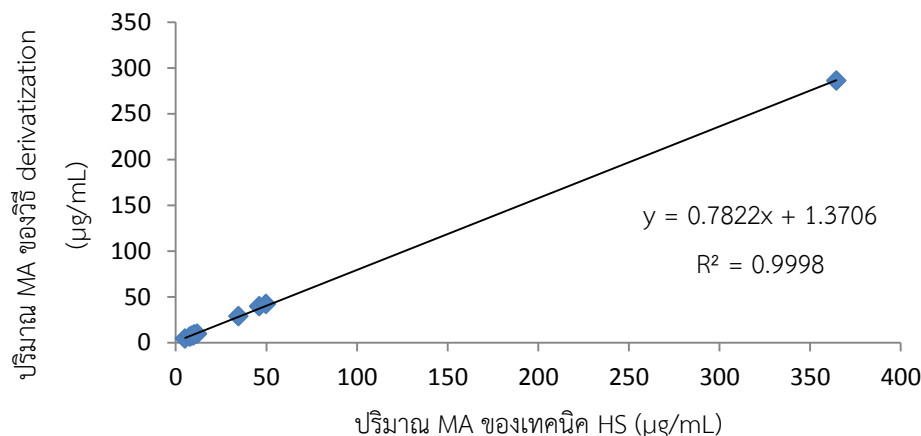
ตัวอย่างที่	วิธี derivatization ร่วมกับ SPE-GC-FID		วิธี HS-GC-FID	
	ปริมาณ MA ($\mu\text{g/mL}$)	SD	ปริมาณ MA ($\mu\text{g/mL}$)	SD
1	8.158	0.60	9.957	0.63
2	4.376	0.29	5.146	0.69
3	29.017	0.48	34.590	1.80
4	6.663	0.87	7.750	0.36
5	7.686	0.84	8.863	0.74
6	285.936	0.49	369.238	12.84
7	39.721	0.92	46.142	1.48
8	9.881	0.74	11.870	2.33
9	42.378	0.72	49.886	7.70
10	9.201	0.35	10.190	0.75

การวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะโดยวิธี derivatization ด้วยการเติม trifluoroacetic acid (TFA) ทำให้ได้ trifluoroacetylmethamphetamine (MA-TFA) (Kumazawa et al., 2007) ดังรูปที่ 2 เพื่อลดความมีขั้วของหมู่ฟังก์ชัน amine ใน MA และยังเพิ่มความสามารถในการระเหยกลายเป็นไอ ทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่สามารถแยกสารประกอบที่มีในตัวอย่างออกจากกันและได้ปริมาณที่มากขึ้น (Lin, Weng, Wu, Chen, & Liu, 2008) จากนั้นนำสารละลายไปสกัดผ่าน SPE ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-FID เพื่อกำจัดสารรบกวน เช่น ยูเรีย โปรตีน ฮอร์โมน และวิตามินต่างๆ ซึ่งวิธีนี้นิยมใช้ในการหาปริมาณ MA ในตัวอย่างปัสสาวะและสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะด้วยเทคนิค HS-GC-FID จะเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วขึ้น อีกทั้งยังลดปริมาณสารเคมี ทดลองโดยการเติมเกลือ sodium chloride (NaCl) ลงไป เพื่อเพิ่มการระเหยของ MA ในตัวอย่างปัสสาวะ (salting out) (Akramipour, Hemati, Gheini, Fattahi, & Ghaffari, 2016) โดยเกลือจะเข้าไปดึงโมเลกุลของน้ำรอบๆ สารอินทรีย์ ทำให้สารอินทรีย์เข้าใกล้กันมากขึ้นและห่างจากโมเลกุลของน้ำ ก่อนนำไปให้ความร้อนเพื่อให้ MA ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่ระเหยได้ระเหยออกจากสารตัวอย่างและวิเคราะห์ด้วย GC-FID



รูปที่ 2 โครงสร้าง trifluoroacetylmethamphetamine (MA-TFA)

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อนำปริมาณ MA ($\mu\text{g/mL}$) ในตัวอย่างปัสสาวะระหว่างวิธี derivatization ร่วมกับ SPE-GC-FID และวิธี HS-GC-FID มาเปรียบเทียบกัน โดยนำความเข้มข้นที่ได้จาก calibration curve ของแต่ละวิธีตั้งตาราง 2 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น MA ($\mu\text{g/mL}$) ของวิธี derivatization ร่วมกับ SPE-GC-FID (แกน y) และวิธี HS-GC-FID (แกน x) ดังรูปที่ 3 จากกราฟจะเห็นว่าปริมาณของ MA จากทั้งสองวิธีนี้ให้ผลการทดลองในทิศทางเดียวกัน และมีความเป็นเส้นตรงที่ดี ($r^2 = 0.9998$) และได้สมการ $y = 0.7822x + 1.3706$ นอกจากนั้นนำค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้จากสองวิธีมาเปรียบเทียบกันด้วยวิธีทางสถิติ (paired t-test) พบว่าความเข้มข้นที่ได้จากสองวิธีนี้ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดย โดย $t_{\text{stat}} (1.39) < t_{\text{critical}} (2.26)$ แสดงให้เห็นว่าวิธีการเตรียมตัวอย่างแบบ derivatization ร่วมกับ SPE-GC-FID และ วิธี HS-GC-FID สามารถใช้วิธีทั้งสองนี้ในการหาปริมาณ MA ได้



รูปที่ 3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น MA (ug/mL) ของวิธี derivatization ร่วมกับ SPE (แกน y) และวิธี HS (แกน x) ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-FID

สรุปผล

การศึกษาปริมาณ MA ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้เสพสารเสพติด และการเปรียบเทียบปริมาณ MA ในตัวอย่างปัสสาวะของผู้เสพสารเสพติดที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างโดยวิธี derivatization ด้วย trifluoroacetic acid แล้วนำสารละลายตัวอย่างไปสกัดผ่าน solid-phase extraction (SPE) และวิธี headspace (HS) ด้วยเทคนิค gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) เมื่อใช้วิธีการเตรียมสารละลายและสภาวะการทดลองนี้แล้วจะได้กราฟมาตรฐานที่มีความเป็นเส้นตรงที่ดี สามารถวิเคราะห์ได้ดีในช่วงความเข้มข้น 1000-10000 ng/mL ให้ค่าความแม่นยำสูง ค่า LOD และค่า LOQ เพียงพอสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะของผู้เสพสารเสพติด และจากผลการทดลองในตัวอย่างปัสสาวะของผู้เสพสารเสพติดพบว่าวิธี derivatization ร่วมกับ SPE-GC-FID ได้ความเข้มข้น methamphetamine น้อยกว่าวิธี HS-GC-FID เล็กน้อย อาจเกิดจากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วย SPE ในขั้นตอนการชะ analyte ออกจาก column ใน SPE อาจจะชะออกมาไม่หมด ทำให้ได้ปริมาณน้อยกว่าวิธี HS-GC-FID แต่เมื่อนำค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้จากสองวิธีมาเปรียบเทียบกันด้วยวิธีทางสถิติ (paired t-test) พบว่าความเข้มข้นที่ได้จากสองวิธีนี้ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Apichai Phonchai (Phonchai, 2009) ได้ศึกษาการหาปริมาณ methamphetamine ในตัวอย่างปัสสาวะที่เตรียมตัวอย่างด้วย SPE แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-FID พบว่าได้ค่า LOQ เท่ากับ 1000 ng/mL และ %RSD เท่ากับ 17.2 ซึ่งมีค่าสูงกว่างานวิจัยนี้ (LOQ = 161 ng/mL, %RSD = 6.7) และได้รายงาน %recovery อยู่ในช่วง 80.3-90.7 ซึ่งต่ำกว่างานวิจัยนี้ (recovery=84.6-97.3%) อีกทั้งงานวิจัยของ Jingjing Zhou และคณะ (Zhou & Zeng, 2006) ได้ศึกษาการหาปริมาณ MA ในตัวอย่างปัสสาวะที่เตรียมด้วยวิธี HS-SPME-GC-FID พบว่า %RSD ได้ใกล้เคียงกันกับวิธี HS-GC-FID ของงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ทั้งสองวิธียังเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว มีความเฉพาะเจาะจงสูง ถูกต้อง แม่นยำ ใช้สารเคมีน้อย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และสามารถวิเคราะห์สารที่มีปริมาณต่ำระดับ ng/mL ได้อีกด้วย จากการศึกษาแสดงให้เห็นประสิทธิภาพของการนำวิธี derivatization ร่วมกับ SPE-GC-FID และวิธี HS-GC-FID สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาปริมาณ MA ในตัวอย่างปัสสาวะและผลการทดลองยังสามารถใช้ประโยชน์ในการสืบสวนสอบสวนทางนิติวิทยาศาสตร์ เพื่อระบุผู้ที่กระทำความผิดได้

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

Department of medical sciences. Bureau of Drug and Narcotic. (2015). “ Withīmātrathān samrap kārtrūatphīsūt sānseptit nai patsāwa Lēmthī 1” [“Standard Methods for Analytical of Narcotics inUrine (Volume I)”], Nonthaburi: Khongkiantikanphim.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. สำนักงานยาและวัตถุเสพติด. (2558). วิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจพิสูจน์สารเสพติดในปัสสาวะ เล่มที่ 1.นนทบุรี: โรงพิมพ์คงเกียรติการพิมพ์.

Department of peoples’ rights protection and legal aid. (1990). Kotmāipōṅkanyāseptit [Lew of the narcotics control], Bangkok: Srisombatkanphim Co., Ltd.

สำนักงานคุ้มครองสิทธิและช่วยเหลือทางกฎหมายแก่ประชาชน (สคช.) กรมอัยการ. (2533). กฎหมายป้องกันยาเสพติด. กรุงเทพฯ: บริษัท ศรีสมบัติการพิมพ์ จำกัด.

Klitsananuwat, O., Choosakoonkriang,S., Supaluknari, S., and Tungtananuwat, W. (2017). “phon khōṅg saphāwa khwāmpen krot læ dāṅg tō parimān khōṅg mēt ‘āmfetāmīn nai tuāyāṅ patsāwa thī truat wat doī CEDIA assay” [The effect of sample pH on methamphetamine levels in urine samples as measured by CEDIA assay]. Veridian E- Journal, Science and Technology Silpakorn University 4, 4 (July–August): 1-13.

อรทัย กฤษณานุวัฒน์ ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี วชิรวิษณุ ตั้งธนานุวัฒน์ (2560). “ผลของสภาวะความเป็นกรดและด่างต่อปริมาณของเมทแอมเฟตามีนในตัวอย่างปัสสาวะที่ตรวจวัดโดย CEDIA assay” Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University 4, 4 (กรกฎาคม–สิงหาคม): 1-13.

ภาษาต่างประเทศ

Akira, N., Mikio, Y., Junting, L., Kazuo, O., Kenji, H., Tohru, I., & Tohru, K. (2000). "Simple and simultaneous analysis of fenfluramine, amphetamine and methamphetamine in whole blood by gas chromatography–mass spectrometry after headspace–solid phase microextraction and derivatization." **Forensic Science International** 109: 215–223.

Akramipour, R., Hemati, M., Gheini, S., Fattahi, N., & Ghaffari, H. R. (2016). "Determination of methadone in human urine using salting-out effect and dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV." **J Chromatogr Sep Tech** 7(6): 1-4. doi:10.4172/2157-7064.1000339

- Concheiro, M., Simões, S. M. d. S. S., Quintela, Ó., Castro, A. d., Dias, M. J. R., Cruz, A., & Rivadull, M. L. (2007). "Fast LC–MS/MS method for the determination of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB and PMA in urine." **Forensic Science International** 171: 44-51.
- Derk, E. (1976). "A procedure for the differentiation of the optical isomers of amphetamine and methamphetamine by thin-layer chromatography." **Journal of Chromatography A** 117(2): 442-444.
- Fuh, M., Wu, T., & Lin, T. (2006). "Determination of amphetamine and methamphetamine in urine by solid phase extraction and ion-pair liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry." **Talanta** 68: 987–991.
- He, Y., & Kang, Y. J. (2006). "Single drop liquid–liquid–liquid microextraction of methamphetamine and amphetamine in urine." **Journal of Chromatography A** 1133: 35-40.
- Huanga, Z., & Zhang, S. (2003). "Confirmation of amphetamine, methamphetamine, MDA and MDMA in urine samples using disk solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry after immunoassay screening." **Journal of Chromatography B** 792(2): 241-247.
- Jurano, C., Gimenez, M. P., Soriano, T., Menendez, M., & Repetto, M. (2000). "Rapid Analysis of Amphetamine, Methamphetamine, MDA, and MDMA in Urine Using Solid-Phase Microextraction, Direct On-Fiber Derivatization, and Analysis by GC-MS." **Journal of Analytical Toxicology** 24: 11-16.
- Kraemer, T., Vernaleken, I., & Maurer, H. H. (1997). "Studies on the metabolism and toxicological detection of the amphetamine-like anorectic mefenorex in human urine by gas chromatography–mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay." **Journal of Chromatography B** 702(1-2): 93-102.
- Kumazawa, A., Hasegawa, C., Lee, X. P., Hara, K., Seno, H., Suzuki, O., & Sato, K. (2007). "Determination of methamphetamine and amphetamine in human urine using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry." **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 44: 602-607.
- Lin, D.-L., Weng, S.-M., Wu, C.-H., Chen, B.-G., & Liu, R. H. (2008). "Chemical Determination for the Analysis of Drugs by GC-MS." **Journal of Food and Drug Analysis** 16(1): 1-10.

- Mitrevski, B., & Zdravkovski, Z. (2005). "Rapid and simple method for direct determination of several amphetamines in seized tablets by GC–FID." **Forensic Science International** 152: 199-203.
- Musshoff, F., Junker, H. P., Lachenmeier, D. W., Kroener, L., & Madea, B. (2002). "Fully Automated Determination of Amphetamine and Synthetic Designer Drugs in Hair Samples Using Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry." **Jornal of Chromatographic Science** 40: 259-264.
- Myung, S. W., H.K., M., Kim, S., M., K., J.B., C., & T.J., K. (1998). "Determination of methamphetamine and dimethamphetamine in human urine by solid-phase microextraction (SPME)-gas chromatography/mass spectrometry." **Journal of Chromatography B** 716: 359-365.
- Pavlova, V., & Petrovsk– Jovanović, S. (2007). "Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine and caffeine in seized tablets by high-performance liquid chromatography." **Acta Chromatographicca** 18: 157-167.
- Phonchai, A. (2009). "Determination of MDMA, MDA and MA in ecstasy tablets and urine samples of suspects seized in Songkhla province using GC-FID technique." Master of science in forensic science, Songkla university.
- Wang, S. M., Lin, C. C., Li, T. L., Shih, C. Y., Giang, Y. S., & Liu, R. H. (2006). "Distribution characteristics of methamphetamine and amphetamine in urine and hair specimens collected from alleged methamphetamine users in northern Taiwan." **Analytica Chimica Acta** 576: 140-146.
- Xiong, J., Chen, J., He, M., & Hu, B. (2010). "Simultaneous quantification of amphetamines, caffeine and ketamine in urine by hollow fiber liquid phase microextraction combined with gas chromatography-flame ionization detector." **Talanta** 82: 969-975.
- Zhou, J., & Zeng, Z. (2006). "Novel fiber coated with -cyclodextrin derivatives used for headspace solid-phase microextraction of ephedrine and methamphetamine in human urine." **Analytica Chimica Acta** 556: 400-406.